บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการแช่แข็งและการแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ให้บริสุทธิ์ในม้า ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออัณฑะจากม้าเพศผู้ที่อายุ 12–24 เดือน และแยกเซลล์สืบพันธุ์จากเนื้อเยื่ออัณฑะโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ครั้ง นำเซลล์สืบพันธุ์ที่แยกได้มาศึกษาผลของซีรั่ม 2 ชนิด (10% ของ fetal bovine serum; FBS และ horse serum; HS) และน้ำตาล 3 ชนิด (ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส) ที่แตกต่างกันในสารแช่แข็งต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์หลังการทำละลาย และศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์สเปอมาโตโกเนียด้วยวิธีการแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธีการยึดเกาะของเซลล์ที่แตกต่างกัน (DP) 2) วิธีการปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Percoll (PDG) และ 3) วิธีการปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Percoll ที่มีความหนาแน่นต่างกันร่วมกับวิธีการยึดเกาะของเซลล์ที่แตกต่างกัน (PDG–DP) โดยการย้อมด้วยโปรตีน Ubiquitin carboxyl–terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL–1) ที่จำเพาะต่อเซลล์สเปอมาโตโกเนีย หลังการแช่แข็งและการทำละลายของเซลล์ พบว่ากลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ที่แช่ในสารแช่แข็งที่มี 10% HS เป็นส่วนประกอบมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มเซลล์ที่แช่ในสารแช่แข็งที่มี 10% FBS เป็นส่วนประกอบ ($P < 0.05$) และพบว่าการเสริมน้ำตาลซูโครสลงในสารแช่แข็งช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ดีกว่าการเสริมด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทำการแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี พบว่ากลุ่มที่แยกด้วยวิธี DP–PDG ให้ผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ UCHL–1 มากที่สุด (79.1%, 4.3 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่แยกด้วยวิธี DP (49.7%, 2.7 เท่า) และ PDG (53.2%, 2.9 เท่า) ($P < 0.05$) สรุปได้ว่าการใช้สารแช่แข็งที่มี 10% HS และน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาสภาพของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ และการแยกเซลล์ให้บริสุทธุ์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงในสารละลาย Percoll ที่มีความหนาแน่นต่างกันร่วมกับวิธีการยึดเกาะของเซลล์ที่แตกต่างกันเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สามารถช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์สเปอมาโตโกเนียในการเพาะเลี้ยงและปลูกถ่ายเซลล์ต่อไปได้

คำสำคัญ: เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ สเปอมาโตโกเนีย การแช่แข็ง การทำเซลล์ให้บริสุทธิ์ อัณฑะม้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

The objective of the present study was to develop the cryopreservation and purification methods of male germ cells in equine species. Testes from 12- to 18-month-old stallions were collected, and germ cells were isolated using two-step enzymatic digestion, and the effects of cryoprotectant supplemented with different types of serum (10% fetal bovine serum; FBS and 10% horse serum; HS) and sugar (sucrose, glucose and fructose) were tested. After freezing/thawing, three different purification techniques were compared for spermatogonia enrichment: differential plating (DP), percoll density gradient (PDG) and the combination of percoll density gradient and differential plating (PDG-DP). The isolated cells were characterized with Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL-1) staining for spermatogonia. Cells frozen/thawed in medium containing 10% HS had a significantly ($P < 0.05$) higher percentage of viable cells compared to medium containing 10% FBS. When different sugar types were added into freezing medium, sucrose- supplemented group showed a significantly better cell survival rate than groups supplemented with glucose and fructose ($P < 0.05$). For germ cell purification, DP-PDG group showed the greatest enrichment (79.1%, 4.3-fold) of UCHL-1-positive cells compared to DP (49.7%, 2.7-fold) and PGC (53.2%, 2.9-fold). In conclusion, cryopreservation in freezing medium containing 10% HS, and 0.07 M sucrose appeared to be an effective way to preserve male germ cells while the combination of differential plating and percoll density gradient techniques is a suitable method of recovering large numbers of spermatogonia for further germ cell culture and transplantation.

Keywords: male germ cells**,** spermatogonia, cryopreservation, cell purification, equine testis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved