# การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์แรกเริ่มในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

นางสาวพงษวรรณ ขาวสะอาด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2562

# CRYOPRESERVATION OF TESTIS AND OVARY FOR PROGENITOR GERM CELL TRANSPLANTATION IN STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*)

**Pongsawan Khaosa-art**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in Animal Production Technology**

**Suranaree University of Technology**

**Academic Year 2019**

**การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์แรกเริ่ม ในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)
ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. สพญ. ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

(อาจารย์ ดร. Satoshi Kubota)
กรรมการ

(ผศ. ดร.เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล)
กรรมการ

(รศ. ร.อ. ดร.กนต์ธร ชำนิประศาสน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พงษวรรณ ขาวสะอาด : การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์แรกเริ่มในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) (CRYOPRESERVATION OF TESTIS AND OVARY FOR PROGENITOR GERM CELL TRANSPLANTATION IN STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*)) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 75 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) โดยในขั้นแรกเป็นการศึกษาถึงสองปัจจัย ได้แก่ สาร Extender ร่วมกับ สาร Cryoprotectant และ 3 ชนิดของสาร Extenders ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ Calcium-free Hank's balanced salt solution (CF-HBSS), Rainbow trout extender (RT) และ Leibovitz's L-15 medium (L-15) ร่วมกับ 3 ชนิดของสาร Cryoprotectants ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethylene glycol (EG) และ Propylene glycol (PG) โดยนำมาทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเซลล์แช่แข็งและเซลล์ชนิดสดของอัณฑะและรังไข่ จากนั้นเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของสาร Cryoprotectant มาทำการทดสอบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ได้แก่ 1.0 1.3 และ 1.6 โมลาร์ ต่อมาได้ ทำการศึกษาผลของสาร Cryoprotectant ที่เป็นแหล่งพลังงานและโปรตีน ได้แก่ น้ำตาล (กลูโคส ที่ 0.1 0.2 และ 0.3 โมลาร์) ร่วมกับโปรตีน (10% Egg yolk หรือ 1.5% Bovine serum albumin (BSA)) เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้น การศึกษาต่อมาเป็นการทดสอบการละลายตัวอย่างด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม และจากนั้นนำเซลล์แช่แข็งมาทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ปลาสวายผู้รับวัยอ่อน

ผลการศึกษาพบว่าอัณฑะและรังไข่ชนิดสดมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วง 94-96% และ 91-95% ตามลำดับ โดยที่อัณฑะและรังไข่แช่แข็งให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งพบว่า L-15 ร่วมกับ DMSO และ L-15 ร่วมกับ PG มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ 73.33±2.42% และ 86.33±2.34% ตามลำดับ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งพบว่า L-15 ร่วมกับ DMSO และ L-15 ร่วมกับ PG โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ 79.00±4.86% และ 82.00±6.07% ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง คือ PG ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 โมลาร์ ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของน้ำตาลร่วมกับโปรตีนพบว่าไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้นของการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง ($P>0.05$) จากนั้นศึกษาปัจจัยของการละลายตัวอย่าง

พบว่าที่อุณหภูมิ 10°C ระยะเวลาในการละลาย 4 นาทีเหมาะสำหรับการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง และเซลล์ที่ได้จากอัณฑะแช่แข็งสามารถปลูกถ่ายและเข้าอาศัย (Colonization) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ที่ 65.69±7.33% ซึ่งยังต่ำกว่าเซลล์สดที่ 76.11±5.24% และเซลล์ที่ได้จากรังไข่แช่แข็งสามารถปลูกถ่ายและเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ที่อัตราการเข้าอาศัย 44.68±8.12% ซึ่งต่ำกว่าเซลล์ที่ได้จากรังไข่สดเท่ากับ 61.67±12.91% โดยสรุปการศึกษานี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย และถึงแม้ว่าอัณฑะและรังไข่แช่แข็งจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่าอัณฑะและรังไข่ชนิดสด แต่เซลล์ที่สกัดได้จากอัณฑะและรังไข่แช่แข็งก็สามารถปลูกถ่ายและเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้เช่นกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

PONGSAWAN KHAOSA-ART : CRYOPRESERVATION OF TESTIS AND OVARY FOR PROGENITOR GERM CELL TRANSPLANTATION IN STRIPED CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASAEN, Ph.D., 75 PP.

*Pangasianodon hypophthalmus* (STRIPED CATFISH)/CRYOPRESERVATION/GERM CELL TRANSPLANTATION

The aim of this study was to investigate the optimum methods for cryopreservation of testis and ovary in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Firstly, two factors for cryopreservation such as extender and cryoprotectant were investigated. Three extenders including calcium-free Hank's balanced salt solution (CF-HBSS), rainbow trout extender (RT) and Leibovitz's L-15 medium (L-15) combined with three cryoprotectants including dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and propylene glycol (PG) were tested on cryopreserve testis and ovary, and these frozen tissues were also compared with fresh tissues. Then, an optimum condition was examined to vary different concentrations of permeating cryoprotectant at 1.0, 1.3, and 1.6 M. Later, two types of nonpermeating cryoprotectants such as sugar (glucose at 0.1, 0.2, or 0.3 M) and proteins (10% egg yolk or 1.5% bovine serum albumin (BSA)) were tested to improve the cryopreservative reaction. In addition, the thawing process including thawing temperature and duration were examined. Moreover, the frozen testis or ovary were examined transplantability by conducting allogeneic transplantation.

The results showed that fresh testis and ovary had viability in the range of 94-96% and 91-95%, respectivey. The frozen testis in cryomedium containing L-15 with DMSO and L-15 with PG had viability of 73.33±2.42% and 86.33±2.34%, respectively, which were significantly lower than that of fresh tissue ($P$<0.05). The frozen ovary in cryomedium containing L-15 with DMSO and L-15 with PG had viability of 79.00±4.86% and 82.00±6.07%, respectively, which were lower than that of fresh ovary ($P$<0.05). For cryoprotectant, 1.3 M PG gave the highest viability of frozen testis and ovary. Sugar, egg yolk and BSA did not result in improvement of the cryopreservation of testis and ovary ($P$>0.05). The optimum thawing condition of testis and ovary was at 10°C for 4 minutes. The dissociated cells obtained from frozen testis and ovary showed transplantability which could be colonized in recipient gonad. The colonization rate of transplanted cells obtained from frozen testis was 65.69±7.33% which was lower than that of fresh testis 76.11±5.24%. Although it was lower than that of fresh ovary (colonization rate = 61.67±12.91%), the dissociated cells obtained from frozen ovary showed transplantability (colonization rate 44.68±8.12%). In conclusion, this study demonstrated the optimum cryopreservation of testis and ovary. Although the frozen testis and ovary showed lower viability rates when compared to fresh testis and ovary, respectively, these frozen testis and ovary were able to be used for germ cell transplantation.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Pongsawan Khaosa-ard

Academic Year 2019 Advisor's Signature

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก (OROG) โครงการการใช้ยีนที่จำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์เป็นยีนเครื่องหมายในการตรวจหาระยะที่เหมาะสมในการเป็นปลาผู้รับวัยอ่อนสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมถึงช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ รศ. สพญ. ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์ อาจารย์ ดร. Satoshi Kubota และ ผศ. ดร.เบ็ญจมาศ ไพบูลย์กิจกุล ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์และให้ความรู้ คำปรึกษาด้านวิชาการ คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ในการทำการทดลอง และให้คำปรึกษาด้านวิชาการมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอดในการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูบาร์อาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

พงษวรรณ ขาวสะอาด

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญภาพ ..... ฏ

**บทที่**

**1 บทนำ**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย ..... 3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย ..... 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 3
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย ..... 3

**2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

2.1 ปลาสวาย (Striped catfish) ..... 4
2.1.1 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน (Sauvage, 1878) ..... 4
2.1.2 ชีววิทยาของปลาสวาย ..... 4
2.1.3 การแบ่งเพศปลาสวาย ..... 5
2.2 การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ..... 6
2.2.1 สาร Extender ..... 7
2.2.2 สาร Cryoprotectant ..... 7
2.2.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of sperm) ..... 10
2.2.4 การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis and ovary) ..... 10
2.3 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ..... 11

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

**3 วิธีดำเนินการทดลอง**

3.1 สถานที่ทำการทดลอง ..... 21

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี ..... 21

3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงปลา ..... 21

3.2.2 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา ..... 22

3.2.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง ..... 22

3.2.4 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดเซลล์และตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ ..... 23

3.2.5 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์ ..... 24

3.3 แผนการทดลอง ..... 24

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสาร Extender และสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย ..... 24

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย ..... 24

3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารให้พลังงานและโปรตีนต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งในปลาสวาย ..... 24

3.3.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการละลายตัวอย่างในการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง ..... 26

3.4 ปลาที่ใช้ในการทดลอง ..... 27

3.5 การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological sections) ..... 27

3.5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ ..... 27

3.5.2 การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ..... 28

3.6 กระบวนการแช่แข็ง ..... 29

3.6.1 สาร Cryomedium ..... 29

3.6.2 กระบวนการลดอุณหภูมิ และการละลายตัวอย่าง ..... 30

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.7 การสกัดเซลล์ (Dissociation method) ..... 31
3.8 การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ..... 32
3.8.1 Trypan blue ..... 32
3.8.2 Fluorescein diacetate and Propidium iodide ..... 33
3.8.3 in situ hybridization ..... 34
3.9 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation) ..... 34
3.9.1 การผลิตลูกปลาผู้รับวัยอ่อน (Production of recipient larvae) ..... 34
3.9.2 การย้อมสีเซลล์สืบพันธุ์ด้วย Fluorescence dye PKH26 และการ Microinjection ..... 35
3.10 การตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์ (Colonization) ..... 36
3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ ..... 37

**4 ผลการศึกษา**

4.1 อัณฑะและรังไข่ของปลาสวาย ..... 38
4.2 การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย ..... 40
4.3 การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย ..... 47
4.4 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง ..... 53
4.5 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง ..... 55

**5 อภิปรายผลการทดลอง** ..... 58

5.1 การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis) ..... 58
5.2 การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of ovary) ..... 61
5.3 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ..... 64
5.4 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia ..... 65

**6 สรุปและข้อเสนอแนะ** ..... 66

6.1 สรุป ..... 66
6.2 ข้อเสนอแนะ ..... 67

รายการอ้างอิง ..... 68

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**

ภาคผนวก.....72
ประวัติผู้เขียน.....75

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


2.1 ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่า Osmolality ของสาร Extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ ..... 8

2.2 ส่วนประกอบทางเคมี (mM) ของสาร Extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แช่เย็น ..... 9

2.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น ..... 12

2.4 การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่เย็น ..... 13

2.5 การเก็บรักษารังไข่แบบแช่เย็น ..... 15

2.6 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ..... 19

3.1 แผนการทดลองแบบ 3 x 3 Factorial design โดยปัจจัยที่ 1 คือ สาร Extender และปัจจัยที่ 2 คือ สาร Cryoprotectant ..... 25

3.2 แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่เย็นของปลาสวาย ..... 25

3.3 แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาพลังงานและโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่เย็นของปลาสวาย ..... 26

3.4 แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการละลายตัวอย่างของการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่เย็นของปลาสวาย ..... 26

3.5 ส่วนประกอบของสาร Extender ที่ใช้ในการทดลอง ..... 30

4.1 ผลของ Undifferentiation germ cells ที่ผ่านการสกัดเซลล์สืบพันธุ์เพื่อทดสอบหาระยะที่เหมาะสมต่อการเป็นปลาผู้ให้ ..... 40

4.2 ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่เย็นเพื่อทดสอบสภาวะของสาร Extender และ สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่เย็น ..... 44

4.3 ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่เย็นเพื่อทดสอบความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่เย็น ..... 45

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

4.4 ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบการเสริมแหล่งพลังงานและโปรตีนที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง ..... 46
4.5 ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายตัวอย่าง ..... 47
4.6 ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบสาร Extender และสารCryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง ..... 50
4.7 ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง ..... 51
4.8 ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบการเสริมแหล่งพลังงานและแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง ..... 52
4.9 ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายตัวอย่าง ..... 53
4.10 ผลของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งหลังการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ 28 วัน ..... 54
4.11 ผลของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งหลังการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ 28 วัน ..... 56

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญภาพ

**ภาพที่** **หน้า**


2.1 ปลาสวาย ..... 4
2.2 แผนภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา ..... 17
3.1 (A) ปลาสวายผู้ให้ (Donor fish), (B) รังไข่ และ(C) อัณฑะของปลาสวาย ..... 27
3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา ..... 28
3.3 ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin สำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา ..... 29
3.4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง กระบวนการลดอุณหภูมิ และการละลายตัวอย่างของการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง ..... 31
3.5 ขั้นตอนในการสกัดเซลล์สืบพันธุ์ ..... 32
3.6 ขั้นตอนการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยสี Trypan blue ..... 33
3.7 ขั้นตอนการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยสี Fluorescein diacetate และ Propidium iodide ..... 34
3.8 ขั้นตอนการย้อมสี Fluorescence dye PKH26 และ การ Microinjection ..... 35
3.9 เซลล์สืบพันธุ์หลังผ่านการย้อมสี Fluorescence dye PKH26 ..... 36
3.10 ลูกปลาสวายอายุ 4 วันหลังจากฟัก ที่ใช้เป็นปลาผู้รับในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ..... 36
4.1 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาอัณฑะของปลาสวาย (A-F) โดยแบ่งตามน้ำหนักของตัวปลาที่ 25 50 75 100 250 และ 500 กรัม ตามลำดับ ..... 39
4.2 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยารังไข่ของปลาสวาย (A-F) โดยแบ่งตาม น้ำหนักของตัวปลาที่ 25 50 75 100 250 และ 500 กรัม ตามลำดับ ..... 39
4.3 เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ (Bright field) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Trypan blue ..... 42
4.4 เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) ..... 43
4.5 เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และทำการทดสอบด้วยวิธี in situ hybridization ..... 43

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพที่** **หน้า**

4.6 เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ (Bright field) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Trypan blue ..... 49
4.7 เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Fluorescein Diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) ..... 49
4.8 เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และทำการทดสอบด้วยวิธี in situ hybridization ..... 50
4.9 เซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้เข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ (A-D) ..... 55
4.10 เซลล์ Oogonia ของปลาผู้ให้เข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ ..... 57

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

ปลาเป็นแหล่งอาหารโปรตีน ที่มีความสำคัญสำหรับมนุษย์ในปัจจุบัน ซึ่งแหล่งที่พบปลานั้นมีทั้งมาจากธรรมชาติและมาจากการเพาะเลี้ยง สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปลาที่มีสายพันธุ์ที่ดีโดยเฉพาะปลาที่มีลักษณะมีการเจริญเติบโตที่ดีและมีภูมิต้านทานโรคสูงจะเป็นที่ต้องการในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมาก ดังนั้นปลาที่มีการเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ได้รับการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดีขึ้นมาแล้ว แต่ควรมีเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้เก็บรักษาสายพันธุ์ปลาเหล่านี้ได้อย่างยั่งยืน ซึ่งในแหล่งน้ำธรรมชาติ ถือว่าเป็นแหล่งที่สำคัญที่มีความหลากหลายของพันธุกรรมปลา แต่สาเหตุอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงการใช้ประโยชน์ของแหล่งน้ำในวัตถุประสงค์อื่นๆ ตามแต่กิจกรรมของมนุษย์ ส่งผลให้ปลาในธรรมชาติลดน้อยลง และทำให้ปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติถูกคุกคามจนอาจเกิดการสูญพันธุ์ไปได้ในที่สุด ดังนั้นเทคโนโลยีในการเก็บรักษาสายพันธุ์ปลาที่ดีจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมปลา ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลา ได้แก่ การผสมเทียม (Artificial fertilization) เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนปลาและทำให้ปลาที่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้เองตามธรรมชาติสามารถที่จะเพาะพันธุ์ได้ การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Cryopreservation) ซึ่งมีความสำคัญและมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือตัวอ่อนของปลา โดยการแช่แข็งนั้นอาศัยหลักการทำงานของ (1) สาร Extender (2) สาร Cryoprotectant (3) อัตราการลดอุณหภูมิลงในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Freezing rate) และ (4) ขั้นตอนการละลายตัวอย่างหลังจากที่ผ่านการแช่แข็ง (Thawing process) ที่ทำงานร่วมกัน เพื่อป้องกันการเกิด ผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ที่จะเข้าไปทิ่มแทงเซลล์ในขณะที่เพิ่มและลดอุณหภูมิ เพื่อลดความเสียหายและการตายของเซลล์ และเทคนิคการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญ (Surrogate broodstock) โดยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation) โดยการศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาร่วมกับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เพื่อผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญ ซึ่งจะเป็นเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมของปลาทั้งในธรรมชาติและปลาจากการเพาะเลี้ยง

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเซลล์ น้ำเชื้อ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอื่นๆ แบบแช่แข็ง โดยมีการศึกษาการใช้สาร Extender และสาร Cryoprotectant หลากหลายชนิดยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Rani et al. (2016) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาสวาย พบว่า Hanks' balanced salt solution (HBSS) ทำงานร่วมกันกับ 15% Dimethyl acetamide (DMA) ให้ผลอัตราการรอดชีวิต (Viability) และอัตราการเคลื่อนที่ (Motility) ที่ดีที่สุดเท่ากับ 98% และ 89% ตามลำดับ และในการศึกษาการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of gonad) สามารถแบ่งออกเป็นการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis) เช่น จากการศึกษาของ Lee and Yoshizaki. (2016) ทำการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลา Manchurian trout (*Brachymyatax lenok*) ซึ่งพบว่า สาร Extender ที่จำเพาะกับปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ทำงานร่วมกับ 1.3 M Methanol พบอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 81% และในการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of ovary) จากการศึกษาของ Guan et al. (2008) ทำการเก็บรักษารังไข่แช่แข็งของปลา Zebrafish (*Danio rerio*) โดย KCl buffer ทำงานร่วมกันกับ 4 M Methanol พบอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับ 88% และในงานวิจัยฉบับนี้เลือกวิธีการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง ซึ่งจะสามารถเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของปลาได้อย่างหนึ่ง และวิธีการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งนั้นจะต้องทำงานร่วมกันกับเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation) ถึงจะสามารถทำให้เป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมของปลาได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งเทคนิคการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญโดยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cells) ที่ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมีการพัฒนามาจากเซลล์ที่เรียกว่า Primirdial germ cells (PGCs) ในกรณีที่ปลายังไม่สามารถแยกเพศได้ แต่ถ้าสามารถแยกเพศปลาได้แล้วในปลาเพศผู้ เรียกว่า Spermatogonia และในปลาเพศเมีย เรียกว่า Oogonia การศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปัจจุบันนั้นมีทั้งการใช้อวัยวะสืบพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็ง (Frozen gonad) และไม่ผ่านการแช่แข็ง (Fresh gonad) และในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้นจะทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับ (Recipient fish) วัยอ่อน ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Lee and Yoshizaki. (2016) ศึกษาในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) โดยใช้เซลล์ Spermatogonia ทั้งแบบที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง ปลูกถ่ายในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) วัยอ่อนเช่นเดียวกันแต่เป็นปลาที่เป็นหมัน (Triploid fish) พบว่าเซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ ที่อัตราการเข้าอาศัย (Colonization) 84% และ 89% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Lee et al., (2016b) ทำการศึกษาในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) โดยการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ทั้งเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งและเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งลงในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่เป็นหมันพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ ที่อัตราการเข้าอาศัย 72% และ 75% ตามลำดับ

ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย และศึกษาประสิทธิภาพของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาสวาย เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษา และสามารถนำไปใช้ในการอนุรักษ์ปลาในกลุ่ม Pangasiidae ที่กำลังถูกคุกคามและใกล้สูญพันธุ์ในปัจจุบัน และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำชนิดอื่นได้ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย

1.2.3 เพื่อศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้จากการสกัดเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะสืบพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง

## 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

เซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดได้จากอัณฑะและรังไข่ของปลาสวายที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งนั้น เมื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ใส่ในปลาผู้รับสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งของปลาในกลุ่ม Pangasiidae ที่ถูกคุกคามและใกล้จะสูญพันธุ์ได้

## 1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

*Pangasianodon hypophthalmus* (Striped catfish), Cryopreservation, Germ cells Transplantation

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 2
# ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ปลาสวาย (Striped catfish)

**ภาพที่ 2.1** ปลาสวาย ชื่อสามัญ Striped catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus*

### 2.1.1 การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน (Sauvage, 1878)

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Class : Actinopterygii

Order : Siluriformes

Family : Pangasiidae

Genus : *Pangasianodon*

Species : *Pangasianodon hypophthalmus*

### 2.1.2 ชีววิทยาของปลาสวาย

ปลาสวาย (Striped catfish) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pangasianodon hypophthalmus* (ภาพที่ 2.1) เป็นปลาน้ำจืดประเภทที่ไม่มีเกล็ดเช่นเดียวกับ ปลาเทโพ ปลาเทพา และปลาสังกะวาด ซึ่งสามารถพบได้ในแถบประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา เวียดนาม และประเทศไทย (ไทยเกษตรศาสตร์, 2013) ปลาสวายมีรูปร่างค่อนข้างเรียวยาว หัวค่อนข้างกว้าง แต่ไม่แบนมากนัก ปากอยู่ต่ำมีลักษณะกว้างทู่ มีตาขนาดเล็ก มีหนวด 2 คู่ คือ หนวดขากรรไกรบน 1 คู่ และหนวดขากรรไกรล่าง 1 คู่ ซึ่งหนวดคู่แรกมีความยาวกว่าหนวดคู่ที่ 2 เส้นข้างลำตัวมีลักษณะเป็น

เส้นสมบูรณ์ สัดส่วนของลำตัวที่สำคัญๆ คือ ความยาวสุดของลำตัวประมาณ 4 เท่าครึ่ง ของความยาวส่วนหัว ส่วนความยาวมาตรฐานลำตัวยาวประมาณเกือบ 4 เท่าครึ่งของความกว้างลำตัว ครีบหลังมีก้านแข็ง 1 ก้าน มีลักษณะฟันเลื่อย และมีก้านแขนง 6 ก้าน มีครีบไขมันขนาดเล็กอยู่ระหว่างครีบหลังและครีบหาง ครีบก้นมีก้านแข็ง 4 ก้าน และก้านแขนง 30-32 ก้าน ครีบหูมีก้านแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 6 ก้าน ลักษณะภายในที่สำคัญ มีซี่เหงือก 20 ซี่ มีฟันซี่เล็กๆ เรียงเป็นแถวบนขากรรไกรบนทั้ง 2 คู่ มีฟันบนเพดานเรียงเป็น 2 แถว ปลาสวายที่โตเต็มวัยจะมีลำตัวเป็นสีเทาดำบริเวณด้านหลังและมีสีขาวบริเวณตั้งแต่ด้านข้างของลำตัว จากส่วนหน้า ถึงโคนหางขนานไปกับเส้นข้างตัวทั้งด้านบนและด้านล่างทำให้ดูสวยงามมาก (กรมประมง, 2549)

**2.1.3 การแบ่งเพศปลาสวาย**

ความแตกต่างระหว่างเพศเมียและเพศผู้ของปลาสวายนั้นในตอนเป็นปลาวัยอ่อนจนถึงยังไม่โตเต็มวัยจะสังเกตได้ยาก แต่พอถึงฤดูผสมพันธุ์ปลาเพศเมียและเพศผู้จะสามารถแยกออกได้ชัดเจนจากลักษณะภายนอก ลักษณะของปลาเพศเมีย ส่วนท้องพองป่อง กลมนูน พื้นที่ของท้องนิ่มถึงนิ่มมาก ลักษณะของช่องเพศเป็นรูปวงรีใหญ่กว้างกว่าตัวผู้ และช่องเพศยังปวมพองเป่งและมีสีแดงเข้ม และในกรณีที่ปลาเพศเมียพร้อมมากๆ จะเห็นไข่สีเหลืองไหลออกมาจากช่องเพศและเมื่อจับโคนหางงอพับไข่ที่สุกแล้วจะไหลออกมาพร้อมให้ผสม และลักษณะของปลาเพศผู้ ส่วนท้องเรียบและไม่พองนูนเหมือนปลาตัวเมีย พื้นที่ท้องแข็ง ช่องเพศเป็นรูปวงรีเช่นเดียวกับตัวเมียแต่แคบและเล็กเรียวกว่า มีสีแดงอ่อน ซึ่งปลาตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์พร้อมแล้วนั้น เมื่อใช้มือบีบบริเวณช่องเพศเบาๆ จะเห็นน้ำเชื้อสีขาวข้นไหลออกมา

ในปัจจุบัน ปลาในกลุ่ม Pangasiidae ได้มีรายงานว่าสูญพันธุ์ไปแล้ว 1 สกุล คือ Cetopangasius (*Ceopangasius chaetobranchus*) (Roberts and Jumnonhthai, 1999) และในสกุล Pangsaius อีก 1 ชนิด คือ *Pangasius indicus* (Marck, 1876) และยังมีปลาในกลุ่มนี้อีกหลากหลายชนิดที่ขึ้นบัญชีเป็นปลาใกล้สูญพันธุ์ของ IUCN Red List of Threatened Species (IUCN Red List หรือ Red Data List) ได้แก่ ปลาบึก (Mekong Giant Catfish; *Pangasianodon gigas*) และ ปลาเทพา (Chao phraya giant catfish; *Pangasius sanitwongsei*) เป็นต้น (IUCN, 2017) และปลาในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปลาสวาย ที่คนในประเทศนิยมบริโภคและรู้จักกันเป็นอย่างดี และนอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อปลาในวงศ์ปลาสวายมีโอเมกา 3 เทียบเท่ากับปลาทะเลบางชนิด และมีปริมาณสูงถึง 2,570 มิลลิกรัม (milligram; mg) ต่อน้ำหนัก 100 กรัม (gram; g) (Carl and Ferraris, 2007)

## 2.2 การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Cryopreservation)

การเก็บรักษาอวัยวะหรือเซลล์โดยวิธีการแช่แข็งมีแนวโน้มที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สามารถช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ให้สามารถคงอยู่ต่อไปได้ในอนาคต (วีรพงศ์ และ สุบัณฑิต, 2559) การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง เป็นกระบวนการที่ใช้ในการเก็บรักษา ออแกเนลล์ เซลล์ เนื้อเยื่อ และโครงสร้างทางชีวภาพอื่นๆ เป็นการแช่แข็งตัวอย่างโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (Jang et al., 2017) การศึกษาการเก็บรักษาแบบแช่แข็งจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของปลา และเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ได้ ปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง มีการศึกษาอย่างมากมายทั้งในปลาน้ำจืด (Viveiros and Godinho, 2009 และ Psenicka et al., 2016) และปลาน้ำเค็ม (Suquet et al., 2000 และ Okutsu et al., 2006) แต่ส่วนใหญ่ได้มีการมุ่งเน้นศึกษาเฉพาะปลาในกลุ่มปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Ranna, 1995) แต่การศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาในกลุ่ม Pangasiidae

ซึ่งโดยทั่วไปปัจจัยที่ส่งผลให้การแช่แข็งอวัยวะสืบพันธุ์นั้นประสบความสำเร็จมีด้วยกัน 4 ปัจจัย ได้แก่ (1) สาร Extender (2) สาร Cryoprotectant (3) อัตราการลดลงของอุณหภูมิ (Freezing rate) เป็นการลงลดของอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและเหมาะสมจนสามารถเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวได้ (-196°C) โดยส่วนใหญ่อัตราการลดลงของอุณหภูมิสำหรับการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง เท่ากับ -1 องศาเซลเซียส/นาที (degree Celsius/minute; °C/min) (Lee et al., 2013; Lee et al., 2016; Lee and Yoshizaki, 2016 และ Psanicka et al., 2016) และ (4) การละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง (Thawing process) เป็นขั้นตอนที่ใช้สำหรับการตรวจสอบเซลล์หลังจากผ่านการแช่แข็งแล้วโดยแต่ละชนิดของตัวอย่าง หรือแต่ละชนิดของปลาจะมีการใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและการเลือกใช้ของงาน เช่น ในการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งของปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ใช้การละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10°C ระยะเวลาในการละลาย 1-2 นาที (Lee et al., 2013; Lee et al., 2016a และ Lee et al., 2016b) และปลา Manchurian trout (*Brachymyatax lenok*) ใช้การละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30°C ระยะเวลาในการละลาย 1 นาที (Lee and Yoshizaki, 2016) ส่วนในปลา Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) ใช้การละลายโดยการตั้งค่าอุณหภูมิโดยเครื่อง Water bath ที่อุณหภูมิ 38°C ระยะเวลาในการละลาย 1 นาที (Psanicka et al., 2016) เป็นต้น และในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลทำให้การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพ ซึ่งการแช่แข็งหรือการลดลงอย่างรวดเร็วของอุณหภูมินั้นมีผลอันตรายต่อเซลล์ เนื่องจากผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ที่เกิดขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางเคมีของเซลล์เหล่านั้น ซึ่งทำให้กลไกและโครงสร้างของเซลล์เกิดความเสียหายได้ (Karlsson and Toner, 1996) โดยผู้วิจัยใช้การเก็บรักษา

น้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลากลุ่มPangasiidae และการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งในปลา Rainbow Trout (*O. mykiss*) (Lee et al., 2013; Lee et al., 2016a และ Lee et al., 2016b) เป็นต้นแบบในการศึกษาครั้งนี้

**2.2.1 สาร Extender**

เป็นสารที่ช่วยให้เซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่างและทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตรอดในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งระยะยาว และสาร Extender เพียงอย่างเดียวยังสามารถใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งในระยะสั้น (ในตู้เย็น 4°C) ได้อีกด้วย (อนงคณ์ และ กฤษณ์, 2539) ในส่วนของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนั้น สาร Extender มีหน้าที่ช่วยในการเจือจางน้ำเชื้อและช่วยลดการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Sperm) ลดการใช้พลังงานของอสุจิ และสาร Extender ที่ใช้ควรมีค่า Osmolality และค่า pH ที่เหมาะสมใกล้เคียงกับค่า Osmolality และค่า pH ในเซลล์หรือในตัวปลา ยกตัวอย่าง เช่น ในกลุ่มปลาน้ำจืด จะมีค่า Osmolality เท่ากับ 280-300 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม (milliosmoles/kilogram; mOsm/kg), ในกลุ่มปลาน้ำเค็ม จะมีค่า Osmolality เท่ากับ 200-300 mOsm/kg (Wayman and Tiersch, 2000) และค่า pH ในเลือดปลาอยู่ที่ประมาณ 7.7-8.0 (เลือดคน อยู่ที่ประมาณ 7.35-7.45) เป็นต้น และสาร Extender ที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ได้แก่ 0.85% NaCl, Hanks' balanced salt solution (HBSS) และ Calcium-free Hanks' balanced salt solution (CF-HBSS) เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) และในการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งนั้นสาร Extender มีหน้าที่ช่วยให้เซลล์นั้นคงรูปไม่เปลี่ยนสภาพ และเมื่อทำงานร่วมกับสาร Cryoprotectant ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด และไม่ส่งผลทำให้เซลล์นั้นสูญเสียน้ำ (Hypertonic) หรือบวมน้ำ (Hypotonic) มากเกินไปเนื่องจากการเกิดสภาวะที่สารละลายภายในและภายนอกเซลล์นั้นมีความแตกต่างกันมาก และยังป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ที่จะเข้าไปทิ่มแทงเซลล์ในขณะที่ทำการเพิ่มและลดอุณหภูมิ เพื่อลดความเสียหายและการตายของเซลล์ (ตารางที่ 2.2)

**2.2.2 สาร Cryoprotectant**

เป็นสารที่ช่วยในการป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ในระหว่างการลดลงของอุณหภูมิยกตัวอย่างเช่น Glycerol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น ส่วนใหญ่แม้ว่าสาร Cryoprotectant จะช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง แต่ในทางตรงกันข้ามสาร Cryoprotectant นั้นก็สามารถเป็นพิษต่อเซลล์ได้ด้วยเช่นกัน และการเลือกใช้สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสม และเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ของปลาชนิดนั้นๆ ได้มาจากการทดลอง วิจัย และศึกษาจากเอกสารทางวิชาการ

สาร Cryoprotectant มีหน้าที่ช่วยในการป้องกันเซลล์จากการลดลงของอุณหภูมิ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์มีผลกระทบต่อความดันไอ (Vapor pressure) ของเหลวหรือทำให้แรงดันไอเปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นเหตุให้จุดเยือกแข็ง (Freezing

point) ลดต่ำลงและคุณสมบัติในข้อนี้สำคัญมากในการออกฤทธิ์ของสารเคมี เพราะโดยปกติแล้วตัวทำละลายในธรรมชาติ คือ น้ำ ที่มีแรงดัน 1 บรรยากาศ และน้ำจะแข็งตัวที่อุณหภูมิ 0ºC อย่างไรก็ตามในธรรมชาติของเหลวในร่างกาย และในเซลล์นั้นมีจุดเยือกแข็งที่ต่ำกว่าน้ำ และถ้ามีการเติมสาร Cryoprotectant เข้าไปยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งลดต่ำลงไปอีก ทำให้ของเหลวนั้นเย็นจัดก่อนที่จะแข็งหรือก่อนที่จะเกิดเกล็ดน้ำแข็ง และคุณสมบัติสุดท้ายของสาร Cryoprotectant จะช่วยในการเปลี่ยนแรงดัน Osmotic ของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากหรือน้อยหรือไม่ได้เลย โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลวที่ผ่านมานั้นจะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ (กฤษณ์, 2536)

**ตารางที่ 2.1** ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่า Osmolality ของ สาร Extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ

| ส่วนประกอบสารเคมี | ชนิดของสาร Extender | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | HBSS | C-F HBSS | BCB | C-F HBSS-2 | 0.85% NaCl | HBSS (mM) | CF-HBSS (mM) |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.16 | - | - | - | - | 1.24 | - |
| NaCl | 8 | 8.89 | - | 8.21 | 8.5 | 136.89 | 136.89 |
| KCl | 0.4 | 0.44 | - | 0.44 | - | 5.37 | 5.37 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 | 0.22 | - | 0.22 | - | 0.81 | 0.81 |
| $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.12 | 0.13 | - | 0.13 | - | 0.45 | 0.45 |
| $KH_2PO_4$ | 0.06 | 0.07 | - | 0.07 | - | 0.44 | 0.44 |
| $NaHCO_3$ | 0.35 | 0.39 | - | 0.39 | - | 4.17 | 4.17 |
| Glucose | 1.00 | 1.11 | - | 1.11 | - | 5.55 | 5.55 |
| $KHCO_3$ | - | - | 12.50 | - | - | - | - |
| Sucrose | - | - | 85.50 | - | - | - | - |
| Glutathione | - | - | 3.00 | - | - | - | - |
| Osmolarity (mOsm/kg) | 286 | 320 | 560 | 294 | 282 | 233 | 258 |
| Reference | Mongkonpunya et al. (1995) | | | อนงคณ์ และ กฤษณ์ (2539) | | Mengumphan et al. (2010) Rani et al. (2016) | |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**2.2.2.1 สาร Cryoprotectant**

2.2.2.1.1 ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Permeating cryoprotectant) สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำการป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะที่ทำการแช่แข็ง และสารละลายที่อยู่ในประเภทนี้ควรจะเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยเพราะจะ

สามารถซึมหรือแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าและเร็วกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ตัวอย่างเช่น Glycerol, Methanol, Ethylene glycol (EG) และ 1,2 Propanediol เป็นต้น แต่สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียคือ เป็นพิษต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะ เช่น Dimethyl sulfoxide (DMSO) เมื่ออยู่กับเซลล์หรือเนื้อเยื่อในสภาวะอุณหภูมิห้อง จะเกิดความเป็นพิษทำลายเซลล์ เป็นต้น ดังนั้นจึงจะต้องใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม และยังต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนการลดลงของอุณหภูมิ (Equilibration time) และ ชนิดของสาร Extender ที่ทำงานรวมกันอีกด้วย

2.2.2.1.2 ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Nonpermeating cryoprotectant) สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารจำพวกซึมผ่านได้ และมีความเป็นพิษน้อย โดยส่วนมาจะเป็นสารที่ช่วยในการให้พลังงาน เป็นอาหารเสริมให้กับเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น Sucrose, Polymers, Polyvinylpyrrolidone (PVP) และ Proteins (Egg-yolk และ Skim milk) เป็นต้น

**ตารางที่ 2.2** ส่วนประกอบทางเคมี (mM) ของสาร Extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แช่แข็ง

| ส่วนประกอบสารเคมี | ชนิดของสาร Extender | | |
|---|---|---|---|
| | Rainbow Trout | | Siberian sturgeon |
| | Whole Testis | Whole Ovaries | Whole Gonad Tissue (g) |
| HEPES | 55.27 | | - |
| NaCl | 375.48 | | - |
| KCl | 7.28 | | - |
| $KH_2PO_4$ | 23.10 | | - |
| $Na_2HPO_4$ | 3.82 | | - |
| Sodium Pyruvate | 3.64 | | - |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 2.6 | | - |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1.4 | | - |
| Bovine serum albumin | - | | 6.67 |
| Glucose | - | | 12 |
| pH | 7.8 | | - |
| Reference | Lee et al. (2013) , Lee et al. (2016b) | | Psenicka et al. (2016) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**2.2.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of sperm)**

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (ตารางที่ 2.3) ในการศึกษานี้ใช้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาสวายและปลาในกลุ่ม Pangasiidae เป็นต้นแบบในการศึกษาครั้งนี้ ยกตัวอย่างเช่น จากการศึกษาของ Hambananda and Mongkonpunya (1996) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) โดยใช้สาร Extender คือ CF HBSS ทำงานร่วมกันกับ สาร Cryoprotectant คือ 8% DMSO พบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (Viability) และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ (Fertilization) สูงที่สุด และการศึกษาของ สมร และคณะ (2550) และ Ponchunchoovong and Plime. (2010) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) โดยใช้สาร Extender คือ 0.9% NaCl ทำงานร่วมกันกับ สาร Cryoprotectant คือ 12% DMSO ให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงที่สุด และทำงานร่วมกันกับ 10% DMSO+20% Dimethyl acetamide (DMA) ให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Motility) และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่สูงที่สุด และการศึกษาของ Rani et al. (2016) ใช้สาร Extender คือ HBSS และสาร Cryoprotectant คือ 15% DMA ให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ที่ดีที่สุด และในการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลาบึก (*P. gigas*) พบว่า HBSS ทำงานร่วมกันกับ 8% DMSO ให้ผลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดดีที่สุด (Mengumphan et al., 2010)

**2.2.4 การเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis and ovary)**

การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis) (ตารางที่ 2.4) สาร Extender คือ Phosphate buffered saline+0.5% Bovine serum albumin+50 mM D-Glucose ทำงานร่วมกันกับ สาร Cryoprotectant คือ 1.5 M Glycerol และ 3 M EG ในปลา Tench (*Tinca tinca*), 3 M DMSO ในปลา Goldfish (*Carassius auratus*) และ 1.5 M EG ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia สูงที่สุด (Linhartova et al., 2014; Marinovic et al., 2016 และ Psenicka et al., 2016) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) สาร Extender คือ Phosphate buffered saline+0.5% Bovine serum albumin+5.5 mM D-Glucose ทำงานร่วมกันกับ 1.3 M EG และ 1.8 M EG ให้ผลอัตราการรอดชีวิตดีที่สุด (Kobayashi et al., 2007 และ Yoshizaki et al., 2011) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) อีกเช่นกัน RT extender ทำงานร่วมกับ 1.3 M DMSO ให้ผลอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด (Lee et al., 2013 และ Lee et al., 2016a) และสาร Extender คือ RT extender ทำงานกับ 1.3 M Methanol ให้ผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) (Lee and Yoshizaki, 2016) และในปลา Tiger puffer (*Takifugu rubripe*) นั้น Leibovitz L-15 medium (L-15) ทำงานกับ 1.3 M DMSO ให้ผลอัตราการรอดชีวิตที่ดีที่สุด ในการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (Yoshikawa et al., 2018)

ในการศึกษาการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of ovary) (ตารางที่ 2.5) ในปลา Zebrafish (*Danio rerio*) สาร Extender คือ KCl buffer ทำงานกับ 4 M Methanol ให้ผลอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด (Guan et al., 2008) ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) นั้น Phosphate buffered saline+0.5% Bovine serum albumin+50 mM D-Glucose ทำงานร่วมกันกับ สาร Cryoprotectant คือ 1.5 M Ethylene glycol (EG) ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด (Psenicka et al., 2016) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) สาร Extender คือ RT extender ทำงานกับ 1 M DMSO ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia ของการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งได้ดีที่สุด (Lee et al., 2016b)

## 2.3 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation)

สิ่งมีชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นประกอบไปด้วยเซลล์พื้นฐาน 2 ชนิด คือ เซลล์ร่างกาย (Somatic cells) และเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cells) (Lacerda et al., 2013) ซึ่ง Primordial germ cells (PGCs) หรือเซลล์ต้นต้นก่อนการพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นบริเวณใดบริเวณหนึ่งของตัวอ่อน (Embryo) และเมื่อตัวอ่อนมีการเจริญเติบโต PGCs จะเคลื่อนที่ (Migration) ไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ที่ยังไม่พัฒนา (Genital ridges) แล้วมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ (Mature germ cells) ซึ่งถ้าเป็นเพศผู้จะพัฒนาไปเป็นอสุจิ (Sperm) และเพศเมียจะพัฒนาไปเป็นไข่ (Egg) ดังนั้นการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation) เป็นวิธีการปลูกถ่ายเซลล์จากปลาชนิดหนึ่งไปยังปลาอีกชนิดหนึ่งที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน โดยการใช้ PGCs ของปลาผู้ให้ (Donor fish) ปลูกถ่ายใส่ในปลาผู้รับ (Recipient fish) โดยมีการคัดเลือก PGCs จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ทำการปลูกถ่ายใส่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Peritoneal cavities) ของปลาผู้รับ ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่าการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญ (Surrogate broodstock) เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์มีการนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านชีววิทยา และการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์รวมไปถึงการศึกษาด้านกระบวนการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ จึงมีการนำเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์มาเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ปลา และยังสามารถช่วยลงความเสี่ยงให้ปลาบางชนิดที่ใกล้สูญพันธุ์ได้โดยการสร้างปลาพ่อแม่พันธุ์อุ้มบุญ โดยการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้นเริ่มต้นทำครั้งแรกในไก่ โดยใช้ PGCs ที่เป็นเซลล์ Spermatogonia ฝากเข้าไปในตัวอ่อนของไก่ พบว่าไก่ตัวดังกล่าวเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์แล้วสามารถผลิตลูกออกมาเป็นไก่ตัวผู้ (Tajima et al., 1993) และต่อมาได้มีการศึกษาในหนู โดยใช้เซลล์ Spermatogonia มาทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Brinster and Zimmermann, 1994) และได้มีการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ มาใช้กับสัตว์ในกลุ่ม Lower Vertebrate โดยการใช้ทั้ง PGCs และ เซลล์ Spermatogonia ของปลาในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

**ตารางที่ 2.3** การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

| Species fish | Extender | Cryoprotectant | Freezing rate | Thawing temperature/ time | Viability (%) | Motility (%) | Fertilization (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Striped catfish (*P. sutchi*) | Calcium-free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS) | 8% Dimethyl sulphoxyde (DMSO) | -10°C/min | 70°C/1 min | 61.7±7.9 | - | 13.1±3.9 | อนงคณ์ และ กฤษณ์. (2539) |
| Mekong giant catfish (*P. gigas)* | Hanks' balanced salt solution (HBSS) | 8% Dimethyl sulphoxyde (DMSO) | -10°C/min | 40°C/1 min | 45.3±6.0 | - | - | Mengumphan et al. (2010) |
| Striped catfish (*P. hypophthalmus*) | 0.9% sodium chloride (NaCl) | 12% Dimethyl sulphoxyde (DMSO) | -10°C/min | 37°C/1 min | - | - | 40.77±1.65 | สมร และคณะ. (2550) |
| Striped catfish (*P.hypophthalmus*) | 0.9% sodium chloride (NaCl) | 10% Dimethyl sulphoxyde (DMSO) - 20% Dimethyl acetamide (DMA) | -10°C/min | 30°C/40 sec | 30.01±2.74 | 32.90±7.07 | 58.89±3.32 | Ponchunchoovong and Plime. (2010) |
| Striped catfish (*P. sutchi*) | Hanks' balanced salt solution (HBSS) | 15% Dimethyl acetamide (DMA) | -10°C/min | 37°C/50 sec | 96.19±4.92 | 88.53±2.01 | - | Rani et al. (2016) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.4** การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง

| Species fish | Extender | Cryoprotectant | Freezing rate | Thawing temperature / time | Viability (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tench (*T. tinca*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose | 1.5 M Glycerol | -1°C/min | 38°C/40 sec | 57.69±16.85 | Linhartova et al. (2014) |
| Tench (*T. tinca*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose | 3 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 38°C/2 min | 50 | Marinovic et al. (2016) |
| | | 3 M Dimethyl sulphoxyde (DMSO) | | | 55 | |
| Goldfish (*C. auratus*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose | 3 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 38°C/2 min | 60 | Marinovic et al. (2016) |
| | | 3 M Dimethyl sulphoxyde (DMSO) | | | 58 | |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 5.5 mM D-Glucose | 1.3 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 25°C/20 sec | 51.3±7.25 | Kobayashi et al. (2007) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 5.5 mM D-Glucose | 1.8 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 1°C/30 sec | 45.4 | Yoshizaki et al. (2011) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.4** การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (ต่อ)

| Species fish | Extender | Cryoprotectant | Freezing rate | Thawing temperature / time | Viability (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | RT extender (ตารางที่ 2.2) | 1.3 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) | -1°C/min | 10°C/1 min | 35.1±5.3 | Lee et al. (2013) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | RT extender (ตารางที่ 2.2) | 1.3 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) | -1°C/min | 10°C/1-2 min | 33.5±7.1 | Lee et al. (2016a) |
| Manchurian trout (*B. lenok*) | RT extender (ตารางที่ 2.2) | 1.3 M Methanol | -1°C/min | 30°C/1 min | 81.0 | Lee and Yoshizaki. (2016) |
| Siberian sturgeon (*A. baerii*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose | 1.5 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 38°C/1 min | 20.9±2.0 | Psenicka et al. (2016) |
| Tiger puffer (*T. rubripe*) | Leibovitz L-15 medium | 1.3 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) | -1°C/min | 20-22°C/1 min | 61.2±2.7 | Yoshikawa et al. (2018) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

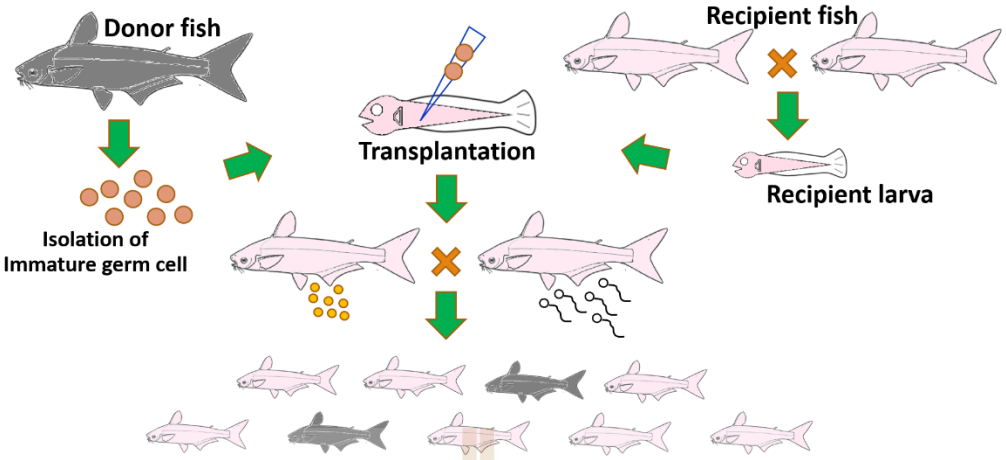
**ตารางที่ 2.5** การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็ง

| Species fish | Extender | Cryoprotectant | Freezing rate | Thawing temperature / time | Viability (%) | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zebrafish (*D. rerio*) | KCl buffer ( 55 mM KCl, 55 mM K acetate, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.4) | 4 M Methanol | 0.3°C/min | 26°C/5 min | 88.0±1.7 | Guan et al. (2008) |
| Siberian sturgeon (*A. baerii*) | Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose | 1.5 M Ethylene glycol (EG) | -1°C/min | 38°C/1 min | 15.0±2.1 | Psenicka et al. (2016) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | RT extender (ตารางที่ 2.2) | 1.0 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) | -1°C/min | 10°C/1 min | 72.9±6.2 | Lee et al. (2016b) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อีกทั้งยังมีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยใช้เซลล์ Spermatogonia ของสัตว์ผู้ให้ (Donor animal) ปลูกถ่ายเข้าไปในท่อสร้างตัวอสุจิ (Seminiferous tubules) ที่อยู่ในอัณฑะ (Testis) ของสัตว์ผู้รับ (Recipient animal) ที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งพบว่าเซลล์ Spermatogonia ของสัตว์ผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยและมีการแบ่งเซลล์ในตัวของสัตว์ผู้รับได้ (Brinster and Zimmermann, 1994) ซึ่งจากการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ดังที่กล่าวข้างต้นนี้มีความแตกต่างกับกระบวนการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาที่เซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้นั้นจะถูกปลูกถ่ายเข้าไปในช่องว่างกลางลำตัว ของลูกปลาผู้รับวัยอ่อน โดยที่เซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้มีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับและเซลล์สืบพันธุ์มีการเข้าอาศัย (Colonization) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับตามลำดับ ซึ่งในบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับที่เป็นปลาระยะวัยอ่อนนั้นระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ จึงสามารถเข้าไปมีชีวิตอยู่ได้ในปลาผู้รับวัยอ่อนและสามารถมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ได้ขึ้นอยู่กับเพศของปลาผู้รับ (Okutsu et al., 2006)

เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา ในช่วงระยะเริ่มต้นของอวัยวะสืบพันธุ์จะถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ร่างกาย และเซลล์ต้นกำเนิด (PGCs) ที่มีการพัฒนาขึ้นนอกอวัยวะสืบพันธุ์ต่อมา PGCs จะเคลื่อนที่โดยเท้าเทียม (Pseudopodia) ด้วยกระบวนการ Chemotaxis เพื่อเข้าไปสู่อวัยวะสืบพันธุ์ (Raz, 2004) และหลังจากที่ PGCs เคลื่อนที่เข้าไปสู่อวัยวะสืบพันธุ์แล้วนั้นจะถูกเซลล์ร่างกายเข้ามาล้อมรอบ PGCs และเริ่มทำการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน (Yoshizaki et al., 2002) เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เป็นการนำ PGCs ของปลาผู้ให้ปลูกถ่ายเข้าไปในช่องท้อง ของปลาผู้รับวัยอ่อนต่อมา PGCs ของปลาผู้ให้จะเคลื่อนที่ และเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับจากนั้นเมื่อ PGCs ของปลาผู้ให้เข้ามาอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์แล้ว เซลล์ร่างกายของปลาผู้รับจะเข้ามาจับล้อมรอบแล้วทำการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน PGCs ของปลาผู้ให้ทำให้ PGCs มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ขึ้นอยู่กับเพศของปลาผู้รับ โดยทั่วไปแล้วการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาที่มีสายพันธุ์หรือชนิดที่ใกล้เคียงกันจะมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง และเมื่อปลาผู้รับสามารถผลิตลูกปลาที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ (Donor-derived offspring) ได้ จะเรียกเทคนิคนี้ว่า เทคนิคการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญ (Surrogate broodstock technology) (ภาพที่ 2.2) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ได้กับปลาหลายชนิดที่มีข้อจำกัดในการเลี้ยงหรือในการผสมเทียม เช่น ปลาที่มีขนาดโตเต็มวัยใหญ่เกินไป หรือปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ เป็นต้น




**ภาพที่ 2.2** แผนภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา

การศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปัจจุบันนั้นมีทั้งการใช้อวัยวะสืบพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็ง (Frozen gonad) และไม่ผ่านการแช่แข็ง (Fresh gonad) ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ปลาผู้รับวัยอ่อน โดยจากการศึกษาโดยใช้เซลล์ Spermatogonia ของปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง เป็นปลาผู้ให้โดยปลูกถ่ายเข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) วัยอ่อนพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Kobayashi et al., 2007) ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) อีกเช่นเดียวกันทำการปลูกถ่ายปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ในรูปแบบของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง ปลูกถ่ายในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่เป็นปลาเป็นหมัน (Triploid fish) พบว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee et al., 2013) และจากการศึกษาในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) โดยใช้เซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งปลูกถ่ายในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) วัยอ่อนเช่นเดียวกันแต่เป็นปลาที่เป็นหมัน พบว่าเซลล์ Spermatogonial ของปลาผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee and Yoshizaki, 2016) และในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาน้ำจืดอย่างปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) พบว่า ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเข้าสู่ปลา Sterlet (*Acipenser ruthenus*) ที่เป็นหมันเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปลาผู้รับได้เช่นกัน (Psenicka et al., 2016) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง ปลูกถ่ายในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่เป็นปลาหมันพบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee et al., 2016b) จากตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาชนิดเดียวกันซึ่งเรียกว่า

Allogeneic transplantation และการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาต่างชนิดกันนั้นก็คือ Xenogeneic transplantation การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาต่างชนิดกัน ยกตัวอย่างเช่น การปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งของปลา Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) ปลูกถ่ายในปลา Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*) วัยอ่อน พบว่าเซลล์ของปลาผู้ให้สามารถเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Higuchi et al., 2011) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งในปลา Masu salmon (*Oncorhynchus mason*) พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Yoshizaki et al., 2011 และ Lee et al., 2016a) ตามลำดับ และการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ของปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) เข้าสู่ ปลา Grass puffer (*Takifugu alboplumbeus*) วัยอ่อนพบว่าทั้งเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้เช่นกัน (Yoshokawa et al., 2018)

ในงานวิจัยนี้จึงทำการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง โดยมีการพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่มีการกำหนดอัตราการลดลงของอุณหภูมิเท่ากับ -1 °C/min และมีการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์โดยการย้อมสี Trypan blue โดยที่ถ้าเซลล์ไม่มีชีวิตจะติดน้ำเงิน ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับ และทำการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ว่าสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้หรือไม่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.6** การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

| Species fish | | Cell type | Colonization (%) | | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| **Donor** | **Recipient** | | **Fresh** | **Frozen** | |
| Yellowtail (*S. quinqueradiata*) | Nibe croaker (*N. mitsukurii*) | Spermatogonia | 63 | - | Higuchi et al. (2011) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Newly hatched (32-34 dpf) of Rainbow trout (*O. mykiss*) | Spermatogonia | 12.5±4.8 | 20.6±11.9 | Kobayashi et al. (2007) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Triploid hatchling of Masu salmon (*O. mason)* | Spermatogonia | 43 | - | Yoshizaki et al. (2011) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Triploid hatchling of Rainbow trout (*O. mykiss*) | Spermatogonia | - | 80 | Lee et al. (2013) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Diploid hatchling of Masu salmon (*O. mason)* | Spermatogonia | - | 68.5±8.1 | Lee et al. (2016a) |
| Manchurian trout (*B. lenok*) | Triploid hatchling of Manchurian trout (*B. lenok*) | Spermatogonia | 89.0±5.5 | 84.1±7.4 | Lee and Yoshizaki. (2016) |
| Siberian sturgeon (*A. baerii*) | Triploid hatchling of Sterlet (*A. ruthenus*) | Spermatogonia | 55 | 65 | Psenicka et al. (2016) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 2.6** การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (ต่อ)

| Species fish | | Cell type | Colonization (%) | | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| **Donor** | **Recipient** | | **Fresh** | **Frozen** | |
| Tiger puffer (*T. rubripe*) | Diploid and triploid hatchlings of Grass puffer (*T. alboplumbeus*) | Spermatogonia | 39.1±6.6 | 38.9±5.4 | Yoshikawa et al. (2018) |
| Siberian sturgeon (*A. baerii*) | Triploid hatchling of Sterlet (*A. ruthenus)* | Oogonia | 70 | 55 | Psenicka et al. (2016) |
| Rainbow trout (*O. mykiss*) | Triploid hatchling of Rainbow trout (*O. mykiss*) | Oogonia | 75 | 72 | Lee et al. (2016b) |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ) อาคารเครื่องมือ 10 และ 14 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

### 3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงปลา

- เครื่องชั่งขนาด 15 กิโลกรัม (kilogram; kg)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- กระชังเนื้ออวนขนาด 2 x 2 5 x 5 และ 7 x 15 เมตร (mater; m.)
- ถังไฟเบอร์ขนาด 200 และ 500 ลิตร (liter; L)
- บ่อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 m.
- หัวทรายและสายยางให้อากาศ
- ปั๊มลม LP100 สำหรับให้อากาศ
- อ่างน้ำควบคุมความเย็น (Cooling Bath)
- สวิงตักปลา
- กะละมังและถังน้ำ
- ถุงมือและผ้า
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร (milliliter; ml)
- เข็มฉีดยาขนาด G24 ยาว 0.5 นิ้ว (inches; “)
- โกร่งแก้วบดยา
- น้ำกลั่น
- น้ำเกลือ 0.9% (0.9% Sodium chloride)
- ต่อมใต้สมอง
- ฮิวเมนโครริโอนิคโกนาโดโทรปิน (Human Chorionic Gonadotropin; HCG)
- 10% น้ำมันกานพลู (Clove oil)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**3.2.2** อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological sections)

- ตะกร้าใส่ตัวอย่าง (Tissue cassette)
- หลอดทดลองขนาด 1.5 และ 15 ml
- ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
- ถุงมือ
- โถพลาสติกย้อมสไลด์ (Plastic staining jar)
- สไสด์และกระจกปิดสไลด์
- ใบมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ
- เครื่องหล่อแบบชิ้นเนื้อ (Embedding)
- เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome)
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound microscope)
- บลูอิง (Bouin)
- แอททานอล (Ethanol)
- ไซรีน (Xylene)
- บิวทานอล (Butanol)
- พาราฟิน (Paraffin)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซารีน (Phosphate Buffered Saline; PBS)
- 10% สารละลายฮีมาทอร์คซิลิน (Hematoxylin solution)
- สารละลายอีโอซิน (Eosin solution)
- น้ำกลั่น

**3.2.3 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง**

- ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 24 หลุมจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (24 well plate)
- ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 25 100 250 500 และ 1,000 ml
- ถังน้ำ ถุงมือ และผ้า
- ไม้บรรทัด
- ไบเซลล์ความคุมความเย็น (Bicell freezing container)
- หลอดสำหรับแช่แข็ง (Cryotube) ขนาด 1.8 ml
- หลอดทดลองขนาด 1.5 15 และ 50 ml

- ตัวกรองขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร (micrometer; µm)
- ช้อนตักสาร
- กระบอกตวงขนาด 100 250 และ 500 ml
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลวและอุปกรณ์
- ตู้ -80°C
- 10% น้ำมันกานพลู (Clove oil)
- สาร Extender (ตารางที่ 3.2)
- สาร Cryoprotectant (ตารางที่ 3.1 และ 3.3)

**3.2.4** อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดเซลล์และตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์

- 24 well plate
- หลอดทดลองขนาด 1.5 และ 15 ml
- กระจกนาฬิกา
- กรรไกรปีกผีเสื้อ
- ปากคีบปลายแหลม
- กล่องโฟม
- เทอร์โมมิเตอร์
- ผ้ากรองขนาด 50 µm
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)
- เครื่องเขย่าสารแบบวงกลม (Orbital shaker)
- กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ พร้อมกล้องดิจิตอลบันทึกภาพ (Uplight fluorescent microscope with digital camera)
- สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometer)
- สารละลายไรโบเวียน เอล-15 (Leibovitz's L-15 medium; L-15)
- 0.4% คลอลาจิเนสเอช (Collagenase H)
- 0.03% ดิสเปสทู (Dispase II)
- 10% ฟีทอลโบเวียนซีรัม (Fetal bovine serum; FBS)
- 900 Unit/milliliter (U/ml) ดีเอ็นเอสวัน (DNase I)
- 0.4% สารละลายไทแปนบลู (Trypan blue solution)
- ฟลูออเรสซินไออะซิเตรด (Fluorescein diacetate; FDA)
- โพรพิเดียมไอโอดาย (Propidium iodide; PI)
- ฟลูออเรสเซนต์ดาย พีเคเอช 26 (Fluorescence dye PKH26)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**3.2.5** อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์

- บีกเกอร์ขนาด 250 ml
- กะละมังและผ้า
- หลอดแก้ว (Glass capillary) ขนาด 1 x 90 มิลลิเมตร (millimeter; mm)
- เครื่องดึงเข็ม (Needle puller)
- เครื่องฝนเข็ม (Needle grinder)
- เครื่องจุลหัตถาการ และเข็มฉีดขนาดเล็กพิเศษ (Microinjector set)
- กล่องจุลทรรศน์สเตอริโอ

## 3.3 แผนการทดลอง

### 3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสาร Extender และสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 3 Factorial design โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สาร Extender 3 ชนิดประกอบไปด้วย Calcium-free Hank's balanced salt solution (CF-HBSS) (Mongkonpunya and Chairak., 1995), Rainbow trout extender (RT) (Lee et al., 2013) และ Leibovitz's L-15 medium (L-15) และสาร Cryoprotectant 3 ชนิดได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethylene glycol (EG) และ Propylene glycol (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 โมลาร์ (Molar; M) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มี 9 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (Treatment combination) (ตารางที่ 3.1)

### 3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย

นำสาร Extender ที่ดีที่สุด 1 ชนิด และสาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุด 2 ชนิดจากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร Cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งที่ระดับความเข้มข้น 1.0 1.3 และ 1.6 โมลาร์ ดังนั้นในการทดลองนี้มี 6 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (ตารางที่ 3.2)

### 3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารให้พลังงานและโปรตีนต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งในปลาสวาย

นำสาร Extender ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 และสาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 มาทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเสริมพลังงานและโปรตีนต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย ดังนั้นในการทดลองนี้มี 6 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (ตารางที่ 3.3)

**ตารางที่ 3.1** แผนการทดลองแบบ 3 x 3 Factorial design โดย ปัจจัยที่ 1 คือ สาร Extender และ ปัจจัยที่ 2 คือ สาร Cryoprotectant

| Treatment | Extender | Cryoprotectant |
|---|---|---|
| 1 | CF-HBSS | DMSO |
| 2 | CF-HBSS | EG |
| 3 | CF-HBSS | PG |
| 4 | RT | DMSO |
| 5 | RT | EG |
| 6 | RT | PG |
| 7 | L-15 | DMSO |
| 8 | L-15 | EG |
| 9 | L-15 | PG |

**ตารางที่ 3.2** แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่เย็นของปลาสวาย

| Treatment | Extender | Cryoprotectant |
|---|---|---|
| 1 | A | 1.0 M B |
| 2 | A | 1.3 M B |
| 3 | A | 1.6 M B |
| 4 | A | 1.0 M C |
| 5 | A | 1.3 M C |
| 6 | A | 1.6 M C |

***หมายเหตุ** A = สาร Extender ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1

B = สาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุดอันดับที่ 1 จากการทดลองที่ 1

C = สาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุดอันดับที่ 2 จากการทดลองที่ 1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.3** แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาพลังงานและโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่เข็งของปลาสวาย

| Treatment | Sugar | Protein |
|---|---|---|
| 1 | 0.1 M Glucose | 10% Egg yolk |
| 2 | 0.2 M Glucose | 10% Egg yolk |
| 3 | 0.3 M Glucose | 10% Egg yolk |
| 4 | 0.1 M Glucose | 1.5% BSA* |
| 5 | 0.2 M Glucose | 1.5% BSA |
| 6 | 0.3 M Glucose | 1.5% BSA |

***หมายเหตุ** BSA = Bovine serum albumin (BSA)

### 3.3.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการละลายตัวอย่างในการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง

นำสาร Extender ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 สาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 และเสริมด้วยแหล่งพลังงานและแหล่งโปรตีนที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 3 มาทำการศึกษาการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายตัวอย่างที่ 10 และ 28°C และระยะเวลาในการละลายตัวอย่างที่ 4 8 และ 12 นาที เพื่อศึกษาขั้นตอนการละลายตัวอย่างที่ดีที่สุดต่อการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย ดังนั้นในการทดลองนี้มี 6 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (ตารางที่ 3.4)

**ตารางที่ 3.4** แผนการทดลองทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการละลายตัวอย่างของการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย

| Treatment | Temperature | Time |
|---|---|---|
| 1 | 10°C | 4 min |
| 2 | 10°C | 8 min |
| 3 | 10°C | 12 min |
| 4 | 28°C | 4 min |
| 5 | 28°C | 8 min |
| 6 | 28°C | 12 min |

## 3.4 ปลาที่ใช้ในการทดลอง

ปลาสวาย (Striped catfish) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus* ที่เลี้ยง ณ ฟาร์มประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ปลาสวายระยะวัยรุ่น (Juvenile stage) ทั้งเพศผู้และเพศเมียขนาด 300 กรัมต่อตัว (gram/fish; g/fish) เป็นปลาผู้ให้ (Donor fish) (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเลี้ยงในกระชังลอยน้ำขนาด 2 x 2 m. จากนั้นทำการเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ ซึ่งอัณฑะของปลาสวายมีน้ำหนัก 0.0501±0.0220 g และมีค่าดัชนีความสัมพันธ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic index; GSI) มีค่าเท่ากับ 0.0219±0.0028% และรังไข่ของปลาสวายมีน้ำหนัก 0.7020±0.0.3400g และ GSI มีค่าเท่ากับ 0.1526±0.0407% หลังจากนี้พักตัวอย่างในสารละลาย L-15 (Leibovitz's L-15 Medium, Gibco™, Carlsbad, CA, US) เพื่อเตรียมเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง

**ภาพที่ 3.1** (A) ปลาสวายผู้ให้ (Donor fish), (B) รังไข่ และ (C) อัณฑะของปลาสวาย

## 3.5 การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological sections)

### 3.5.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

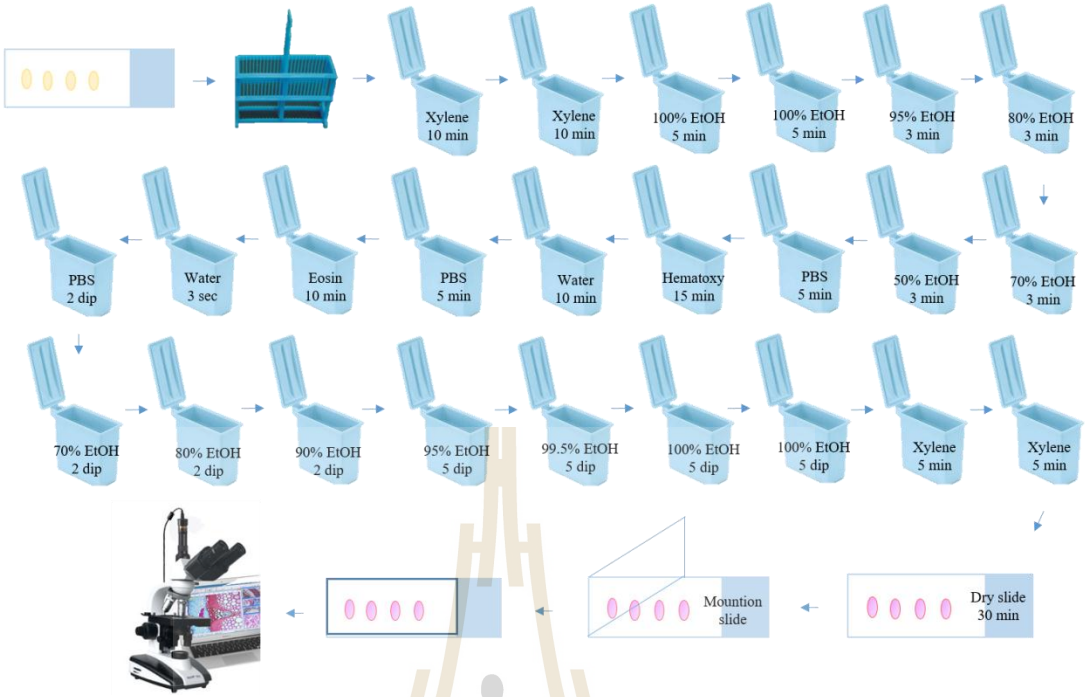
การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธีการตัดตัวอย่างของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งแบ่งตามเพศของปลาสวายผู้ให้ มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร (centimeters; cm.) แล้วนำเข้าสู่กระบวนการคงสภาพตัวอย่าง (Fixation) ด้วยสารละลาย Bouin เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง (hour; hr) (ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวอย่าง) จากนั้นเปลี่ยนเป็นสารละลาย 80% Ethanol (EtOH) และเก็บไว้ที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (degree Celsius; °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในตะกร้าสำหรับเตรียมเนื้อเยื่อ (Tissue cassette) ซึ่งในกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ มีการนำน้ำออกจากตัวอย่าง และล้าง

ตัวอย่างเพื่อนำ Paraffin เข้าไปแทนที่ จากนั้นทำการหล่อตัวอย่างด้วยเครื่องหล่อแบบชิ้นเนื้อ (Embedding) และตัดตัวอย่างด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) โดยทำการตัดตัวอย่างมีความหนาขนาด 0.5 μm วางลงบนแผ่นสไลด์เพื่อเตรียมเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไป (ภาพที่ 3.2)

**ภาพที่ 3.2** ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

### 3.5.2 การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin

เป็นการนำตัวอย่างที่อยู่บนแผ่นสไลด์มาทำการดึงเอา Paraffin ออกจากตัวอย่างด้วยสารละลาย Xylene จากนั้นทำการดึงน้ำเข้ามาสู่ตัวอย่างด้วย EtOH ที่ความเข้มข้นลดต่ำลงเรื่อยๆ เพื่อเป็นการเตรียมเข้าสู่กระบวนการย้อมสี จากนั้นย้อมสีด้วย 10% Hematoxylin (ทำให้ติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส) แล้วทำการล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำและล้างตัวอย่างอีกครั้งด้วยสาร Phosphate Buffered Saline (PBS) จากนั้นย้อมต่อด้วยสี Eosin (ซึ่งจะทำให้ติดสีแดงบริเวณไซโตพลาสซึม) แล้วทำการล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำและ PBS เช่นเดียวกัน ต่อมาเข้าสู่กระบวนการทำให้ตัวอย่างแห้งเพื่อทำการเก็บตัวอย่างแบบถาวรด้วยการ Mounting และสังเกตุด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 3.3)




**ภาพที่ 3.3** ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin สำหรับการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

## 3.6 กระบวนการแช่แข็ง

### 3.6.1 สาร Cryomedium

การศึกษาผลการแช่แข็งของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสวายมี 2 ปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ปัจจัยที่ 1 สาร Extender ได้แก่ CF-HBSS, RT และ L-15 (ตารางที่ 3.2) และปัจจัยที่ 2 สาร Cryoprotectant ได้แก่ DMSO, EG และ PG ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสวายแบบแช่แข็ง โดยจะเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสวายจากปลาที่มีน้ำหนัก 300 g/fish โดยทำการแช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.8 ml ซึ่งใส่สาร Cryomedium 500 ไมโครลิตร (microliter; µl) ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ 0.2 g จากนั้นนำอวัยวะสืบพันธุ์และสาร Cryomedium ใส่ลงใน Cryotube แล้วทำการ Incubate ในน้ำแข็ง (0°C) เป็นระยะเวลา 60 นาที (minute; min) (ภาพที่ 3.4)

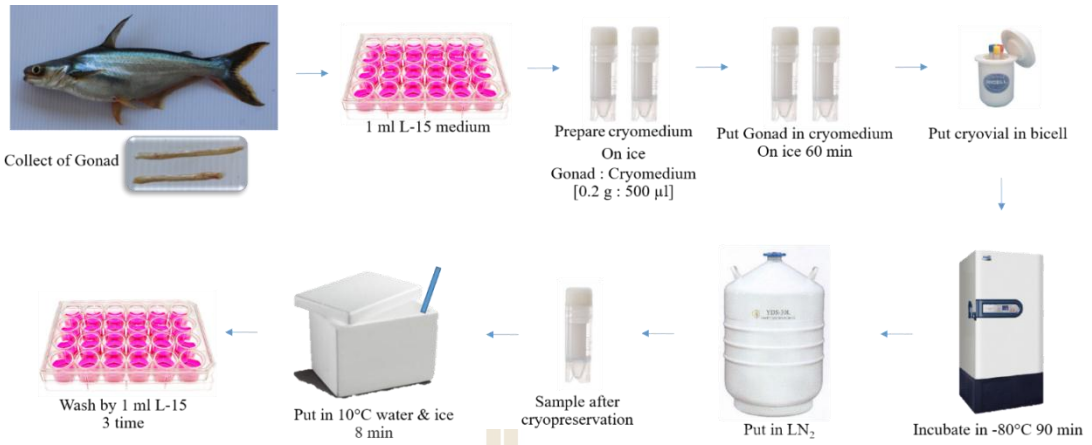
**ตารางที่ 3.5** ส่วนประกอบของสาร Extender ที่ใช้ในการทดลอง

| ส่วนประกอบ | สาร Extender | | |
|---|---|---|---|
| | **CF-HBSS (mM)** | **RT (mM)** | **L-15*** |
| NaCl | 152.12 | 375.48 | - |
| KCl | 5.9 | 7.28 | - |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.89 | - | - |
| $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.48 | 3.82 | - |
| $KH_2PO_4$ | 0.51 | 23.10 | - |
| $NaHCO_3$ | 4.64 | - | - |
| Glucose | 6.16 | - | - |
| HEPES | - | 55.27 | - |
| Sodium Pyruvate | - | 3.64 | - |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | - | 2.6 | - |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | - | 1.4 | - |
| L-15 | - | - | 13.7 g |
| DI Water | - | - | 1 L |
| pH | 7.6 | 7.8 | 7.8 |
| อ้างอิง | Mongkonpunya and Chairak. (1995) | Lee et al. (2013) | - |

*ภาคผนวก

**3.6.2 กระบวนการลดอุณหภูมิ และการละลายตัวอย่าง (Freezing and thawing process)**

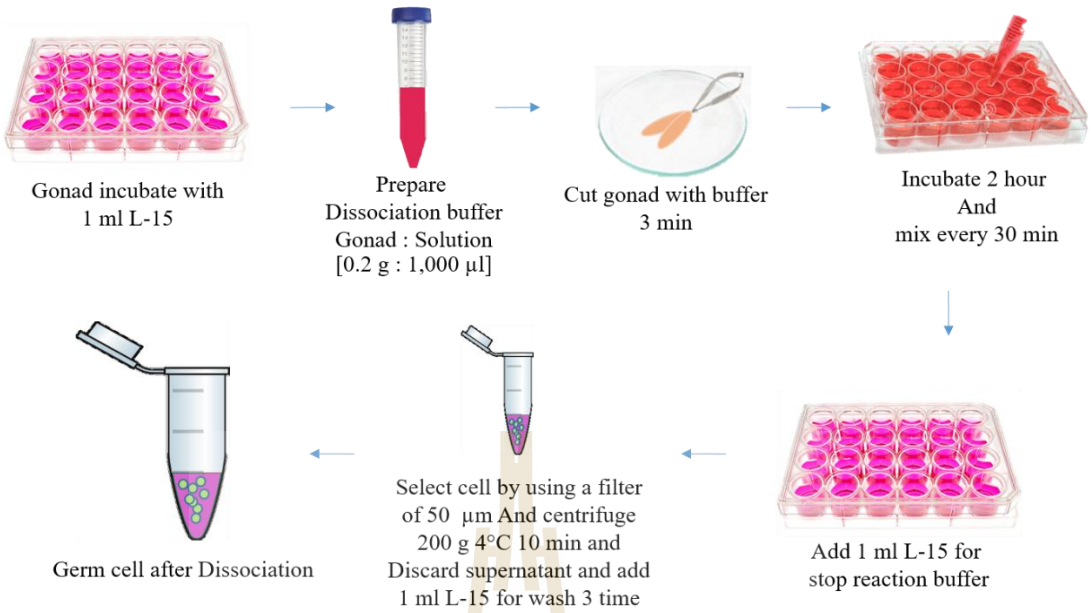
หลังจาก Incubate เป็นเวลา 60 นาที ทำการลดอุณหภูมิลงโดยมีอัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ -1°C/min ใช้ระยะเวลา 90 นาที โดยการนำ Cryotube ใส่ลงใน Bicell freezing container (Nihon Freezer, Tokyo, Japan) แล้ว Incubate ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จากนั้นนำ Cryotube ตัวอย่างใส่ลงใน Liquid nitrogen (-196°C) เก็บจนกว่าจะใช้งาน และหลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์โดยการนำตัวอย่างที่แช่แข็งมาทำการละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำอวัยวะสืบพันธุ์ที่ถูกแช่แข็งล้างด้วยสารละลาย L-15 เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างสาร Cryomedium ออกจากตัวอย่าง จากนั้นแช่อวัยวะสืบพันธุ์ไว้ในสารละลาย L-15 ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป (ภาพที่ 3.4)




**ภาพที่ 3.4** ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง กระบวนการลดอุณหภูมิ และการละลายตัวอย่างของการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็ง

## 3.7 การสกัดเซลล์ (Dissociation method)

การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์และการคัดเลือกเซลล์เพื่อนำไปปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยการนำอวัยวะสืบพันธุ์มาสกัดเซลล์ ซึ่งทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia โดยใช้การสกัดเซลล์จากวิธีการของ Morita et al. (2012) ซึ่งทั้งอัณฑะและรังไข่ของปลาสวายผู้ให้นั้นใช้ Dissociation enzyme คือ Collagenase H และ Dispase II ในการสกัดเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะสืบพันธุ์ โดยใช้ตัวอย่างอัณฑะและรังไข่น้ำหนัก 0.2 g/Dissociation enzyme 1 ml ซึ่งประกอบไปด้วย 0.4% Collagenase H (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.03% Dispase II (Sanko Junyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan), 10% Fetal bovine serum (FBS; Gibco Invitrogen Co.) และ 900 U/ml DNase I (Roche Diagnostics) ในสารละลาย L-15 (pH 7.8, Gibco Invitrogen Co., Grand Island NY, USA) จากนั้นตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ และ Incubate กับ Dissociation enzyme เพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 120 min โดยทำการผสมด้วย Pipet ทุก 30 นาที เพื่อให้ Dissociation enzyme ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างได้อย่างทั่วถึง จากนั้นกรองเซลล์โดยใช้ผ้ากรองขนาด 50 µm (Tokyo Screen Co., Ltd.) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้าง Dissociation enzyme ออกจากเซลล์ ด้วยสารละลาย L-15 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากล้างเซลล์รอบสุดท้ายพักเซลล์โดยใช้สารละลาย L-15 ที่มีส่วนผสมของ 10% FBS and 900 U/ml DNase I เพื่อพักเซลล์สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 3.5)



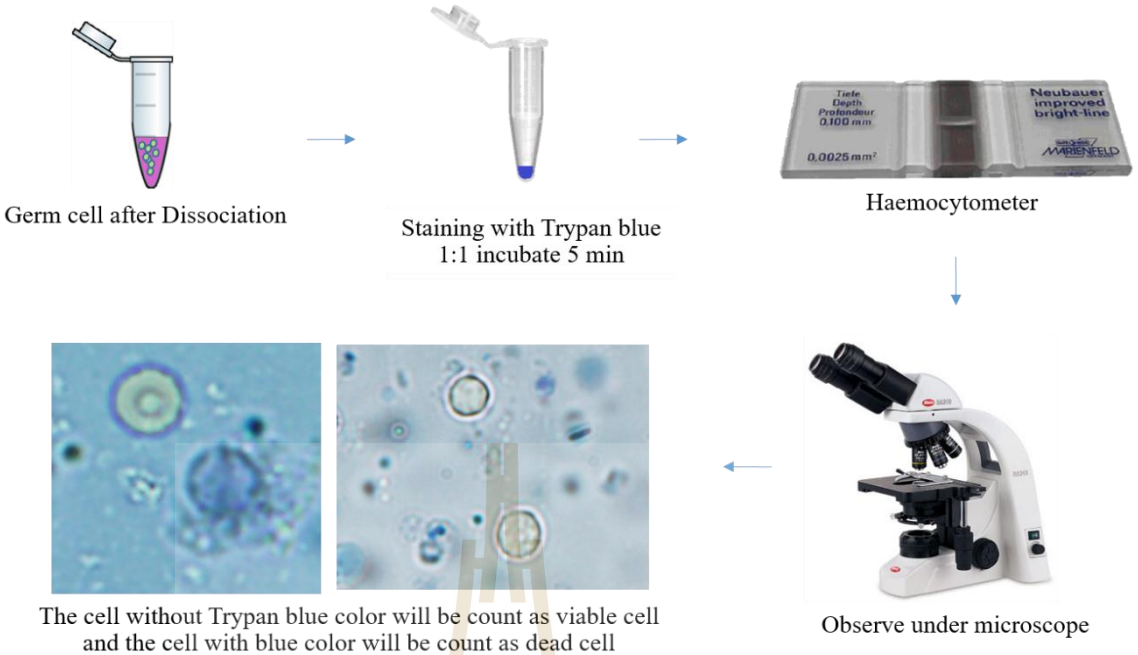

**ภาพที่ 3.5** ขั้นตอนในการสกัดเซลล์สืบพันธุ์

## 3.8 การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia

หลังผ่านการสกัดเซลล์สืบพันธุ์จากอัณฑะและรังไข่ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง โดยใช้ 0.4% Collagenase H และ 0.03% Dispase II แล้วทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์และคุณสมบัติของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

### 3.8.1 Trypan blue

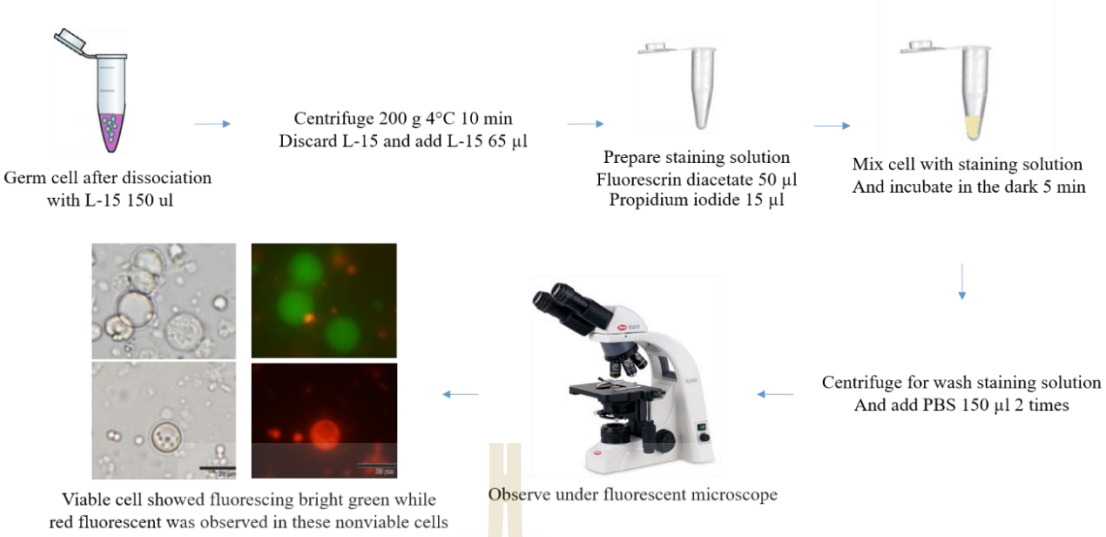
นำเซลล์ที่ผ่านการสกัดเซลล์ Incubate กับ 0.4% Trypan blue solution อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสังเกตุเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศ์โดยใช้ Haemocytometer ในการนับจำนวนเซลล์ โดยเลือกนับ 100 เซลล์ แยกเป็นเซลล์ที่ไม่ติดสีฟ้าของ Trypan blue (เซลล์มีชีวิต) และเซลล์ที่ติดสีฟ้าของ Trypan blue (เซลล์ตาย) (ภาพที่ 3.6)




**ภาพที่ 3.6** ขั้นตอนการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยสี Trypan blue

### 3.8.2 Fluorescein diacetate และ Propidium iodide

นำเซลล์ที่ผ่านการสกัดเซลล์ Incubate กับ สาร Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) ในที่มืดเป็นเวลา 5 min จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 xg อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสีของ FDA และ PI ด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) จำนวน 2 ครั้ง นำมาสังเกตุใต้กล้องจุลทรรศ์แบบฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence microscope) ถ้าเซลล์ติดสีเขียวของ FDA แสดงว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีแดงของ PI (ภาพที่ 3.7) การย้อมสีด้วย FDA และ PI เป็นการตรวจสอบเพิ่มเติมหลังจากที่ตรวจสอบด้วย การย้อม Trypan blue ว่าเซลล์ที่พบว่ารอดชีวิตนั้นเป็นเซลล์ที่รอดชีวิตจริง




**ภาพที่ 3.7** ขั้นตอนการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยสี Fluorescein diacetate และ Propidium iodide

### 3.8.3 in situ hybridization

นำเซลล์ที่ผ่านการแยกเซลล์มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของ *vasa* protein เพื่อต้องการทราบว่าเซลล์นั้นนอกจากมีชีวิตแล้ว เซลล์ยังมีคุณสมบัติสามารถเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สืบพันธุ์ โดยกระบวนการตรวจสอบคือ in situ hybridization (ISH) ซึ่งเป็นการนำ *vasa* probe จับกับ Undifferented germ cells ได้แก่ Primordial germ cells (PGCs), Spermatogonia หรือ Oogonia จากนั้นสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบว่าเซลล์ยังมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์สืบพันธุ์อยู่จะแสดงออกเป็นสีน้ำเงินส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือไม่มีคุณสมบัติดังกล่าวจะไม่ติดสี

