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