## 3.9 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation)

### 3.9.1 การผลิตลูกปลาผู้รับวัยอ่อน (Production of recipient larvae)

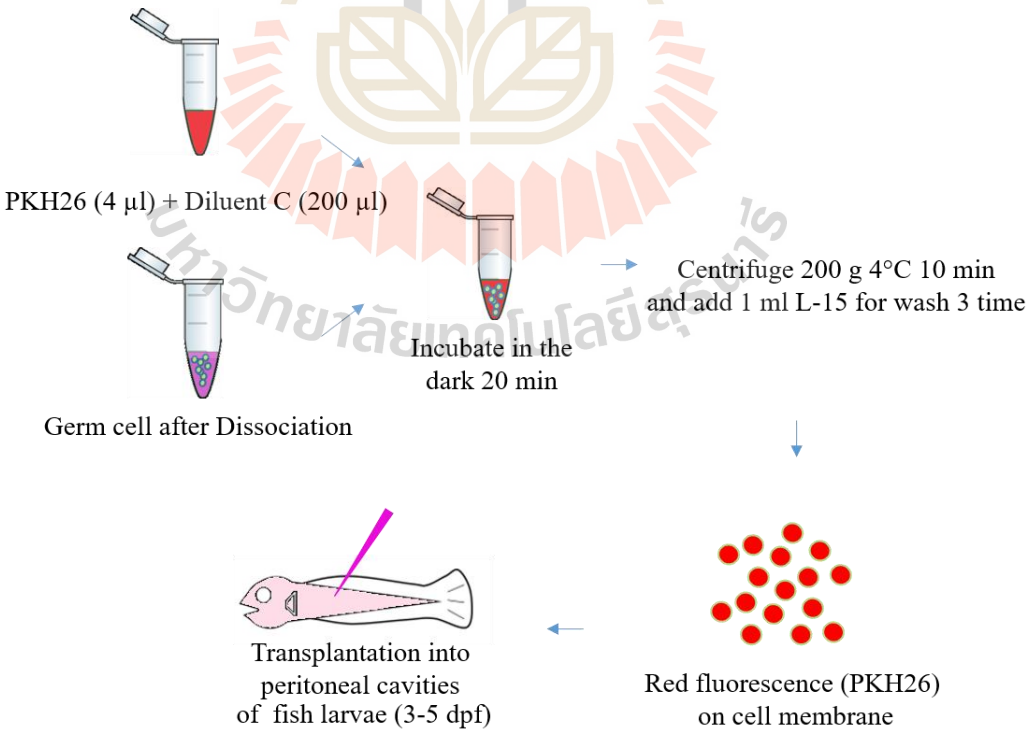
ปลาสวายในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลาที่เลี้ยง ณ ฟาร์มประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยที่พ่อแม่พันธุ์ปลาจะให้อาหารทางการค้า 28% โปรตีน และให้อาหาร 2 เวลา คือ 09.30 และ 16.30 นาฬิกาทุกวัน ที่อัตราการให้อาหาร 3% ต่อน้ำหนักตัวปลา โดยขั้นตอนในการผลิตลูกปลาผู้รับจะใช้ปลาพ่อแม่พันธุ์จำนวน 1 คู่ น้ำหนัก 2-4 kg โดยวิธีการฉีด Hormone เพื่อเป็นการผสมเทียมในปลาสวาย ซึ่งจะฉีด Hormone ในปลาสวายเพศเมีย จำนวน 2 เข็ม เข็มแรก ทำการฉีดโดยใช้อัตราส่วนต่อมใต้สมองของปลาสวาย (Fish's pituitary extract; PE) 2 โดส (Dose) และ Human chorionic gonadotropin (HCG) 200 IU/kg จากนั้น 12 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สอง โดยใช้อัตราส่วนเป็น 2

เท่าของเข็มแรก คือ PE 4 โดส และ HCG 400 IU/ kg หลังจากฉีดเข็มที่ 2 เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง ทำการรีดไข่จากปลาเพศเมียและรีดน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ผสมกันใส่ลงในถังเพาะปลาและรอลูกปลาแรกฟักภายในเวลา 24-36 ชั่วโมง

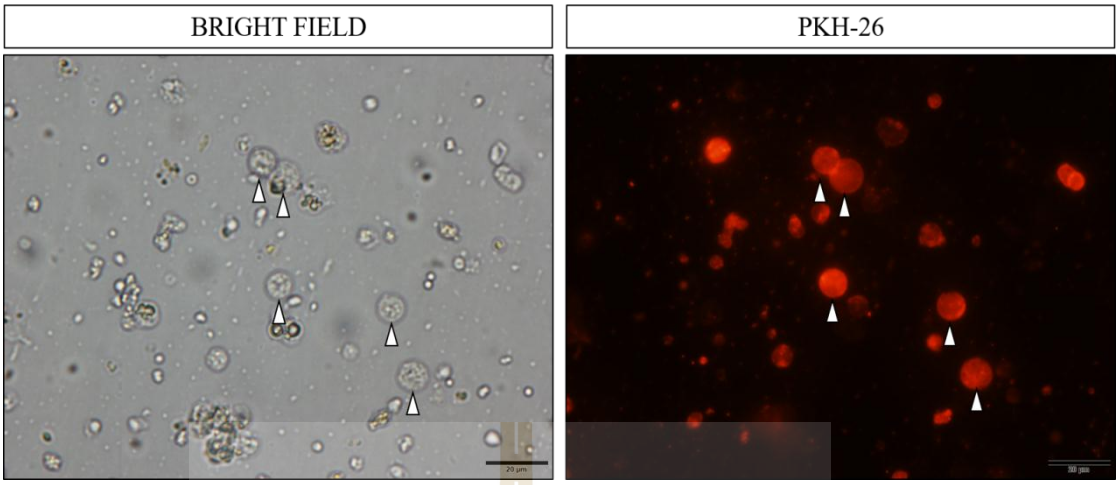
ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ลูกปลาสวายวัยอ่อนที่เป็นหมัน (Triploid larvae) เป็นปลาผู้รับ (Recipient fish) โดยวิธีการทำปลาให้เป็นหมันนั้น ทำการรีดน้ำเชื้อและรีดไข่ออกมาผสมเทียมแล้วก่อนนำไปใส่ถังเพาะฟักนำไข่ที่ได้รับการผสมไป Shock ที่อุณหภูมิ 7.5°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไข่ที่ผสมและผ่านการ Shock แล้วนั้นใส่ลงในถังเพาะฟักตามปกติซึ่งสำหรับปลาเป็นหมันจะใช้เวลาในการฟักเป็นตัว 36-48 ชั่วโมง และปลาที่จะใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จะใช้ปลาที่อายุ 3-5 วันหลังจากปลาฟักเป็นตัวแล้ว

### 3.9.2 การย้อมสีเซลล์สืบพันธุ์ด้วย Fluorescence dye PKH26 และ การ Microinjection

นำเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ทำการย้อมด้วยสี Fluorescence dye PKH26 (ภาพที่ 3.9) และทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Transplantation หรือ Microinjection) (ภาพที่ 3.8) เข้าสู่ลูกปลาสวายผู้รับวัยอ่อนที่อายุ 3-5 วันหลังจากที่ลูกปลาฟักเป็นตัวแล้ว (ภาพที่ 3.10) โดยใช้เครื่อง Microinjector ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ เข้าสู่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Peritoneal cavities)




**ภาพที่ 3.8** ขั้นตอนการย้อมสี Fluorescence dye PKH26 และ การ Microinjection




**ภาพที่ 3.9** เซลล์สืบพันธุ์หลังผ่านการย้อมสี Fluorescence dye PKH26

**ภาพที่ 3.10** ลูกปลาสวายอายุ 4 วันหลังจากฟัก ที่ใช้เป็นปลาผู้รับในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 3.10 การตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์ (Colonization)

หลังจากปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ปลาผู้รับเป็นระยะเวลา 28 วัน ทำการนำปลามาผ่าเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) เพื่อติดตามผลการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้กล้องจุลทรรศ์แบบฟลูออเรส-เซนต์ (Fluorescence microscope) ในการตรวจเช็คผลว่าพบเซลล์สืบพันธุ์ที่ถูกย้อมด้วย Fluorescence dye PKH26 (สีแดง) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับหรือไม่ เนื่องจากในเมื่อปลาอายุครบ 30 วัน เป็นระยะที่ PGCs เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณ Genital ridges เรียบร้อยและสามารถเก็บเส้น Genital ridges มาทำการตรวจสอบหาเซลล์ที่ทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับได้

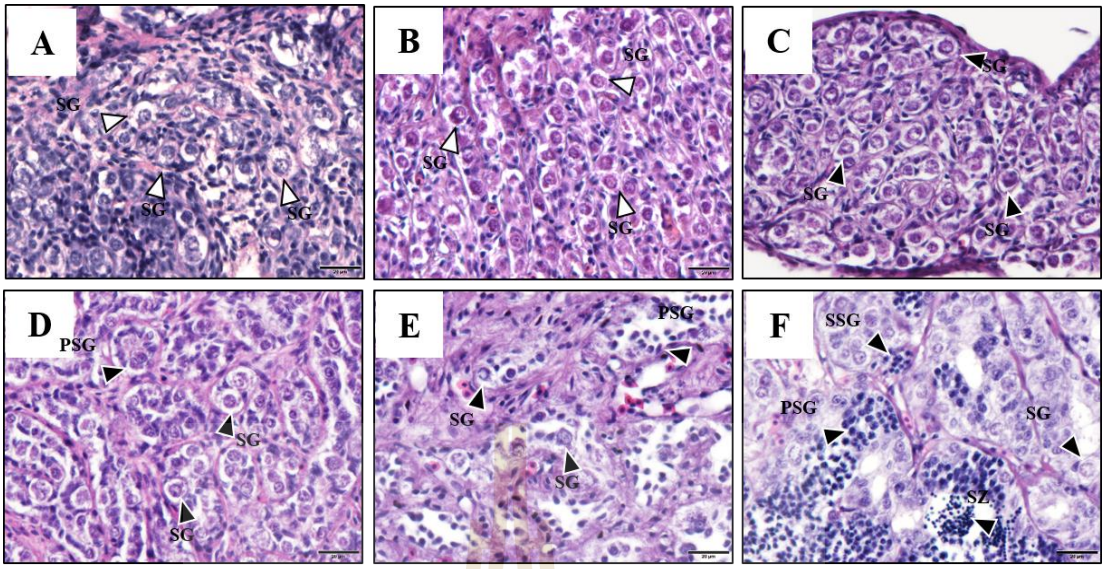
## 3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) ทั้งในรูปแบบของ one-way และ two-way analysis ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และ CRD (Completely Randomize Design) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Tukey's test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS statistics 20

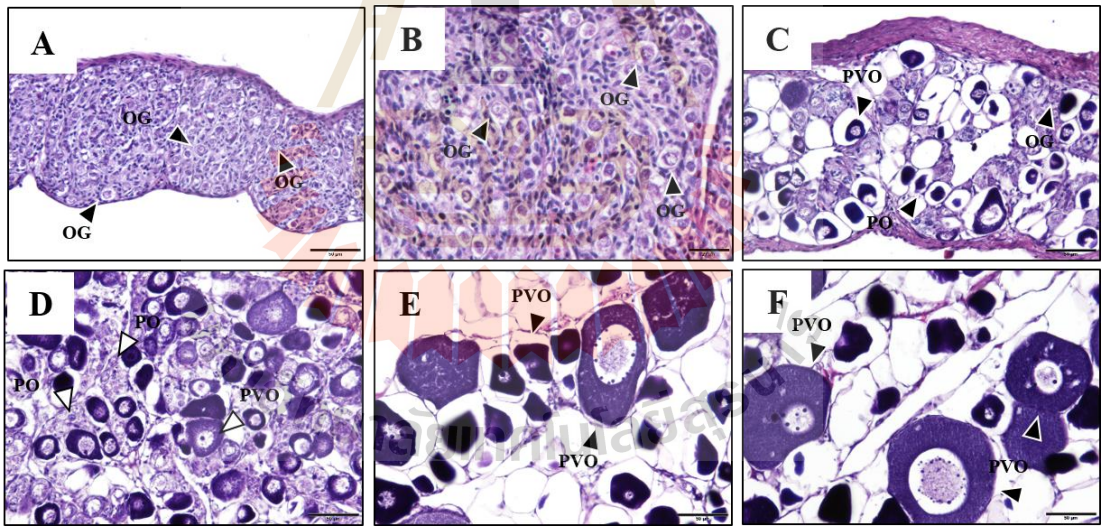
# บทที่ 4
# ผลการศึกษา

## 4.1 อัณฑะและรังไข่ของปลาสวาย

ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญประการหนึ่ง คือสัดส่วนของ Undifferentiated germ cells ได้แก่ Primordial germ cells, Spermatogonia หรือ Oogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ (Donor fish) โดยทำการศึกษาแบ่งเป็น 2 วิธีการศึกษา คือ การศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งอัณฑะและรังไข่ของปลาสวายผู้ให้ที่ระยะวัยรุ่น (Histological analysis) เพื่อทำให้ทราบถึงระยะที่เหมาะสมของปลาสวายผู้ให้ที่มีสัดส่วนของ Undifferentiated germ cells สูงที่สุด โดยมีการแบ่งตามน้ำหนักของตัวปลาตั้งแต่ 25 50 70 100 250 และ 500 กรัม (ภาพที่ 4.1 และภาพที่ 4.2) ซึ่งพบว่าในอัณฑะของปลาสวายประกอบไปด้วย Spermatogonia (SG) Primary spermatocyte (PSC) Secondary spermatocyte (SSC) และ Spermatozoa (SZ) และในรังไข่ของปลาสวายประกอบไปด้วย Oogonia (OG), Primary oocyte (PO) และ Previtellogenic oocyte (PVO) และจากผลการศึกษาอัณฑะและรังไข่ของปลาสวายในครั้งนี้ปลาสวายขนาด 50-100 กรัมในปลาเพศผู้ และ 50-75 กรัม ในปลาเพศเมีย นั้นพบจำนวน Undifferentiated germ cells สูงที่สุด และเมื่อทำการศึกษาการสกัดเซลล์สืบพันธุ์ (Dissociation) โดยแบ่งตามน้ำหนักของตัวปลาเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 50-100 300-500 และ 700-1,000 กรัม (ตารางที่ 4.1) พบว่า ที่น้ำหนักปลา 300-500 กรัมทั้งในปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย พบสัดส่วนของ Undifferentiated germ cells มากที่สุด เท่ากับ 19.37 และ 35.29% ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปลาที่มีขนาด 300-500 กรัม เป็นปลาในการเก็บรักษาอัณฑะและรังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis and ovary) และเป็นปลาสวายผู้ให้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation) เนื่องจากปลาในระยะดังกล่าวพบสัดส่วนของ Undifferentiated germ cells มากที่สุดหลังผ่านการสกัดอัณฑะและรังไข่




**ภาพที่ 4.1** ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของอัณฑะของปลาสวาย (A-F) โดยแบ่งตามน้ำหนักของตัวปลาที่ 25 50 75 100 250 และ 500 กรัม ตามลำดับ (Scale bars = 20 µm)




**ภาพที่ 4.2** ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่ของปลาสวาย (A-F) โดยแบ่งตาม น้ำหนักของตัวปลา ที่ 25 50 75 100 250 และ 500 กรัม ตามลำดับ (Scale bars = 50 µm)

**ตารางที่ 4.1** ผลของ Undifferentiated germ cells ที่ผ่านการสกัดเซลล์สืบพันธุ์เพื่อทดสอบหาระยะที่เหมาะสมต่อการเป็นปลาผู้ให้ (Mean)

| Gonad | Body weight (g) | Total cell/100 mg (cell) | Cell approximately 10 µm / 100 mg (cell) | Proportion of 10 µm cells/100 mg (%) |
|---|---|---|---|---|
| Testis | 50-100 | 752,000 | 132,000 | 17.55 |
| | 300-500 | 2,220,000 | 430,000 | 19.37 |
| | 700-1400 | 19,156,250 | 775,000 | 4.05 |
| Ovary | 50-100 | 668,000 | 88,000 | 13.17 |
| | 300-500 | 3,541,667 | 1,250,000 | 35.29 |
| | 700-1,000 | 4,803,572 | 417,572 | 8.69 |

## 4.2 การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย (Cryopreservation of testis in striped catfish)

ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาอัณฑะแช่แข็ง โดยทำการตรวจวัดผลโดยการย้อมสี Trypan blue เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ Spermatogonia ซึ่งลักษณะของเซลล์ Spermatogonia จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 µm การใช้สี Trypan blue ในการตรวจสอบนั้นพบว่าสีน้ำเงินของ Trypan blue จะซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงิน (ภาพที่ 4.3) นอกจากนี้ทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการใช้ Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีเขียวของ FDA ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีแดงของ PI (ภาพที่ 4.4) จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของ *vasa* protein ของเซลล์เพื่อตรวจสอบการเป็น Undifferentiated germ cell โดยวิธี in situ hybridization (ISH) ซึ่งเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น Undifferentiated germ cell ที่มีความสามารถในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ได้จะติดสีน้ำเงินของ *vasa* probe (ภาพที่ 4.5)

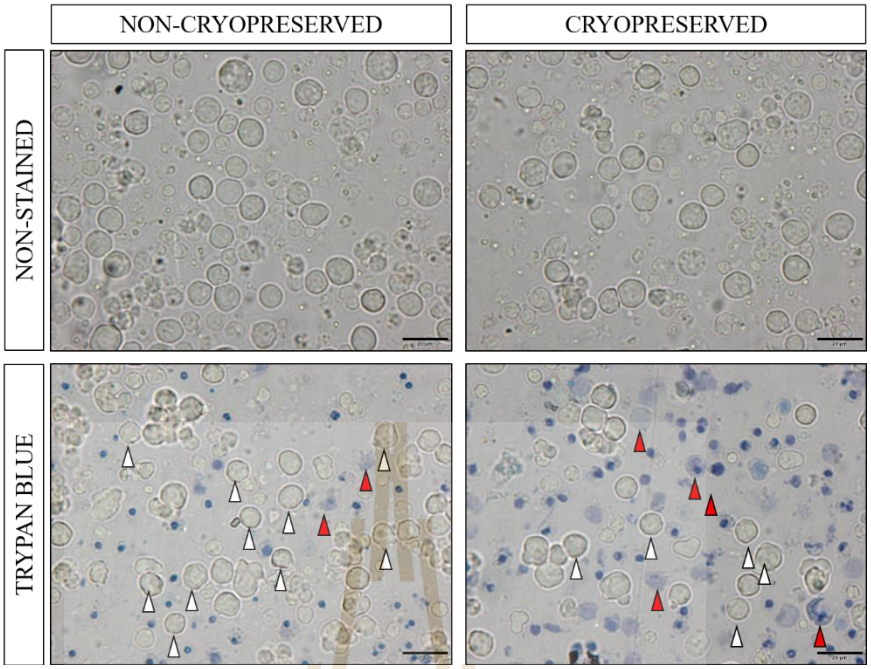
ผลการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายโดยเริ่มจากการใช้ สาร Extender คือ Calcium-free Hank's balanced salt solution (CF-HBSS), Rainbow trout extender (RT) และ Leibovitz's L-15 medium (L-15) และ สาร Cryoprotectant คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethylene glycol (EG) และ Propylene glycol (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย ซึ่งจากการศึกษาพบว่า L-15 เป็นสาร Extender ที่ดีที่สุดเมื่อทำงานร่วมกับสาร Cryoprotectant ทั้ง 3 ชนิด และ PG

เป็นสาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุดเมื่อทำงานร่วมกันกับสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด แล้วเมื่อ L-15 ทำงานร่วมกับ PG ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) แตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นๆ แต่ทั้งสาร Extender และสาร Cryoprotectant ไม่มีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลให้จำนวนเซลล์ทั้งหมด (Number of isolate cells) และ จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (Number of viable cells) สูงที่สุด (ตารางที่ 4.2)

จากนั้นทำการเลือกสาร Extender ที่ดีที่สุด คือ L-15 และสาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุด 2 ชนิด คือ PG และ DMSO มาทำการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมโดยการศึกษาทั้งหมด 3 ระดับ ได้แก่ 1.0 1.3 และ 1.6 M ซึ่งผลการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาอัณฑะแช่แข็งของปลาสวาย PG ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia มากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) (ตารางที่ 4.3)

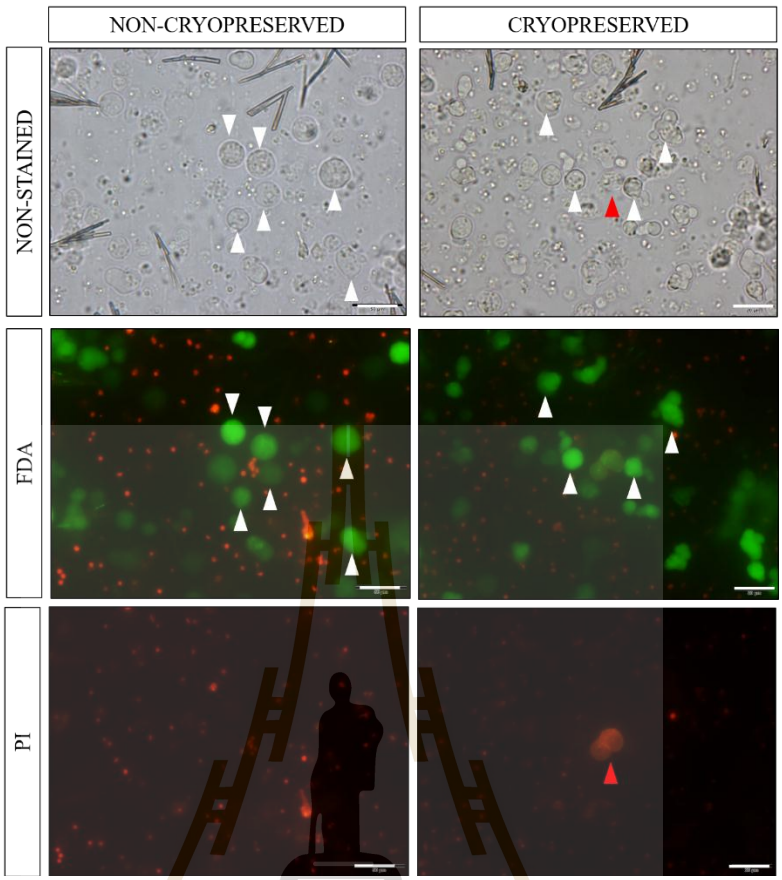
จากนั้นทำการเลือกสาร Cryomedium ที่ดีที่สุดนั้นคือ L-15 และ 1.3 M PG มาทำการศึกษาการเสริมสารให้พลังงาน 3 ระดับ คือ 0.1 0.2 และ 0.3 M Glucose ทำงานร่วมกับโปรตีน 2 ชนิดคือ 10% Egg yolk (EY) หรือ 1.5% Bovine serum albumin (BSA) ผลการศึกษาพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด และอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการแช่แข็ง ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า 0.2 M Glucose และ 10% EY เมื่อใช้เป็นสารเสริมในการเก็บรักษาอัณฑะแช่แข็งของปลาสวายส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) กับสารชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4.4) แต่อย่างไรก็ตามมาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมสารให้พลังและโปรตีนพบว่า กลุ่มควบคุมให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia มากกว่ากลุ่มที่มีการเสริม ดังนั้นจึงเลือกใช้กลุ่มควบคุมในการศึกษาถัดไป

สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมของการละลายตัวอย่างหลังการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง การศึกษาถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมโดยใช้สาร Extender คือ L-15 และสาร Cryoprotectant คือ 1.3 M PG ผลการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 10°C ที่ระยะเวลาในการละลาย 4 และ 8 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia (ตารางที่ 4.5) สูงที่สุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ

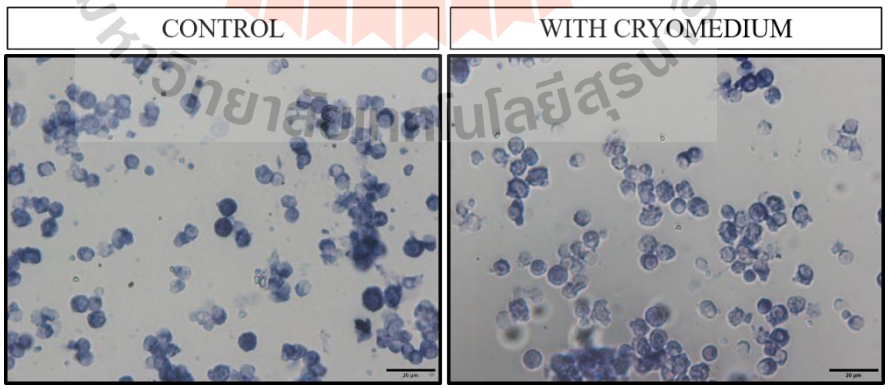



**ภาพที่ 4.3** เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ (Bright field) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Trypan blue (ลูกศรสีขาวแสดงถึงเซลล์ที่รอดชีวิต และลูกศรสีแดงแสดงถึงเซลล์ที่ไม่รอดชีวิต) (Scale bar = 20 µm.)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**ภาพที่ 4.4** เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) (Scale bar = 20 µm.)




**ภาพที่ 4.5** เซลล์ Spermatogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และทำการทดสอบด้วยวิธี in situ hybridization (Scale bar = 20 µm.)

**ตารางที่ 4.2** ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบสภาวะของสาร Extender และ สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Extender | Cryoprotectant | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| CF-HBSS | DMSO | 71.33±3.93$^{Bcd}$ | 4.25±1.40 | 12.22±2.35 | 2.95±0.97 |
| | EG | 63.67±4.97$^{Be}$ | 4.33±1.03 | 12.67±2.17 | 2.79±0.84 |
| | PG | 79.00±3.03$^{Bb}$ | 5.68±1.24 | 13.87±2.02 | 4.48±0.97 |
| RT | DMSO | 71.67±1.97$^{Bcd}$ | 4.30±0.64 | 13.05±2.53 | 3.09±0.51 |
| | EG | 65.67±4.63$^{Bde}$ | 4.08±0.62 | 13.36±1.63 | 2.69±0.57 |
| | PG | 77.67±2.94$^{Bbc}$ | 4.60±1.23 | 12.53±2.65 | 3.59±1.06 |
| L-15 | DMSO | 73.33±2.42$^{Bbc}$ | 4.11±1.26 | 11.91±2.48 | 3.02±0.96 |
| | EG | 64.33±4.63$^{Be}$ | 4.74±0.74 | 12.59±0.86 | 3.08±0.70 |
| | PG | 86.33±2.34$^{Ba}$ | 4.73±0.62 | 14.08±0.71 | 4.07±0.47 |
| Fresh | | 96.67±1.63$^{A}$ | 4.41±0.70 | 13.48±0.93 | 4.25±0.65 |
| Two-way analysis of variance *(P<0.05)* | | | | | |
| Extender | | *0.014 | 0.4622 | 0.9855 | 0.5114 |
| Cryoprotectant | | *<0.001 | 0.0622 | 0.2818 | *0.001 |
| Interaction | | *0.0208 | 0.4428 | 0.4862 | 0.5615 |

$^{a,b,c,d,e}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.3** ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบความเข้มข้นของ สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Extender | Cryoprotectant | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| L-15 | 1.0 M DMSO | 76.00±1.79$^{Bb}$ | 5.57±0.69 $^{b}$ | 13.07±0.97 | 4.22±0.46 $^{b}$ |
| | 1.3 M DMSO | 79.00±2.76$^{Bb}$ | 6.38±0.59 $^{ab}$ | 14.83±0.82 | 5.03±0.46 $^{ab}$ |
| | 1.6 M DMSO | 78.00±2.83$^{Bb}$ | 6.07±0.68 $^{ab}$ | 14.19±1.10 | 4.74±0.60 $^{ab}$ |
| | 1.0 M EG | 79.67±3.88$^{Bb}$ | 5.73±0.84 $^{ab}$ | 13.50±0.94 | 4.59±0.91 $^{ab}$ |
| | 1.3 M PG | 85.67±1.97$^{Ba}$ | 6.46±0.70 $^{ab}$ | 13.20±0.99 | 5.54±0.63 $^{a}$ |
| | 1.6 M PG | 79.67±3.88$^{Bb}$ | 6.82±0.43 $^{a}$ | 13.88±1.23 | 5.45±0.58 $^{ab}$ |
| Fresh | | 94.33±1.51$^{A}$ | 7.10±1.1 | 14.44±0.58 | 6.69±0.90 |

One-way analysis of variance ($P$<0.05)

$^{a,b}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.4** ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบการเสริมแหล่งพลังงานและโปรตีนที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Sugar | Protein | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 M Glucose | 10% Egg yolk | 81.67±2.94$^{Bab}$ | 5.16±0.53 | 13.89±1.21 | 4.22±0.51 |
| 0.2 M Glucose | 10% Egg yolk | 84.67±1.63$^{Ba}$ | 4.98±0.45 | 14.0±1.39 | 4.21±0.39 |
| 0.3 M Glucose | 10% Egg yolk | 77.67±2.34$^{Bbc}$ | 5.17±0.48 | 13.91±2.27 | 4.01±0.40 |
| 0.1 M Glucose | 1.5% BSA | 77.67±2.34$^{Bbc}$ | 5.10±0.34 | 14.06±0.98 | 3.96±0.29 |
| 0.2 M Glucose | 1.5% BSA | 79.00±2.10$^{Bbc}$ | 5.64±0.22 | 14.62±1.07 | 4.46±0.29 |
| 0.3 M Glucose | 1.5% BSA | 75.33±2.42$^{Bc}$ | 5.38±0.30 | 14.46±0.73 | 4.05±0.28 |
| Control | | 85.67±1.97$^{Ba}$ | 6.46±0.70 | 13.20±0.99 | 5.54±0.63 |
| Fresh | | 95.67±1.51$^{A}$ | 5.61±0.26 | 14.44±0.96 | 5.37±0.27 |
| Two-way analysis of variance ($P$<0.05) | | | | | |
| Sugar | | *<0.001 | 0.5248 | 0.8239 | 0.1213 |
| Protein | | *<0.001 | *0.0499 | 0.339 | 0.9325 |
| Interaction | | 0.2315 | 0.0994 | 0.9165 | 0.2579 |

$^{a,b,c}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

**ตารางที่ 4.5** ผลของเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายตัวอย่าง (Mean±SD; N=6)

| Temperature | Time | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10°C | 4 min | 84.33±2.34$^{Ba}$ | 5.35±0.26 | 14.46±0.54 | 4.51±0.29 |
| | 8 min | 84.67±3.72$^{Ba}$ | 5.27±0.27 | 13.99±0.92 | 4.47±0.38 |
| | 12 min | 76.00±1.26$^{Bb}$ | 5.41±0.37 | 14.77±1.04 | 4.15±0.31 |
| 28°C | 4 min | 70.33±2.34$^{Bc}$ | 5.13±0.25 | 14.05±1.06 | 3.61±0.27 |
| | 8 min | 64.33±1.97$^{Bd}$ | 4.94±0.49 | 14.12±0.41 | 3.18±0.38 |
| | 12 min | 55.33±2.07$^{Be}$ | 5.37±0.46 | 14.15±0.76 | 2.97±0.27 |
| Fresh | | 95.67±1.51$^{A}$ | 5.35±0.33 | 14.60±0.28 | 5.12±0.32 |
| Two-way analysis of variance ($P$<0.05) | | | | | |
| Temperature | | *<0.001 | 0.1146 | 0.2839 | *<0.001 |
| Time | | *<0.001 | 0.1797 | 0.4976 | 0.0025 |
| Interaction | | *0.0025 | 0.6063 | 0.5217 | 0.3446 |

$^{a,b,c,d,e}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 4.3 การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย (Cryopreservation of ovary in striped catfish)

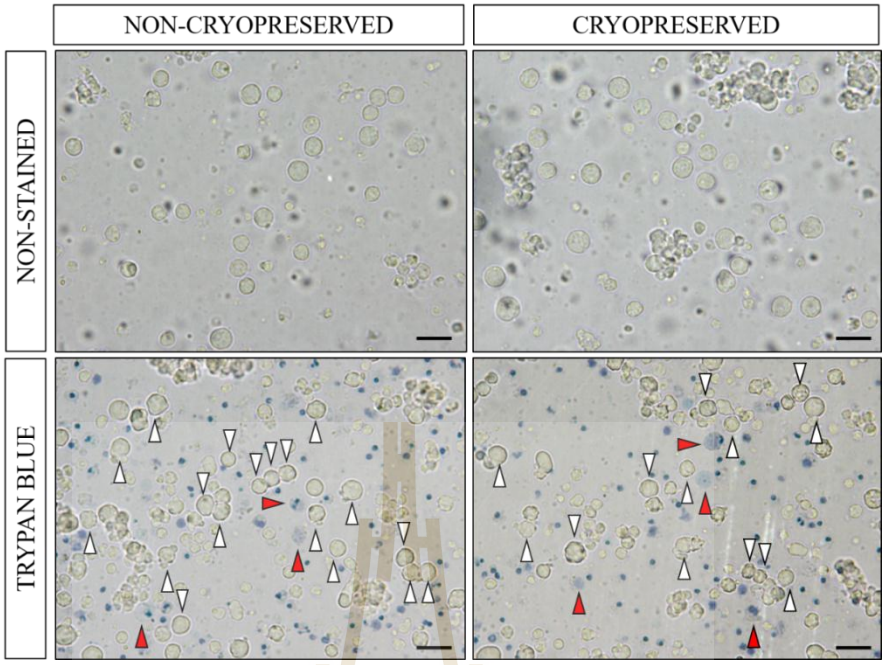
การศึกษาการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวายในครั้งนี้ทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ Oogonia หลังผ่านการแช่แข็งโดยใช้การย้อมสี Trypan blue และใช้สีฟลูออเรสเซนต์ Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) ในการตรวจสอบและทดสอบการแสดงออกของ *vasa* protein ของเซลล์ Oogonia เช่นดียวกับการตรวจสอบของเซลล์ Spermatogonia (ภาพที่ 4.6 4.7 และ 4.8)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย เริ่มจากสาร Extender และสาร Cryoprotectant โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายพบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ถึงอิทธิพลร่วมกันระหว่างปัจจัย 2 ปัจจัย L-15 ที่เป็นสาร Extender และ PG ที่เป็นสาร Cryoprotectant นั้นมีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดจากกลุ่มการทดลองชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4.6) แต่ไม่พบการมีอิทธิพลร่วมกันของทั้ง 2 ปัจจัยที่ส่งผลให้จำนวนเซลล์ทั้งหมด และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05)

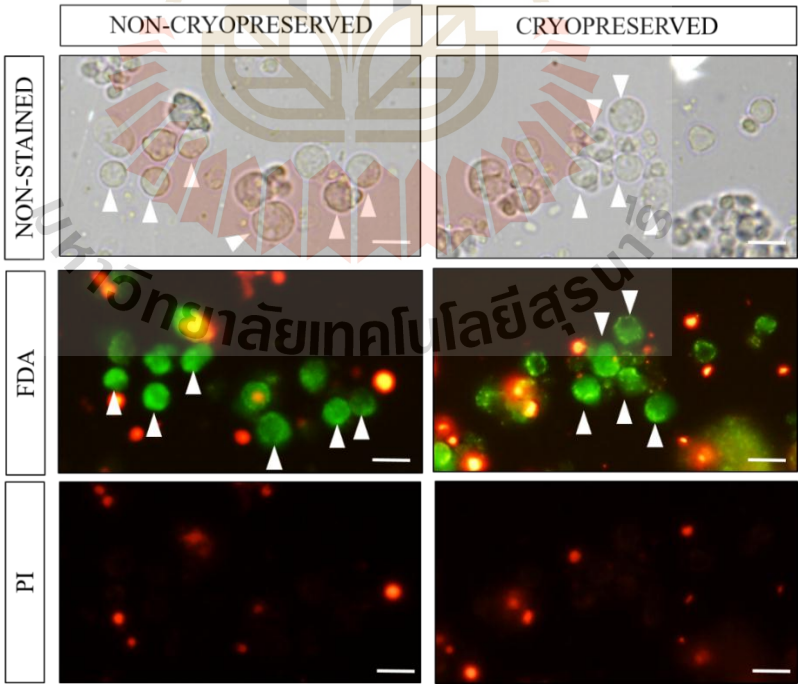
จากนั้นเลือกสาร Extender ที่ดีที่สุด 1 ชนิดและสาร Cryoprotectant ที่ดีที่สุด 2 ชนิดมาทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant และสารที่เลือกใช้คือ L-15 ร่วมกับ DMSO และ L-15 ร่วมกับ PG ซึ่งผลการศึกษาพบว่า สาร Cryoprotectant คือ PG ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia ดีที่สุด (ตารางที่ 4.7) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) กับสาร Cryomedium อื่นๆ

จากนั้นทำการเลือกสาร Extender คือ L-15 และสาร Cryoprotectant คือ 1.3 M PG มาทำการศึกษาโดยการเสริมสารให้พลังงานและโปรตีนให้กับเซลล์เช่นเดียวกับการทดสอบในเซลล์ Spermatogonia ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด แต่พบการมีอิทธิพลร่วมกันของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia ซึ่ง 0.2 M Glucose และ 10% EY เป็นสารเสริมที่ส่งผลให้มีอัตราการรอดเหมาะสมที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) กับสารชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4.8) แต่อย่างไรก็ตามมาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมแหล่งพลังงานและโปรตีนพบว่า กลุ่มควบคุมให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia มากกว่ากลุ่มที่มีการเสริมแหล่งพลังงานและโปรตีน ดังนั้นจึงเลือกใช้กลุ่มควบคุมในการศึกษาถัดไป

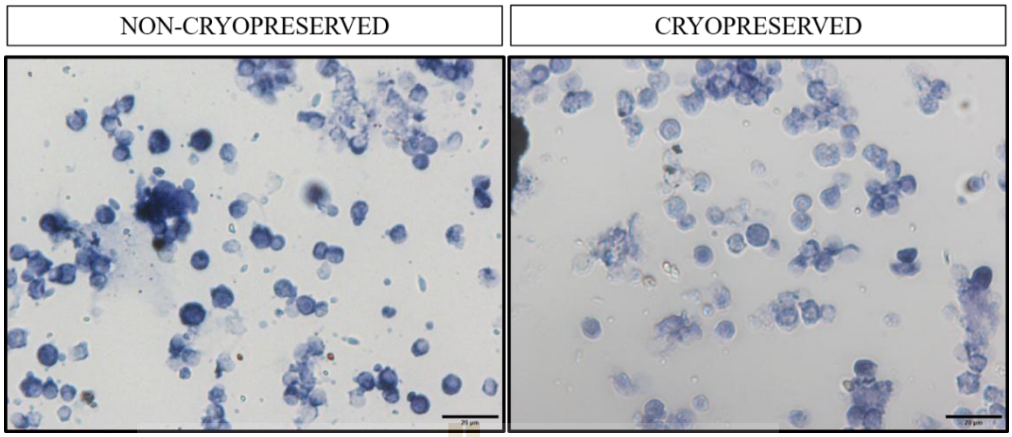
และในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งในขั้นตอนสุดท้ายคือการศึกษาอุณหภูมิ 2 ระดับและระยะเวลา 3 ระดับที่เหมาะสมของการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็งซึ่งสาร Extender คือ L-15 และสาร Cryoprotectant คือ 1.3 M PG ผลการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 10°C ที่ระยะเวลา 4 และ 8 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia (ตารางที่ 4.9) สูงที่สุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$<0.05) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ




**ภาพที่ 4.6** เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ (Bright field) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Trypan blue (ลูกศรสีขาวแสดงถึงเซลล์ที่รอดชีวิต และลูกศรสีแดงแสดงถึงเซลล์ที่ไม่รอดชีวิต) (Scale bar = 20 µm.)




**ภาพที่ 4.7** เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสี Fluorescein diacetate (FDA) และ Propidium iodide (PI) (Scale bar = 10 µm.)




**ภาพที่ 4.8** เซลล์ Oogonia หลังจากผ่านการสกัดเซลล์ และทำการทดสอบด้วยวิธี in situ hybridization (Scale bar = 20 µm.)

**ตารางที่ 4.6** ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบสาร Extender และสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Extender | Cryoprotectant | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| CF-HBSS | DMSO | 67.67±4.97$^{bc}$ | 3.46±0.50 | 13.36±2.81 | 2.35±0.38 |
| | EG | 66.00±7.80$^{bc}$ | 3.59±1.38 | 15.31±5.98 | 2.32±0.78 |
| | PG | 71.67±2.94$^{Bab}$ | 3.70±1.59 | 15.32±5.36 | 2.64±1.08 |
| RT | DMSO | 63.33±7.55$^{Bbc}$ | 3.02±0.77 | 13.84±3.92 | 1.90±0.46 |
| | EG | 58.33±6.12$^{Bc}$ | 3.17±1.02 | 14.43±5.06 | 1.81±0.45 |
| | PG | 57.67±4.97$^{Bc}$ | 2.97±0.32 | 12.94±1.76 | 1.72±0.27 |
| L-15 | DMSO | 79.00±4.86$^{Ba}$ | 3.62±0.61 | 14.26±2.66 | 2.88±0.61 |
| | EG | 72.00±3.79$^{Bab}$ | 3.61±0.63 | 14.56±3.61 | 2.61±0.50 |
| | PG | 82.00±6.07$^{Ba}$ | 3.82±0.65 | 17.30±7.36 | 3.14±0.67 |
| Fresh | | 93.67±3.88$^{A}$ | 3.48±0.84 | 16.14±4.09 | 3.26±0.80 |
| Two-way analysis of variance ($P$<0.05) | | | | | |
| Extender | | *<0.001 | 0.0989 | 0.5695 | *<0.001 |
| Cryoprotectant | | *0.0195 | 0.9122 | 0.663 | 0.4865 |
| Interaction | | 0.1094 | 0.9848 | 0.7719 | 0.7508 |

$^{a,b,c}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

**ตารางที่ 4.7** ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบความเข้มข้นของ สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Extender | Cryoprotectant | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| L-15 | 1.0 M DMSO | 78.00±2.83$^{Bb}$ | 4.32±0.26 | 15.80±0.28 | 3.37±0.30 |
| | 1.3 M DMSO | 80.33±3.20$^{Bab}$ | 4.18±0.33 | 15.41±0.71 | 3.35±0.28 |
| | 1.6 M DMSO | 80.00±3.35$^{Bab}$ | 4.35±0.22 | 13.91±1.76 | 3.48±0.22 |
| | 1.0 M EG | 80.33±2.34$^{Bab}$ | 4.39±0.22 | 13.99±1.09 | 3.57±0.21 |
| | 1.3 M PG | 83.33±3.27$^{Ba}$ | 4.43±0.35 | 14.55±1.35 | 3.69±0.31 |
| | 1.6 M PG | 80.00±1.26$^{Bab}$ | 4.46±0.28 | 14.59±1.24 | 3.57±0.19 |
| | Fresh | 91.33±1.63$^{A}$ | 4.75±0.11 | 16.58±0.94 | 4.17±0.43 |

One-way analysis of variance ($P$<0.05)

$^{a,b}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 4.8** ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบการเสริมแหล่งพลังงานและแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมต่อการแช่แข็ง (Mean±SD; N=6)

| Sugar | Protein | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 M Glucose | 10% Egg yolk | 78.00±1.79$^{Bbc}$ | 4.40±0.50 | 13.82±0.71 | 3.43±0.42 |
| 0.2 M Glucose | 10% Egg yolk | 82.33±2.34$^{Bab}$ | 4.32±0.29 | 14.14±0.56 | 3.55±0.25 |
| 0.3 M Glucose | 10% Egg yolk | 76.67±2.42$^{Bc}$ | 4.40±0.15 | 13.25±1.00 | 3.38±0.17 |
| 0.1 M Glucose | 1.5% BSA | 75.00±2.10$^{Bc}$ | 4.85±0.40 | 14.19±0.84 | 3.63±0.31 |
| 0.2 M Glucose | 1.5% BSA | 77.00±2.10$^{Bc}$ | 4.46±0.32 | 14.16±0.76 | 3.43±0.24 |
| 0.3 M Glucose | 1.5% BSA | 78.00±2.53$^{Bbc}$ | 4.15±0.47 | 14.39±0.65 | 3.23±0.36 |
| Control | | 83.33±3.27$^{Ba}$ | 4.43±0.35 | 14.55±1.35 | 3.69±0.31 |
| Fresh | | 95.00±1.10$^{A}$ | 5.37±0.31 | 15.66±1.68 | 5.10±0.27 |
| Two-way analysis of variance ($P$<0.05) | | | | | |
| Sugar | | *0.0044 | 0.0816 | 0.5724 | 0.162 |
| Protein | | *0.0037 | 0.3855 | 0.0554 | 0.8364 |
| Interaction | | *0.0034 | 0.0885 | 0.2059 | 0.3117 |

$^{a,b,c}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

**ตารางที่ 4.9** ผลของเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเพื่อทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายตัวอย่าง (Mean±SD; N=6)

| Temperature | Time | Viability (%) | Number of isolate cells 10 µm/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of isolate cells/50 mg (*$10^5$ cell) | Number of viable cells/50 mg (*$10^5$ cell) |
|---|---|---|---|---|---|
| 10°C | 4 min | 84.33±1.51$^{Ba}$ | 4.98±0.42 | 15.15±1.54 | 4.20±0.32$^{a}$ |
| | 8 min | 80.67±2.42$^{Ba}$ | 5.11±0.39 | 16.15±0.83 | 4.12±0.33$^{a}$ |
| | 12 min | 68.00±2.53$^{Bb}$ | 4.70±0.51 | 16.84±0.48 | 3.19±0.32$^{bc}$ |
| 28°C | 4 min | 64.33±2.34$^{Bb}$ | 5.06±0.43 | 16.13±1.11 | 3.25±0.27$^{b}$ |
| | 8 min | 57.67±1.51$^{Bc}$ | 5.09±0.35 | 16.37±1.52 | 2.93±0.22$^{bc}$ |
| | 12 min | 53.33±3.01$^{Bc}$ | 5.16±0.49 | 17.70±0.92 | 2.74±0.21$^{c}$ |
| Fresh | | 95.00±2.10$^{A}$ | 5.15±0.38 | 16.71±0.73 | 4.90±0.43 |
| Two-way analysis of variance ($P$<0.05) | | | | | |
| Temperature | | *<0.001 | 0.2563 | 0.0771 | *<0.001 |
| Time | | *<0.001 | 0.6383 | 0.0051 | *<0.001 |
| Interaction | | *<0.001 | 0.3762 | 0.6817 | 0.011 |

$^{a,b,c}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

$^{A,B}$ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ไม่ผ่านและผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

## 4.4 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง

จากการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง พบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของปลาผู้รับวัยอ่อนหลังทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์และอัตราการเข้าอาศัย (Colonization rate) ของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ โดยเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง อัตราการรอดชีวิตของปลาผู้รับวัยอ่อนซึ่งทำการตรวจสอบที่ 28 วันหลังทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$>0.05) ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ กลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และกลุ่มเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง และพบว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งสามารถปลูกถ่ายเข้าสู่

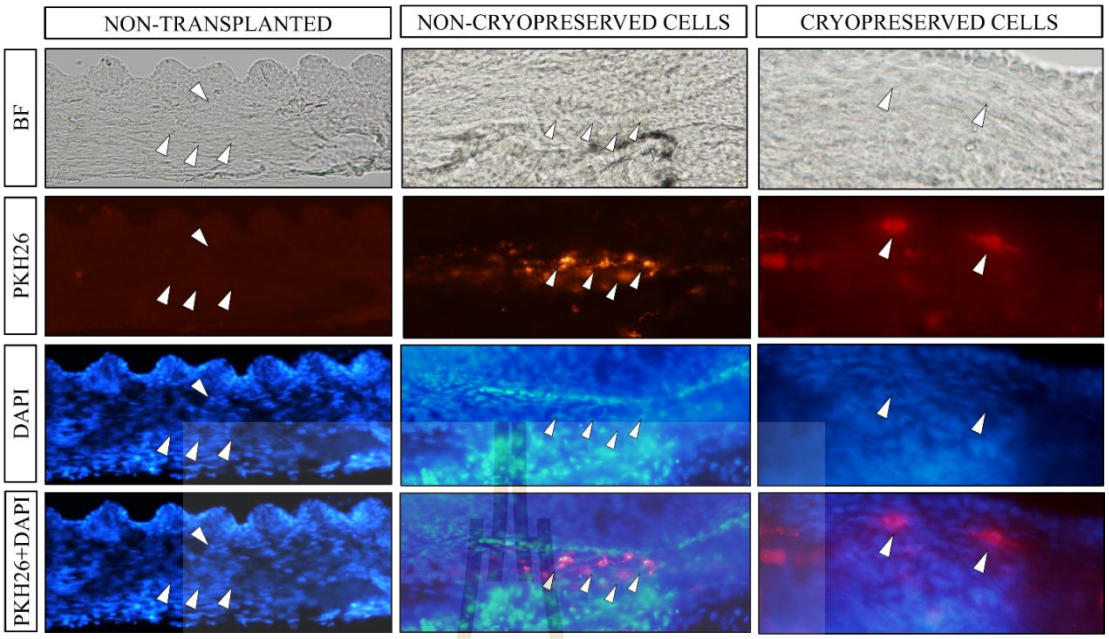
ปลาผู้รับวัยอ่อนได้ โดยมีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งอยู่ที่ 65% และเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งอยู่ที่ 76% (ตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.9)

**ตารางที่ 4.10** ผลของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งหลังการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ 28 วัน (Mean±SD; N=6)

| Replication | No. of transplantated | No. of survived | No. of colonized | Survival rate (%) | Colonization rate (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresh Spermatogonia | | | | | |
| Transplanted 1 | 100 | 32 | 4/5 | 32.00 | 80.00 |
| Transplanted 2 | 80 | 28 | 8/10 | 35.00 | 80.00 |
| Transplanted 3 | 70 | 22 | 4/6 | 31.43 | 66.67 |
| Transplanted 4 | 80 | 24 | 6/8 | 30.00 | 75.00 |
| Transplanted 5 | 70 | 28 | 6/8 | 40.00 | 75.00 |
| Transplanted 6 | 100 | 39 | 8/10 | 39.00 | 80.00 |
| Average | | | | 34.57±4.16 | 76.11±5.24[a] |
| Frozen Spermatogonia | | | | | |
| Transplanted 1 | 100 | 36 | 3/5 | 36.00 | 60.00 |
| Transplanted 2 | 80 | 23 | 5/8 | 28.75 | 62.50 |
| Transplanted 3 | 70 | 24 | 4/6 | 34.29 | 66.67 |
| Transplanted 4 | 80 | 30 | 5/8 | 37.50 | 62.50 |
| Transplanted 5 | 70 | 26 | 5/8 | 37.14 | 62.50 |
| Transplanted 6 | 100 | 40 | 8/10 | 40.00 | 80.00 |
| Average | | | | 35.61±3.85 | 65.69±7.33[b] |
| Non-transplantated | | | | | |
| Control 1 | 100 | 38 | - | 38.00 | - |
| Control 2 | 80 | 32 | - | 40.00 | - |
| Control 3 | 70 | 26 | - | 37.14 | - |
| Control 4 | 80 | 24 | - | 30.00 | - |
| Control 5 | 70 | 27 | - | 38.57 | - |
| Control 6 | 100 | 35 | - | 35.00 | - |
| Average | | | | 36.45±3.57 | - |

[a,b] ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**ภาพที่ 4.9** เซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้เข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ (A-D) (Scale bars (control และ fresh spermatogonia) = 50 µm และ Scale bars (frozen spermatogonia) = 20 µm)

## 4.5 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง

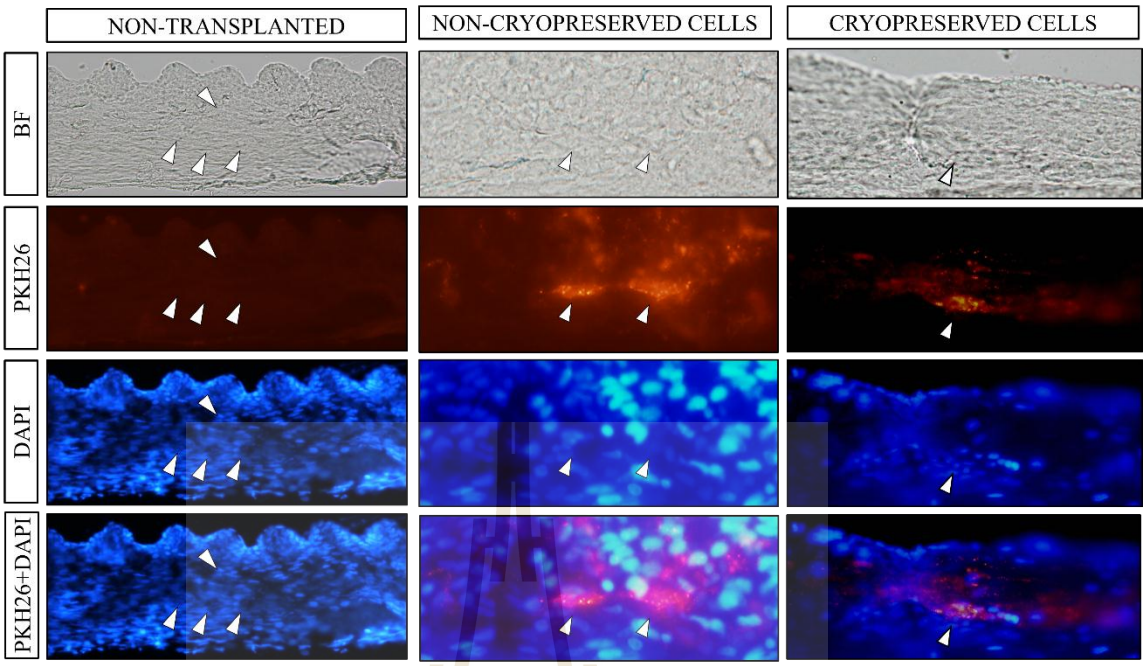
อัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของปลาผู้รับวัยอ่อนหลังจากที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์และอัตราการเข้าอาศัย (Colonization rate) ของเซลล์ Oogonia จากปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ ทั้งเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งพบว่าอัตราการรอดชีวิตของปลาผู้รับวัยอ่อนตรวจสอบที่ 28 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P$>0.05) ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ กลุ่มปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และกลุ่มปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็ง และเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งนั้นสามารถปลูกถ่ายได้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับโดยที่อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งเท่ากับ 61% และ 44% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.10)

**ตารางที่ 4.11** ผลของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งหลังการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ 28 วัน (Mean±SD; N=6)

| Replication | No. of transplanted | No. of survived | No. of colonized | Survival rate (%) | Colonization rate (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Fresh Oogonia | | | | | |
| Transplanted 1 | 70 | 26 | 6/8 | 37.14 | 75.00 |
| Transplanted 2 | 150 | 61 | 7/10 | 40.67 | 70.00 |
| Transplanted 3 | 100 | 30 | 6/8 | 30.00 | 75.00 |
| Transplanted 4 | 70 | 26 | 4/8 | 37.14 | 50.00 |
| Transplanted 5 | 70 | 27 | 5/10 | 38.57 | 50.00 |
| Transplanted 6 | 70 | 24 | 5/10 | 34.29 | 50.00 |
| Average | | | | 36.30±3.73 | 61.67±12.91[a] |
| Frozen Oogonia | | | | | |
| Transplanted 1 | 70 | 28 | 4/8 | 40.00 | 50.00 |
| Transplanted 2 | 150 | 52 | 5/10 | 34.67 | 50.00 |
| Transplanted 3 | 100 | 30 | 5/9 | 30.00 | 55.56 |
| Transplanted 4 | 70 | 25 | 3/8 | 35.71 | 37.50 |
| Transplanted 5 | 70 | 20 | 3/8 | 28.57 | 37.50 |
| Transplanted 6 | 70 | 22 | 3/8 | 31.43 | 37.50 |
| Average | | | | 33.40±4.23 | 44.68±8.12[b] |
| Non-transplanted | | | | | |
| Control 1 | 70 | 25 | - | 35.71 | - |
| Control 2 | 150 | 60 | - | 40.00 | - |
| Control 3 | 100 | 32 | - | 32.00 | - |
| Control 4 | 70 | 26 | - | 37.14 | - |
| Control 5 | 70 | 28 | - | 40.00 | - |
| Control 6 | 70 | 26 | - | 37.14 | - |
| Average | | | | 37.00±2.99 | - |

[a,b] ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P$<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**ภาพที่ 4.10** เซลล์ Oogonia ของปลาผู้ให้เข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ (Scale bars (control) = 50 µm และ Scale bars (fresh oogonia และ frozen oogonia) = 20 µm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 5
# อภิปรายผลการทดลอง

## 5.1 การเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง (Cryopreservation of testis)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แบบแช่แข็งของปลาสวายมี 4 ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ สาร Extender สาร Cryoprotectant, อัตราการลดลงของอุณหภูมิ (Freezing rate) และการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง (Thawing process) (กฤษณ์, 2536) โดยการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งนั้นมีการศึกษาอย่างแพร่หลายทั้งในปลาน้ำจืด (Viveiros and Godinho, 2009; Psenicka et al., 2016) และปลาน้ำเค็ม (Suquet et al., 2000; Okutsu et al., 2006) ซึ่งส่วนใหญ่มีการมุ่งเน้นศึกษาในสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Rana, 1995)

สาร Extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลามีอยู่หลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของปลาที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งสาร Extender เป็นสารที่ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ช่วยลดการใช้พลังงานของเซลล์เพื่อให้เซลล์นั้นมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษา ซึ่งหลักการในการเลือกใช้สาร Extender นั้นควรมีค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) และค่า pH ที่เหมาะสมหรือใกล้เคียงกับค่าออสโมลาลิตี้และค่า pH ของเหลวภายในเซลล์ น้ำภายในช่องท้อง หรือน้ำเชื้อของปลา เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง (กฤษณ์, 2536; Wayman and Tiersch, 2000) ซึ่งน้ำภายในช่องท้องของปลาสวายพบค่าออสโมลาลิตี้เท่ากับ 286.9 mOsmol/kg และค่า pH เท่ากับ 7.7 ส่วนในน้ำเชื้อของปลาสวายพบว่าค่าออสโมลาลิตี้เท่ากับ 285.4 mOsmol/kg และค่า pH เท่ากับ 7.6 และในการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ครั้งนี้พบว่า Leibovite's L-15 medium (L-15) ที่เป็นสาร Extender มีค่า pH เท่ากับ 7.7 นั้นให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ดีที่สุด เมื่อทำงานร่วมกับ Propylene glycol (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M เท่ากับ 86% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoshikawa et al. (2018) ทำการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) ซึ่งใช้ L-15 เป็นสาร Extender แต่ทำงานร่วมกับ 1.3 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสาร Cryoprotectant ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 61.2% ดังนั้นการเลือกใช้สาร Extender ในการแช่แข็งเซลล์ของปลาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะในการเลือกใช้ยกตัวอย่างเช่น ในการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง Phosphate buffered saline+0.5% Bovine serum albumin+50 mM D-Glucose เป็นสาร

Extender ที่เหมาะสมส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตดีที่สุดในปลา Tench (*T.tinca*) (Linhartova et al., 2014; Marinovic et al., 2016), ปลา Goldfish (*C. auratus*) (Marinovic et al., 2016) และปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) และในปลา Rainbow trout (*O.mykiss*) (Kobayashi et al., 2007; Yoshizaki et al., 2011) พบว่า Phosphate buffered saline+0.5% Bovine serum albumin+5.5 mM D-Glucose เป็นสาร Extender ที่ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ดีที่สุด และหลังจากนั้นได้มีการพัฒนาสาร Extender ให้เหมาะสมกับปลา Rainbow trout (*O.mykiss*) มากยิ่งขึ้นโดย Lee et al. (2013) และ Lee et al. (2016a) ให้เป็นสาร Extender ที่ใช้กับปลา Rainbow trout (*O.mykiss*) โดยเฉพาะและยังสามารถใช้กับปลา Manchurian trout (*B. lenok*) (Lee and Yoshizaki, 2016) แล้วส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ดีที่สุดอีกด้วย (ตารางที่ 2.4)

สาร Cryoprotectant เป็นสารที่มีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายในระหว่างการลดลงและเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง แม้ว่าสาร Cryoprotectant จะช่วยป้องกันความเสียหาย ให้กับเซลล์ในกระบวนแช่แข็งแต่ในทางตรงกันข้ามสาร Cryoprotectant นั้นก็สามารถเป็นพิษต่อเซลล์ได้ด้วยเช่นกัน (กฤษณ์, 2536) และการเลือกใช้สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสม และเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ของปลาชนิดนั้นๆ จะต้องมีการคำนึงถึงระดับความเข้มข้น และระยะเวลา (Equilibration time) ที่เหมาะสมเพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ระหว่างขั้นตอนการแช่แข็ง ซึ่งการเลือกใช้ได้มาจากการทดลอง การวิจัยและการศึกษาจากเอกสารทางวิชาการ ยกตัวอย่างเช่น สาร DMSO ที่ความเข้มข้น 1.3 M เมื่อใช้ร่วมกับสาร Extender ที่เหมาะสมส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 40-60% ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Lee et al., 2013; Lee et al., 2016a) และปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) (Yoshikawa et al., 2018) และสาร DMSO ที่ความเข้มข้น 5 M ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วง 55-60% ในปลา Tench (*T. tinca*) (Marinovic et al., 2016) และ ปลา Goldfish (*C. auratus*) (Marinovic et al., 2016) สาร Ethylene glycol (EG) ที่ระดับความเข้มข้น 1.3 M, 1.5 M และ 1.8 M เมื่อใช้ร่วมกับสาร Extender ที่เหมาะสมส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 30-50% ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Kobayashi et al., 2007), ปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) และ ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Yoshizaki et al., 2011) ตามลำดับ และ สาร Methanol ที่ความเข้มข้น 1.3 M เมื่อทำงานร่วมกับสาร Extender ที่เหมาะสมส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) (Lee and Yoshizaki., 2016) เท่ากับ 80% (ตารางที่ 2.4) และในการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายครั้งนี้พบว่า สาร PG ที่ความเข้มข้น 1.3 M เมื่อใช้กับสาร Extender ได้แก่ CF-HBSS, RT extender และ L-15 ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 79%, 77% และ 86% ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงสารที่เป็นแหล่งพลังงานและโปรตีนกับเซลล์ในกระบวนการแช่แข็งพบว่า 0.2 M กลูโคส และ 10% Egg yolk ให้ผลการศึกษาดีที่สุดเท่ากับ 84% แต่

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริม (85%) พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P$>0.05) เนื่องจากสาร Extender คือ L-15 ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้มีองค์ประกอบของแหล่งพลังงาน กรดอะมิโน และแร่ธาตุชนิดอื่นๆ (ภาคผนวก ก.) เพื่อพอต่อความต้องของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งอยู่แล้วจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเสริมแหล่งพลังงานหรือแหล่งโปรตีนอื่นๆ เพิ่มเติม ดังนั้นการเลือกใช้สาร Extender และสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมกับปลาในแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของปลา การศึกษาจากเอกสารทางวิชาที่เคยมีการศึกษาที่ผ่านมา และคำนึงถึงหลักการในการเลือกใช้

อัตราการลดลงของอุณหภูมิ (Freezing rate) ในระหว่างการแช่แข็งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดยมีการรายงานการใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็งที่ 1°C/min แล้วส่งผลให้เซลล์ Spermatogonia มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วง 40-80% ในปลาชนิดต่างๆ ดังนี้ ปลา Tench (*T. tinca*) (Linhartova et al., 2014 และ Marinovic et al., 2016), ปลา Goldfish (*C. auratus*) (Marinovic et al., 2016), ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Kobayashi et al., 2007; Yoshizaki et al., 2011; Lee et al., 2013 และ Lee et al., 2016a), ปลา Manchurian trout (*B. lenok*) (Lee and Yoshizaki., 2016), ปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) และปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) (Yoshikawa et al., 2018) (ตารางที่ 2.4) และการศึกษาในปลาสวายครั้งนี้ เมื่อใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 1°C/min ในการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง ส่งผลให้พบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Spermatogonia เท่ากับ 86% เมื่อใช้ร่วมกับสาร Extender และสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสม ซึ่งอัตราการรอดชีวิตดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาดังที่กล่าวมาข้างต้น และในส่วนของการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง (Thawing process) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการกำหนดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ จากที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งในปลาชนิดต่างๆ เช่น การศึกษาในปลา Tench (*T. tinca*) (Linhartova et al., 2014 และ Marinovic et al., 2016), ปลา Goldfish (*C. auratus*) (Marinovic et al., 2016) และปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) เมื่อใช้อุณหภูมิ 38°C ในการละลายตัวอย่างเป็นเวลา 1-2 นาที พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 50-60% ในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) (Lee and Yoshizaki., 2016) ใช้อุณหภูมิในการละลายตัวอย่าง 30°C ระยะเวลาในการละลาย 1 นาทีพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 80% และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Yoshizaki et al., 2011; Lee et al., 2013; และ Lee et al., 2016a) ใช้อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 1 นาที ในการละลายตัวอย่าง ส่งผลให้พบอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 50% (ตารางที่ 2.4) และในการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายครั้งนี้ได้ใช้การละลายตัวอย่างหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 4 นาที พบอัตราการรอดชีวิตของ Spermatogonia ที่ 84% เมื่อทำงานร่วมกับสาร Extender สาร Cryoprotectant และอัตราการลดลงของอุณหภูมิ (1°C/min) ที่เหมาะสม หลักเกณฑ์

ในการเลือกใช้อุณหภูมิในการละลายตัวอย่างหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ซึ่งส่วนใหญ่จะเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปลาชนิดนั้นๆ และในปลาสวายอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 22-28°C (FAO, 2012) แต่ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการทดสอบพบว่า 10°C ระยะเวลาในการละลาย 4 นาที เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็ง เพราะเมื่อทำการละลายตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งแล้วเมื่อนำตัวอย่างอยู่ในสถาพที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อที่จะลดการทำงานของเซลล์และทำให้เซลล์สูญเสียพลังงานให้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามอัตราการลดลงของอุณหภูมิและการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็งที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และชนิดของปลาอีกด้วย ถึงแม้จะเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันก็ตามและถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายให้มีประสิทธิภาพของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ให้ดียิ่งขึ้นสามารถกลับมาศึกษาโดยการกำหนด 2 ปัจจัยนี้เพิ่มเติมได้

## 5.2 การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็ง (Cryopreservation of ovary)

คลังแช่แข็ง (Cryobanking) เป็นคลังที่สามารถช่วยในการเก็บรักษาพันธุ์ปลาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในระยะยาว และอาจเป็นวิธีทางเลือกที่ช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ถูกคุกคามและใกล้สูญพันธุ์ได้ (Lee et al., 2013) แต่ในปัจจุบันวิธีการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งสำหรับไข่หรือตัวอ่อนของปลายังไม่ประสบความสำเร็จในปลาบางชนิด (Mazur et al., 2008) การเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งจึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมของปลาเพศเมียได้ ยกตัวอย่างเช่น ในปลา Zebrafish (*D. rerio*) (Guan et al., 2008) ทำการศึกษาโดยการใช้ KCl buffer เป็นสาร Extender ทำงานร่วมกับ 4 M Methanol ที่เป็นสาร Cryoprotectant ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 88% ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) ใช้ Phosphate buffered saline + 0.5% Bovine serum albumin + 50 mM D-Glucose เป็นสาร Extender ทำงานร่วมกับ 1.5 M EG ที่เป็นสาร Cryoprotectant ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 15% และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Lee et al., 2016) ใช้สาร Extender ที่เหมาะสมกับปลา Rainbow trout (*O.mykiss*) ทำงานร่วมกันกับ 1.0 M DMSO ที่เป็นสาร Cryoprotectant ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 72% (ตารางที่ 2.5) และในการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวายพบว่า เมื่อ L-15 ทำงานร่วมกันกับ DMSO และ PG ที่ความเข้มข้น 1.3 M ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 79% และ 82% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อทำการเสริมสารให้พลังงานและโปรตีนพบกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเสริมให้ผลการศึกษาดีที่สุดเท่ากับ 83% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากผลการทดลองศึกษาผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ต่อการพัฒนาของกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกล้ามเนื้อ และคุณภาพเนื้อของไก่โคราช สามารถสรุปประเด็นต่างๆ ดังนี้

1) การศึกษาการสังเคราะห์ SeNPs โดยใช้ BSA พบว่าสามารถสังเคราะห์สารให้มีขนาดอนุภาค 25.52±3.35 นาโนเมตร และสามารถนำ BSA-SeNPs มาใช้ในรูปแบบของการฉีดสารผ่านเปลือกไข่โดยไม่ส่งผลกระทบต่อตัวอ่อน แต่การสังเคราะห์ในรูปแบบนี้ไม่ได้มีความจำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ศึกษาถึงการสังเคราะห์สารในรูปของ L-Arg-SeNPs ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อ โดยการเพิ่มตัวจับโมเลกุลที่เป็นกลาง (Neutral molecule) หรือที่เรียกว่าลิแกนด์ (Ligand) ที่เฉพาะกับเซลล์กล้ามเนื้อลายของไก่โคราช

- ศึกษาถึงการนำส่งสารอาหารจากอวัยวะเริ่มต้นไปสู่อวัยวะเป้าหมาย และช่วงเวลาที่เหมาะในตัวอ่อนต่อการสร้างกล้ามเนื้อ เพื่อรู้ถึงระดับสารที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อของไก่โคราช

2) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ไม่ส่งผลการทบต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และองค์ประกอบซาก แต่สามารถเพิ่มการสะสมของโปรตีนและลดการสูญเสียน้ำในเนื้ออก อีกทั้งยังสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว ของไก่โคราชที่อายุ 63 วัน ซึ่งไม่สามารถเพิ่มน้ำหนักซากในระยะยาวได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ศึกษาถึงช่วงอายุของตัวอ่อน และระดับสารอาหารที่เหมาะสมในฉีดสารผ่านเปลือกไข่ เพื่อสามารถสร้างเซลล์กล้ามเนื้อทั้งในระยะก่อนฟักและหลังฟัก จึงนำไปสู่การเพิ่มน้ำหนักในระยะยาว

- ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการให้สารอาหารระหว่างการผสมในอาหารแม่ไก่ มทส. กับการฉีดสารผ่านเปลือกไข่ต่อองค์ประกอบสารอาหารภายในไข่ไก่โคราช

3) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักเฉลี่ยของเนื้อ และขนาดเส้นใยกล้ามเนื้ออก แต่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อในวันแรกของการฟัก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้ออกของไก่โคราชในระยะยาวได้ จึงควรศึกษาถึงการเปรียบเทียบรูปแบบการให้สารอาหารระหว่างการฉีดสารกับการผสมอาหารต่อสัณฐานวิทยาของกล้ามเนื้ออกของไก่โคราช

4) การศึกษาการฉีด L-arginine และ SeNPs เปลือกไข่ สามารถการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ในวันแรกของการฟักของไก่โคราชได้ แต่อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อค่าการค่าทำงานของเอนไซม์ GSH-Px จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้คือ ศึกษาถึงการเกิดกระบวนการ Lipid oxidation (Malondialdehyde: MAD, lipoxygenase activity: LOX, conjugate

dienes: CD), Protein oxidation (Protein carbonyl content: PC, ischemia modified albumin: IMA) และค่าการรั่วไหลของอิเล็กตรอนภายในเซลล์ (Electrolyte leakage: EL) รวมไปถึงชนิดของกล้ามเนื้อ (I, IIA, IIX และ IIB) เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการเกิดออกซิเดชั่นภายในเซลล์ของไก่โคราชที่ได้รับการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่

5) การศึกษาของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *MSTN* ในวันแรกของการฟัก โดยที่ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนในเนื้ออกระยะยาวได้ แต่ก็ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัวเฉลี่ยของไก่โคราช ซึ่งยังไม่เป็นที่แน่ชัดในการอธิบายกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแสดงออกของกลุ่มยีนที่กระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อเช่น mTOR, MyoD, MyoG, Pax7, p70S6K1 ฯลฯ เพื่อเป็นตัวชี้วัดในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการกระตุ้นและการยับยั้งที่มีความสมดุลกันจึงเกิดเป็นการสร้างกล้ามเนื้อของไก่โคราช

6) การศึกษาผลของการฉีด L-arginine และ SeNPs ผ่านเปลือกไข่ ไม่มีผลต่อค่าโปรตีนรวม อัลบูมิน โกลบูลิน สัดส่วน A/G และกรดยูริก ซึ่งทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของไก่โคราช และไม่มีการตกค้างของซีลีเนียมภายในเซลล์ จึงทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นว่าการฉีดสารอาหารผ่านเปลือกไข่สามารถนำมาประยุกต์ใช้จริงได้ในโรงฟัก ซึ่งเป็นการให้สารอาหารระยะแรกของการฟัก อีกทั้งยังพบว่าสามารถนำสารอาหารที่มีขนาดอนุภาคนาโนมาใช้ในการฉีดสารอาหาร หรือประกอบในสูตรอาหารไก่ได้โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามควรต้องมีการศึกษาถึงระดับและระยะเวลาการฉีดสารที่เหมาะสมกับจึงจะสามารถเพิ่มปริมาณของซากเพื่อตัดแต่งชิ้นส่วนจนนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของเนื้อไก่ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่โคราชได้

อัตราการการลดลงของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งที่ได้มีการศึกษาที่ผ่านมาแล้วยกตัวอย่างเช่น ในปลา Zebrafish (*D. rerio*) (Guan et al., 2008) ใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 0.3°C/min ส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตดีที่สุด ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) และปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Lee et al., 2016b) พบว่าใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 1°C/min ให้ผลอัตราการรอดชีวิตดีที่สุด (ตารางที่ 2.5) ซึ่งในการศึกษาการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวายนั้นใช้อัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 1°C/min เมื่อทำงานร่วมกับสาร Extender และสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสมส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 83% และในการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็งจากการศึกษาที่ผ่านมาในปลา Zebrafish (*D. rerio*) (Guan et al., 2008) ใช้อุณหภูมิในการละลายตัวอย่างเท่ากับ 26°C เป็นเวลา 5 นาที ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) (Psenicka et al., 2016) ใช้อุณหภูมิ 38°C ในการละลายตัวอย่างเป็นเวลา 1 นาที และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) (Lee et al., 2016b) ใช้อุณหภูมิในการละลายตัวอย่าง 10°C

เป็นเวลา 1 นาที (ตารางที่ 2.5) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการทดสอบแล้วพบว่าอุณหภูมิในการละลายตัวอย่างที่ 10°C เป็นเวลา 4 นาที ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia เท่ากับ 84% เช่นเดียวกับการศึกษาการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวาย

## 5.3 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Spermatogonia

การพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยการนำเซลล์ Spermatogonia ที่สกัดได้จากอัณฑะของปลาผู้ให้มาปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับวัยอ่อน โดยมีการตรวจสอบการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ (Donor fish) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ (Recipient fish) ซึ่งเป็นค่าดัชนีเบื้องต้นที่สำคัญในการตรวจสอบความสำเร็จของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง โดยพบว่าเซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดจากอัณฑะที่ไม่ผ่านการแช่แข็งมีค่าอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 76% ส่วนเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งนั้นมีค่าอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 65% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งอัตราการเข้าอาศัยของการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาเช่น การศึกษาของ Lee et al. (2016a) เมื่อนำอัณฑะที่ผ่านการแช่แข็งของปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia เข้าสู่ปลา Masu salmon (*O. mason*) พบว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งสามารถเข้าไปอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ 68% ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่าย Spermatogonia ที่ผ่านการแช่แข็งเข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เช่นเดียวกันแต่เป็นปลาที่เป็นหมัน (Triploid) พบอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 80% (Lee et al., 2013) (ตารางที่ 2.6) และแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะใช้สภาวะที่เหมาะสมของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด แต่ยังส่งผลทำให้อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งลดต่ำลงเมื่อมีการเปรียบเทียบกันระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากอัณฑะที่ผ่านการแช่แข็งและอัณฑะที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia เข้าสู่ปลา Grass puffer (*T. alboplumbeus*) โดยใช้เซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์เท่ากับ 38% และ 39% ตามลำดับ (Yoshikawa et al., 2018) ในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็ง เข้าสู่ปลา Manchurian trout (*B. lenok*) ที่เป็นหมันพบอัตราการเข้าอาศัยที่ 84% และ 89% ตามลำดับ (Lee and Yoshizaki, 2016) และในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia เข้าสู่ปลา Sterlet (*A. ruthenus*) พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งที่ 65% และ 55% ตามลำดับ (Psenicka et al., 2016) (ตารางที่ 2.6) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการแช่แข็งนั้นจะ

เป็นสภาวะที่เหมาะสมทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุด แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์ยังต่ำกว่าเซลล์ที่สกัดจากอัณฑะที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจึงส่งผลให้อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งในปลาผู้รับ ดังนั้นการทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาที่ได้จากการแช่แข็งนั้นจึงอาจจะต้องมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ให้เพิ่มสูงขึ้น

## 5.4 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ Oogonia

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาหลายชนิดด้วยกันซึ่งผลสำเร็จของการพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์คือ การตรวจสอบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ ซึ่งในการศึกษาของ Psenicka et al. (2016) ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia จากรังไข่ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเข้าสู่ปลา Sterlet (*A. ruthenus*) ที่เป็นหมันพบอัตราการเข้าอาศัยที่ 55% และ 70% ตามลำดับ และในการศึกษาของ Lee et al. (2016b) ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งเข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เช่นเดียวกันแต่เป็นปลาที่เป็นหมัน (Triploid) พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งที่ 72% และ 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.6) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้นำรังไข่ของปลาสวายดำทำการแช่แข็งแล้วนำเซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดได้จากรังไข่ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการแช่แข็งมาทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาสวายเผือกและตรวจสอบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับพบว่าเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 44% และเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งเท่ากับ 61% ซึ่งเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งนั้นมีอัตราการเข้าอาศัยต่ำกว่าเซลล์ที่สกัดได้จากรังไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งการแช่แข็งนั้นมีผลในการทำอันตรายต่อเซลล์จึงทำให้ประสิทธิภาพการใช้เซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้นมีอัตราการเข้าอาศัยที่ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งต่อไป เช่นการเพิ่มประชากรของเซลล์ Oogonia ให้มากขึ้นสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่ใช้เซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง

# บทที่ 6
# สรุปและข้อเสนอแนะ

## 6.1 สรุป

6.1.1 สภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลาสวายใช้สาร Extender คือ Leibovitz's L-15 Medium (L-15) ทำงานร่วมกับสาร Cryoprotectant ชนิดสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ (Permeating cryoprotectant) คือ 1.3 M Propylene glycol (PG) โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ดีที่สุดโดยมีอัตราการลดลงของอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่ 1 องศาเซลเซียส/นาที และอัตราการละลายตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง (Thawing process) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิต (Viability) ของเซลล์ Spermatogonia ดีที่สุดเท่ากับ 84.33±2.34% เมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ

6.1.2 สภาวะที่เหมาะต่อการเก็บรักษารังไข่แบบแช่แข็งของปลาสวาย สาร Extender ที่เหมาะสมคือ L-15 ทำงานร่วมกับ 1.3 M PG ที่เป็นสาร Cryoprotectant ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังผ่านการแช่แข็งดีที่สุดโดยมีอัตราการลดลงของอุณหภูมิที่ 1 องศาเซลเซียส/นาที และใช้อัตราการละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการละลาย 4 นาที ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ Oogonia สูงที่สุดเท่ากับ 84.33±1.51% เมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ

6.1.3 ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ที่ผ่านการแช่แข็งจากสภาวะในการแช่แข็งที่ดีที่สุดปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาผู้รับวัยอ่อน (Recipient larvae fish) พบว่าเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็งสามารถเข้าอาศัย (Colonization) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้เท่ากับ 65.69±7.33% และ 44.68±8.12% ตามลำดับ แต่อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (76.11±5.24% และ 61.67±12.91% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 จากข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ได้จริงสำหรับการเก็บรักษาอวัยวะสืบพันธุ์แช่แข็งของปลาสวาย แต่เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในอนาคต

นั้น ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์ให้มากยิ่งขึ้นกว่าเดิม

6.2.2 ถึงแม้ว่าจะเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่ส่งผลให้เซลล์สืบพันธุ์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูง แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์ยังต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจึงส่งผลให้อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งในปลาผู้รับ เนื่องจากการแช่แข็งนั้นอาจส่งผลในการทำอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาที่ได้จากการแช่แข็งนั้นจึงอาจจะต้องมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ให้เพิ่มสูงขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# รายการอ้างอิง


กรมประมง. 2549. การเลี้ยงปลาสวาย. *สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ,* **กรมประมง.**

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. **ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 127 หน้า

ไทยเกษตรศาสตร์. 2013. การเพาะเลี้ยงปลาสวาย. สืบค้นจาก www.thaikasetsart.com/การเพาะเลี้ยงปลาสวาย/. วันที่ 9 เมษายน 2562.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2559. กรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาด้วยวิธีการแช่แข็ง. **สังกัดคณะวิทยาศาสตร์, ศูนย์ทรัพย์สินทางปัญญาและถ่ายทอดเทคโนโลยี, สำนักบริการวิชาการ, มหาวิทยาลัยบูรพา.**

สมร พรชื่นชูวงศ์, สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง, สุรชัย ภาสดา, สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์, นิศารัตน์ ปุณารักษ์ และนฤพล สุขุมาสวิน. 2550. ผลของสาร Extenders และสาร Cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง ปีที่ 1**. 1.

อนงคณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 320-328.

อนงคณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในตู้เย็น. **โครงการคลังความรู้ดิจิทัลด้านการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 329-338

Carl, J., and Ferraris, JR. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa** 1418: 1-628.

Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). 2012. Cultured Aquatic Species Information Programme *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878). **Food and Agriculture Organization of the United Nations**.

Guan, M., Rawson, D.M., and Zhang, T. 2008. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology**. 56: 204-208.

Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., and Yoshizaki, G. 2011. Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail

Seriola quinqueradiata spermatogonia in nibe croaker Nibea mitsukurii recipient. **Fish Sci** 77: 69-77.

IUCN Red List of Threatened Species. 2017. สืบค้นจาก www.iucnredlist.org. วันที่ 14 เมษายน 2562.

Jang, T.H., Park, S.C., Yang, J.H., Kim, J.Y., Seok, J.H., Park, U.S., Choi, C.W., Lee, S.R., and Han, J. 2017. Cryopreservation and its clinical application. **Integrative Medicine Research.** 6: 12-18.

Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. 2007. Generation of Viable Fish From Cryopreserved Primordial Germ Cells. **Molecular Reproduction and Development.** 74: 207-213.

Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Junior, P.H.A.C., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., and Franca, L.R. 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiol Biochem.** 39: 3-11.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R. 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. **J. Appl. Ichthyol** 12: 99-106.

Lee, S. and Yoshizaki, G. 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology** 72: 165-168.

Lee, S., Iwasaki, Y., and Yoshizaki, G. 2016a. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology.** 73: 286-290.

Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., and Yoshizaki, G. 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 110: 1640-1645.

Lee, S., Katayama, N., and Yoshizaki, G. 2016b. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. **Biochemical and Biophysical Research Commumication** 478: 1478-1483.

Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., and PšeniČka, M. 2014. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). **Czech J. Anim. Sci**. 59 (8): 381–390.

Marck, W.V.D. 1876. Fossile fische von Sumatra. In: H.B. Geinitz & W. von der Marck, Zur Geologie von Sumatra. **Palaeontographica** 22 : 405-414

Marinovic, Z., Lujic, J., Kasa, E., Bernath, G., Urbanyi, B., and Horvath, A. 2017. Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. **General and Comparative Endocrinology**.

Mengumphan, K., Whangchai, N., and Amornlerdpison, D. 2010. Effects of extender type, sperm volum, cryoprotectant concentration, cropreservation and time duration on motility, survival and fertilization rate of Mekong giant catfish sperm. **Maejo Int. J. Sci. Technol**. 4(03): 417-427.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of Mekong Giant Catfish Sperm. **Asian Fisheries Science** 8: 211-221.

Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biol. Reprod** 86: 1-11.

Nelson, J.S., Grande, T.C., and Wilson, M.V.H. 2016. Fishes of the World. **E-book**. 752 pages.

Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. 2006. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. **J Reprod Dev** 52: 685-693.

Ponchunchoovong, S. and Plime, S. 2010. Effect of Combinations of Cryoprotectant and Freezing Rates on Cryopreservation of the Spermatozoa of Striped Catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 44: 1153-1161.

Psenicka, M., Saito, T., Rodina, M., and Dzyuba, B. 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. **Cryology** 72: 119-122.

Rani, K.U., Dhanasekar, K., and Munuswamy, N. 2016. Fertilizability of cryopreserved and cadaveric fish spermatozoa of freshwater catfish *Pangasius sutchi* (Fowler, 1937). **Aquaculture Research** 47: 1511-1518.

Rana, K.J. 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In : Cryopreservation and Freezing–Drying protocols. **Edited by Day, J.G., and McLellan, M.R. New Jersey : Humene press.** 254 pp.

Raz, E. 2004. Guidance of primordial germ cell migration. **Current opinion in cell biology.** 16(2 : 169-173

Roberts, T.R., and Jumnongthai, J. 1999. Miocene fishes from Lake Phetchabun in north central Thailand, with descriptions of new taxa of Cyprinidae, Pangasiidae, and Chandidae. **Natural History Bulletin of the Siam Society** 47: 153-189.

Suqet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., and Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**. 31: 231-243.

Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., and Kuwana, T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (Gallus domesticus). **Theriogenology 40**: 509-519.

Viveiros, A.T.M., and Godinho, H.P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian fresh water fish species: a review. **Fish Physiol Biochem**. 35: 137-150.

Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species. **Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society. Baton Rouge. Lousiana**. 264-275.

Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., and Yoshizaki, G. 2010. Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells. **Biol. Reprod** 82: 896-904.

Yoshikawa, H., Ino, Y., Shigenaga, K., Katayama, T., Kuroyanagi, M., and Yoshiura, Y. 2018. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology. **Aquaculture.** 493: 302-313.

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., and Takeuchi, Y. 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. 6: 56-61.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., and Takeuchi, T. 2002. Germ cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. **International Journal of Developmental Biology.** 44(3): 323-326.

# ภาคผนวก

## ส่วนประกอบของสาร Leibovitz's L-15 Medium (product No. A1323)

**Composition (mg/L)**

- **INORGANIC SALTS**

| | |
|---|---|
| Calcium chloride dehydrate | 185.00 |
| Magnesium chloride hexahydrate | 200.00 |
| Magnesium sulphate anhydrous | 97.72 |
| Potassium chloride | 400.00 |
| Potassium phosphate, monobasic | 60.00 |
| Sodium chloride | 8,000.00 |
| Sodium phosphate, dibasic anhydrous | 190.12 |

- **AMINO ACIDS**

| | |
|---|---|
| DL-Alpha alanine | 450.00 |
| Glycine | 200.00 |
| L-Arginine (free base) | 500.00 |
| L-Asparagine | 250.00 |
| L-Cysteine (free base) | 120.00 |
| L-Glutamine | 300.00 |
| L-Histidine (free base) | 250.00 |
| L-Isoleucine | 250.00 |
| L-Leucine | 125.00 |
| L-Lysine hydrochloride | 94.00 |
| L-Methionine | 75.00 |
| L-Phenylalanine | 125.00 |
| L-Serine | 200.00 |
| L-Threonine | 300.00 |
| L-Tryptophan | 20.00 |
| L-Tyrosine Disodium Salt | 276.16 |
| L-Valine | 100.00 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- **VITAMINS**

| | |
|---|---|
| Choline chloride | 1.00 |
| D-Ca-Pantothenate | 1.00 |
| Folic acid | 1.00 |
| Nicotinamide | 1.00 |
| Pyridoxine hydrochloride | 1.00 |
| Riboflavin-5-phosphate, Na | 0.10 |
| Thiamine monophosphate | 1.00 |
| Inositol | 2.00 |

- **OTHERS**

| | |
|---|---|
| D-Galactose | 900.00 |
| Phenol red Sodium Salt | 11.00 |
| Sodium pyruvate | 550.00 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวพงษวรรณ ขาวสะอาด เกิดวันพฤหัสบดีที่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนพระยาประเสริฐสุนทราศรัย (กระจ่าง สิงหเสนีย์) เขตวังทองหลาง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้ศึกษาต่อระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายที่โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนีย์) 4 เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ในปีการศึกษา 2558 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปี 2559

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี