รหัสโครงการ SUT3-304-55-24-05

รายงานการวิจัย

การผลิตตัวอ่อนกระบือปลักในหลอดทดลองจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตร้าซาวด์และไข่จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์และการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยวิธี vitrification แบบ Cryotop และ Microdrop

In vitro production of swamp buffalo embryos from oocytes collected by ultrasound-guided transvaginal ovum pick- up and oocytes fromnslaughterhouse ovaries and vitrification of blastocysts by Cryotop and Microdrop

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-55-24-05

รายงานการวิจัย

การผลิตตัวอ่อนกระบือปลักในหลอดทดลองจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตร้าซาวด์และไข่จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์และการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยวิธี vitrification แบบ Cryotop และ Microdrop

In vitro production of swamp buffalo embryos from oocytes collected by ultrasound-guided transvaginal ovum pick- up and oocytes fromnslaughterhouse ovaries and vitrification of blastocysts by Cryotop and Microdrop

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2555 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่กระบือ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย
หัวหน้าโครงการ
สิงหาคม 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อประยุกต์ใช้เทคโลยีการเก็บไข่ด้วยวิธี ovum pick up (OPU) ร่วมกับวิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการผลิตตัวอ่อนกระบือปลักในหลอดทดลอง และการเกิดของลูกกระบือหลังการย้ายฝากตัวอ่อน การทดลองที่ 1 ใช้กระบือสาว 10 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้กระตุ้นก่อนนำมาเจาะเก็บไข่โดย OPU พบว่ากระบือที่ถูกกระตุ้นรังไข่ด้วย FSH จำนวนไข่ต่อตัวที่เก็บได้มากกว่ากลุ่มของกระบือที่ไม่ได้ทำการกระตุ้นด้วย FSH (85.5% และ 76.8% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นเมื่อนำไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้รับและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH มาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง โดยใช้ไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ทำการทดลองเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH มีอัตราการแบ่งตัวและเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนในกลุ่มอื่นๆ (71.2% และ 25.5% ตามลำดับ) และไม่พบความแตกต่างของอัตราการแบ่งตัวและเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสระหว่างตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย FSH และตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ การทดลองที่ 2 นำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH และตัวอ่อนที่ผลิตได้จากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในการทดลองที่ 1 มาทำแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (CT-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (CT-VB) และใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (Microdrop-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (Mirodrop-VB) เพื่อศึกษาศักยภาพในการเจริญต่อไปได้ถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสหลังการทำละลาย โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ผลการทดลองพบว่าวิธีการแช่แข็งและแหล่งของไข่ที่ใช้ในการผลิตตัวอ่อนไม่ส่งผลต่อศักยภาพในการเจริญต่อไปได้หลังการทำละลาย ในขณะที่น้ำยาแช่แข็ง VA มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งตัวอ่อนสูงกว่าน้ำยาแช่แข็ง VB (CT-VA 87.5%, Microdrop-VA 87.5% และ CT-VB 75%, Microdrop-VB 75%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญต่อไปได้หลังการทำละลายของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งในทุกกลุ่มยังต่ำกว่าตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง การทดลองที่ 3 ทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งจากกลุ่มต่างๆ ในการทดลองที่ 2 ให้แก่กระบือตัวรับ โดยใช้ตัวอ่อนสดเป็นกลุ่มควบคุม ในกลุ่มตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่เก็บโดย OPU ตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี CT-VA ให้อัตราการเกิดของลูกกระบือเท่ากันกับการย้ายฝากตัวอ่อนสด ในขณะที่กลุ่มตัวอ่อนที่ผลิตได้จากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ที่ย้ายฝากตัวอ่อนสดพบอัตราการตั้งท้องและมีลูกกระบือเกิด ส่วนตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี CT-VA มีการตั้งท้องของกระบือตัวรับแต่แท้งภายหลัง

การทดลองนี้สรุปได้ว่าการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือที่ผลิตจากลุ่ม FSH-OPU โดยวิธี vitrification โดยใช้ CT-VA ให้ประสิทธิภาพสูงจนทำให้ได้ลูกกระบือคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อน อย่างไรก็ตามควรมีการทดลองต่อไปโดยเพิ่มจำนวนตัวอ่อนกระบือแช่แข็ง และย้ายฝากตัวอ่อนให้กระบือตัวรับจำนวนมากขึ้น

Abstract

The objective of this study was to apply the ovum pick up (OPU) technology, combined with the suitable condition of cooling system and vitrificatin solution for *in vitro* embryos production and subsequent live calf born after transfer embryos in swamp buffalo. In Experiment I, ten buffalo heifers (3-4 years) swamp buffaloes were assigned into two treatment groups: FSH treated before OPU and untreated group. The harvested oocytes of FSH treatment group were significant higher than untreated group (85.5% and 76.8%, respectively). Thereafter, oocytes derived form both OPU groups and the oocytes derived form slaughterhouse ovaries were fertilized *in vitro.* The cleavage and blastocyst rates in FSH treatment group (71.2% and 25.5%, respectively) was highest when compare with the other groups. Moreover, there was no difference in the cleavage and blastocyst rates between untreated and oocytes derived form slaughterhouse ovaries. In Experiment II, *in vitro*-produced derived from oocytes of FSH treatment before OPU and slaughterhouse ovaries blastocysts from Experiment I were vitrified using Cryotop with VA solution (CT-VA) or VB solution (CT-VB) and Microdrop with VA solution (Microdrop-VA) or VB solution (Microdrop-VB). The developmental competence after warming of vitrified blastocysts to hatching blastocyst state was not affected by the cooling systems (Cryotop or Microdrop) and source of oocytes (OPU or slaughterhouse). In addtion, the VA solution were significantly to improve development competence to hatching state after warming of vitrified buffalo embryos than VB solution (CT-VA 87.5%, Microdrop-VA 87.5% and CT-VB 75%, Microdrop-VB 75%); however, these rates were significantly lower ($P<0.05$) than fresh control group. In Experiment III, vitrified-warmed blastocysts from Experiment II were transferred into the recipients. Buffalo calves were born from both fresh and vitrified embryos (CT-VA group) that produced from FSH-OPU derived oocytes, whereas only the fresh embryos that produced from slaughterhouse derived oocytes was found to have a calvf born following embryo transfer. In CT-VA embryos group was found to have a pregnant recipient but aborted.

This study can be concluded that vitrification of buffalo embryos that produced from FSH-OPU derived oocytes, combined with CT-VA are effective to produce buffalo calves. However, more embryos for vitrification treatment and number of recipeints for embryos transfer need to be studied in the future.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อ..... ข

สารบัญเรื่อง..... ง

สารบัญตาราง..... จ

สารบัญภาพ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 1

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 1

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 3

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 4

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 4

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล 5

2.2 การทดลองที่ 1: ศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระบือปลักถึงระยะบลาสโตซีสจากการทำ IVF เปรียบเทียบระหว่างแหล่งของไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ 5

2.3 การทดลองที่ 2: หาวิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักระยะบลาสโตซีสแล้วมีอัตรารอดหลังทำละลายสูงที่สุด..... 7

2.4 การทดลองที่ 3: ศึกษาอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งที่ผลิตจากไข่ที่ได้จากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ให้แก่กระบือปลักตัวรับ..... 8

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์..... 10

บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 17

บรรณานุกรม..... 18

ภาคผนวก ก..... 23

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 จำนวนไข่ที่เก็บได้โดยวิธี OPU จากกระบือที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย FSH..... 10

ตารางที่ 2 การเจริญของตัวอ่อนกระบือหลังจากทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง 12

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนกระบือหลังจากแช่แข็งด้วยวิธีต่างๆ..... 14

ตารางที่ 4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้กระบือตัวรับ..... 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโปรแกรมการกระตุ้นด้วย FSH ก่อนการทำ OPU 5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กระบือน้ำ (water buffalo, *Bubalus bubalis*) สามารถจำแนกออกเป็น กระบือแม่น้ำ (river buffalo) และกระบือปลัก (swamp buffalo) ซึ่งกระบือแม่น้ำมีขนาดลำตัวใหญ่และเลี้ยงเพื่อการผลิตน้ำนม มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 50 ในขณะที่กระบือปลักมีขนาดลำตัวเล็กกว่า เลี้ยงเพื่อใช้แรงงานและมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 48 ปัจจุบันจำนวนประชากรกระบือปลักในประเทศไทยและทั่วโลกมีจำนวนลดลงเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรของกระบือปลัก ถึงแม้ว่าจะมีความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนกระบือปลักด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization, IVF) แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสและจำนวนของตัวอ่อนที่สามารถย้ายฝากให้แม่กระบือตัวรับยังต่ำอยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ IVF ในโค (Gasparrini, 2002; Nandi et al., 2002) วิธีการเจาะดูดไข่ด้วยการใช้อัลตร้าซาวน์ (transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration) หรือเรียกอีกอย่างว่า ovum pick up (OPU) ช่วยให้สามารถเก็บไข่จากตัวสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีซ้ำได้หลายครั้ง มีรายงานว่าไข่ที่เก็บด้วยวิธี OPU จากกระบือแม่น้ำที่มีชีวิตมีอัตราการเจริญของตัวอ่อนสูงกว่าไข่ที่ได้จากการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ (Boni et al., 1996; Manik et al., 2002; Neglia et al., 2003) อย่างไรก็ตาม การทำ OPU ในกระบือปลักมีรายงานการทำน้อยมาก (Techakumphu et al., 2004)

ปัจจุบันอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนกระบือแช่แข็งหลังการทำละลายยังต่ำอยู่มาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการผลิตตัวอ่อนกระบือปลักด้วยวิธี IVF เพื่อการค้า อัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนแช่แข็งขึ้นอยู่กับชนิดของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (cryoprotectant), สายพันธุ์ของตัวอ่อน, ระยะของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็ง รวมถึงน้ำยาและระบบที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อน อีกทั้งการศึกษาเกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งให้กับกระบือตัวรับยังมีอยู่น้อยมากในประเทศไทย

ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตตัวอ่อนกระบือปลัก จึงควรศึกษาแหล่งของไข่ที่เหมาะสมในการทำ IVF รวมทั้งวิธีการและสูตรน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลัก ตลอดจนการย้ายฝากตัวอ่อนให้กระบือตัวรับ เพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องและการคลอด

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การผลิตตัวอ่อนกระบือในหลอดทดลองมีการพัฒนา ปรับปรุงวิธีการมาโดยตลอด จนกระทั่งสามารถได้เปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสที่สูง (Gasparrini et al. 2006) และสามารถผลิตลูกกระบือเกิดขึ้นมาได้ (Hufana-Duran et al., 2004; Neglia et al., 2004; Huang et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้ยังไม่สามารถผลิตเพื่อประโยชน์ทางการค้าได้ เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายประการเช่น ได้ไข่น้อย (Gasparrini 2002), ลักษณะเฉพาะของกระบือที่มีจำนวนไพรมอเดียลและแอนทรัลฟอลลิเคิลในรังไข่น้อย (Kumar et al. 1997) การเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์มีข้อดีคือ เสียค่าใช้จ่ายไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของไข่ที่ได้มีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของสัตว์ วิธี OPU เป็นเทคนิคที่สามารถเก็บไข่จากตัวสัตว์ได้

หลายครั้งโดยใช้วิธีไม่ผ่าตัด ซึ่งจะไม่ส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ในอนาคต หลังจากความสำเร็จในการทำ OPU ในโค (Boni et al. 1994) เทคนิคนี้ได้พัฒนาจนกระทั่งประสบความสำเร็จในกระบือ (Boni et al., 1994; Boni et al., 1996; Galli et al., 2001; Manik et al., 2002; Neglia et al., 2003; Gupta et al., 2006) Neglia และคณะ (2003) รายงานว่า ตัวอ่อนกระบือแม่น้ำสายพันธุ์ Mediterranean Italian จากการทำ IVF ที่ใช้ไข่ที่เก็บด้วยวิธี OPU มีเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ สำหรับการศึกษาในกระบือปลักมีเพียงรายงานเดียวจาก Techakumphu และคณะ (2004) ซึ่งรายงานว่า การเก็บไข่กระบือปลักด้วยวิธี OPU สามารถทำซ้ำได้อย่างน้อย 5 ครั้ง โดยเว้นระยะห่างครั้งละ 2 อาทิตย์ โดยที่ไม่มีผลเสียต่อคุณภาพของไข่และจำนวนไข่ที่เก็บได้ ในรายงานของ Techakumphu นี้ ไม่มีการนำไข่ทีได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ ในการนี้ จึงควรศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระบือปลักที่ได้จาก IVF จากการใช้ไข่ที่เก็บวิธี OPU และรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

การแช่แข็งไข่และตัวอ่อนเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์หลายชนิดและใช้ผลิตตัวอ่อนโคในทางการค้าอีกด้วย (Hasler, 2003; Stringfellow and Seidel, 1998) ข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้วิธีการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือเพื่อประโยชน์ในทางการค้าคือ ขาดวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันรายงานเกี่ยวกับการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักมีจำนวนน้อยมาก ในปี 2005 Laowtammathron และคณะ ได้ทำการทดลองนำตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี linoleic acid-albumin (LAA) มาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop จากนั้นทำการละลายและเลี้ยงต่อในน้ำยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนแช่แข็งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA ไม่มีความแตกต่างกัน อีกทั้งยังพบว่าตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งมีความทนทานต่อการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification มากกว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (Laowtammathron et al., 2005) สำหรับการศึกษาในกระบือแม่น้ำของต่างประเทศ Neglia และคณะ (2004) ได้ทำการเก็บไข่ด้วยวิธี OPU จากกระบือแม่น้ำแล้วนำไปทำ IVF ได้อัตราการแบ่งตัวเป็น 48.1% อัตราการเจริญสู่ระยะมอรูล่าและบลาสโตซีสเป็น 19.6% จากนั้นนำตัวอ่อนที่ได้ไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification ทำการละลายแล้วย้ายฝากให้ตัวรับ พบว่าในกลุ่มตัวอ่อนสดไม่พบการตั้งท้องของตัวรับ แต่ในกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งพบว่าตัวรับตั้งท้อง 3 ตัว คิดเป็น 37.5% แต่แท้งไป 1 ตัว เหลือคลอด 2 ตัว (Neglia et al., 2004) ในปีเดียวกัน Hufana-Duran และคณะ ทำการแช่แข็งตัวอ่อน IVF ของกระบือแม่น้ำที่ระยะมอลูลาจนถึงระยะ แอกซ์แพนบลาสโตซีส ด้วยวิธี open pulled straw vitrification ด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย 40% Ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M Sucrose ตัวอ่อนมีอัตรารอด 83% และเมื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งให้กระบือแม่น้ำตัวรับ 55 ตัว พบว่ากระบือตัวรับตั้งท้อง 9 ตัว (16.4%) ได้ลูกเกิดมาทั้งสิ้น 6 ตัว (10.9%) (Hufana-Duran et al., 2004) และในปี 2007 ทีมเดียวกันนี้ ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนกระบือแม่น้ำแช่แข็งที่ผลิตด้วยวิธี IVF จำนวน 80 ใบ ให้กับกระบือปลักตัวรับ 40 ตัว พบว่าตัวอ่อนกระบือแม่น้ำสามารถฝังตัวในกระบือปลักตัวรับได้ โดยพบกระบือปลักตั้งท้อง 4 ตัว และอุ้มท้องจนครบกำหนดคลอดได้ มีลูกเกิดทั้งหมด 4 ตัว (10%) แต่ลูกที่เกิดมา 1 ตัว ตายหลังคลอด (Hufana-Duran et al., 2007) ต่อมาในปี 2008 Manjunatha และคณะ ได้ทำการเก็บไข่ด้วยวิธี OPU จากกระบือแม่น้ำ แล้วนำมาทำ IVF พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากไข่ OPU (30.6%) มีค่าสูงกว่าไข่จากโรงฆ่าสัตว์ (18.5%) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ได้ไปแช่แข็งด้วยวิธี in

straw vitrification ด้วยน้ำยา 25% EG + 25% DMSO + 0.3 M Sucrose พบว่าตัวอ่อนแช่แข็งจากไข่ OPU (52.8%) มีอัตราการเจริญเติบโตจนออกจากเปลือกของตัวอ่อน (blastocyst hatching rate) สูงกว่าไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (40.2%) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าแหล่งของไข่มีผลกับการเจริญของตัวอ่อน IVF และ blastocyst hatching rate หลังการแช่แข็ง (Manjunatha et al., 2008) ในปี 2009 ทีมดังกล่าวยังมีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือแม่น้ำที่ผลิตโดยการทำ IVF ด้วยวิธี in straw vitrification ด้วยน้ำยา 25% EG + 25% DMSO + 0.3 M Sucrose + 7.5 ug/ml Cytochalasin B (CB) โดยพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนระยะมอรูล่าด้วยน้ำยาที่มี CB ซึ่งเป็น cytoskeletal stabilization มีผลทำให้ตัวอ่อนแช่แข็งระยะมอลูล่ามี blastocyst hatching rate ใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอ่อนสด แต่อย่างไรก็ตาม CB ไม่สามารถเพิ่ม blastocyst hatching rate ในตัวอ่อนแช่แข็งระยะบลาสโตซีสได้ (Manjunatha et al., 2009a) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือแม่น้ำระยะมอรูลาและบลาสโตซีสโดยวิธี in straw vitrification ด้วยน้ำยาแช่แข็งสูตรต่างๆ ได้แก่ 1) 40% EG 2) 25% glycerol + 25% EG 3) 25% EG + 25% DMSO ที่เวลา 2, 4 และ 6 นาที พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยสูตรน้ำยา 25% EG + 25% DMSO ที่เวลา 2 และ 4 นาที ทำให้ได้ blastocyst hatching rate สูงที่สุด ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า blastocyst hatching rate หลังจากการทำละลายตัวอ่อนขึ้นอยู่กับน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็ง (Manjunatha และคณะ, 2009b) สำหรับในประเทศไทยซึ่งกระบือส่วนใหญ่เป็นกระบือปลัก มีเพียงรายงานเดียวเท่านั้นที่ทำแช่แข็งตัวอ่อนซึ่งได้จากการทำ IVF ด้วยวิธี slow freezingโดยใช้น้ำยา 10% Glycerol + 0.1 M Sucrose + 0.4% BSA หลังจากทำละลาย นำตัวอ่อนย้ายฝากให้กับกระบือปลักตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนสดเป็น 35.7% และตัวอ่อนแช่แข็งเป็น 5.9% ได้ลูกเกิดจากกลุ่มตัวอ่อนสดเท่านั้น (2 ตัว, 14.3%) แต่ไม่ได้ลูกเกิดจากกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็ง (Techakumphu et al., 2001) ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักโดยวิธี vitrification แล้วทำละลายตัวอ่อนแช่แข็งไปย้ายฝากให้กระบือตัวรับเพื่อศึกษาอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนหลังละลาย อัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิด

เพื่อให้การศึกษาในกระบือปลักเป็นไปแบบครบวงจร ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาผลของแหล่งของไข่ (เก็บด้วยวิธี OPU และเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์) ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน IVF จนถึงระยะบลาสโตซีส ศึกษาหาวิธีการและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อน รวมถึงอัตราตั้งท้องและการเจริญของลูกอ่อนจนครบกำหนดคลอดหลังทำการย้ายฝากตัวอ่อนให้กระบือปลักตัวรับ

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 ศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระบือปลักถึงระยะบลาสโตซีสจากการทำ IVF เปรียบเทียบระหว่างแหล่งของไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์

1.3.2 เพื่อให้ได้วิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักระยะบลาสโตซีสแล้วมีอัตรารอดหลังทำละลายสูงที่สุด

1.3.3 เพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งที่ผลิตจากไข่ที่ได้จากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ให้แก่กระบือปลักตัวรับ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเปรียบเทียบคุณภาพของไข่ที่เก็บด้วยวิธีเจาะดูดจากรังไข่กระบือปลักมีชีวิตด้วยวิธี OPU กับไข่ที่เก็บจากรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ โดยนำไข่ที่ได้มาทำให้ไข่สุกในหลอดทดลอง แล้วทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง จากนั้นนำตัวอ่อนที่ได้ไปเลี้ยงต่อในหลอดทดลองจนถึงระยะบลาสโตซีส แล้วบันทึกอัตราการเจริญเติบโต จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบ Cryotop และ Microdrop โดยเปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็ง 2 สูตรที่แตกต่างกัน จากนั้นนำตัวอ่อนแช่แข็งมาทำละลาย แล้วบันทึกอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแช่แข็งหลังการทำละลาย จากนั้นนำตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วยวิธีการและสูตรน้ำยาที่มีอัตรารอดและอัตราการเจริญหลังจากทำละลายสูงสุด ทั้งจากกลุ่มไข่ที่ได้จาก OPU และไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มาทำการย้ายฝากให้กระบือตัวรับ แล้วบันทึกอัตราการตั้งท้องและการคลอด

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง คือสามารถทราบแหล่งของไข่ที่เหมาะสมในการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ทราบวิธีการและสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ได้ข้อมูลอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งให้แก่กระบือตัวรับ นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

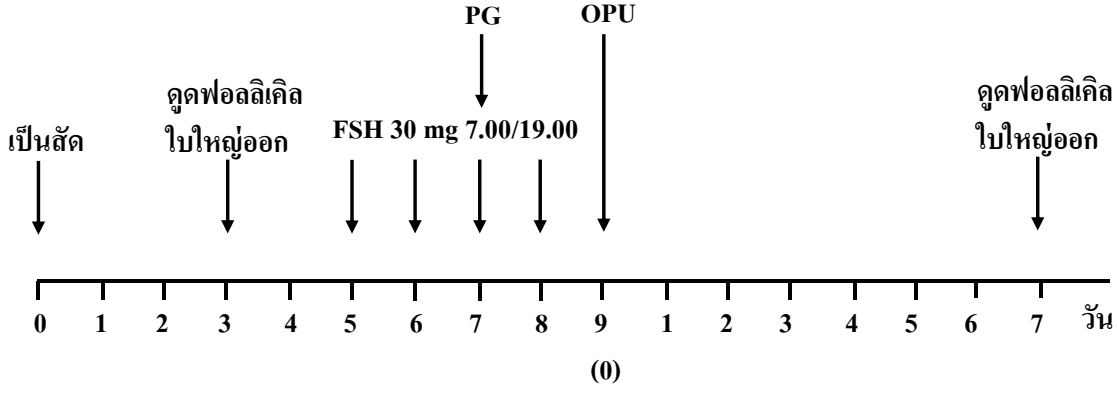
ใช้ฟาร์มศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำ OPU ในกระบือ และย้ายฝากตัวอ่อนให้แก่กระบือตัวรับ ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง การเลี้ยงตัวอ่อน การแช่แข็งตัวอ่อนและการละลายตัวอ่อน

2.2 การทดลองที่ 1

2.2.1 แหล่งของไข่ที่ใช้ทดลอง

2.2.1.1 เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU

ใช้กระบือปลักสาว อายุระหว่าง 3-4 ปี จำนวน 10 ตัว ที่มีสายพันธุ์ การจัดการเลี้ยงดู การให้อาหาร และสภาพแวดล้อมเดียวกัน โดยแบ่งกระบือออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ตัว กระตุ้นด้วย Follicle stimulating hormone (FSH, Folltropin®, Bioniche, Canada) โดยหลังจากกระบือเป็นสัด 3 วันจะดูดฟอลลิเคิลที่มีขนาดตั้งแต่ 6 mm ทิ้งไป หลังจากนั้นอีก 2 วันจะเริ่มฉีด FSH ครั้งละ 30 mg เวลา 7.00 และ 19.00 น. รวม 8 ครั้ง ปริมาณ FSH รวม 240 mg และจะทำ OPU หลังจากฉีด FSH ครั้งสุดท้าย 15-16 ชั่วโมง หลังจากทำ OPU 7 วัน จะดูดฟอลลิเคิลที่มีขนาดตั้งแต่ 6 mm ทิ้งไป และทำโปรแกรมกระตุ้นด้วย FSH เพื่อทำ OPU โดยจะทำติดต่อกัน 5 ครั้ง (รูปที่ 1) กลุ่มที่ 2 จำนวน 5 ตัว ไม่กระตุ้นด้วย FSH และทำ OPU ทุกๆสัปดาห์ รวม 5 ครั้ง การเจาะดูดไข่จากฟอลลิเคิล จะใช้เข็มโควา (Cova needle, Misawa Medical, Tokyo, Japan) ที่ต่อเข้ากับเครื่องปั๊ม (vacuum pump) และใช้น้ำยา modified Dulbecco Phosphate Buffer Saline (mDPBS) ที่เติมด้วย 10 IU/mL heparin และ 0.1% polyvinyl alcohol เป็นน้ำยาเจาะดูดไข่ ขณะที่เจาะดูดไข่ให้ทำการชะล้างท่อเข็มด้วยสารละลายดูดเจาะไข่ทุกๆ 2 นาที หลังจากการดูดเจาะไข่เสร็จสิ้น นำน้ำยาที่ได้มากรองด้วยชุดกรอง (Emcon Filter, Spring Valley, WI, USA) ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) อย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปเข้าเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดทดลอง



รูปที่ 1 แสดงโปรแกรมการกระตุ้นด้วย FSH ก่อนการทำ OPU

2.2.1.2 เก็บจากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์

เก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มขนาด 21G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากถุงรังไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น นำมาล้างในน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) + 0.1% polyvinyl pyrolidone (PVP, Sigma, P-0930) อย่างน้อย 5 ครั้ง ก่อนนำเข้าเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดทดลอง

2.2.2 การทำให้ไข่สุกในหลอดทดลอง

นำไข่ที่ได้จากทั้ง 2 แหล่ง มาเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation, IVM) ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) ไป เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098), 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1µg/ml 17β -estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (Parnpai และคณะ, 1999)

2.2.3 การเตรียมเซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells)

เก็บท่อนำไข่จากโคภายหลังการถูกฆ่า ณ โรงฆ่าสัตว์ ท่อนำไข่ที่เก็บได้ต้องผ่านการชะล้างทำความสะอาดในสารละลาย 0.9% NaCl โดยแช่ในน้ำแข็งขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดภายนอกท่อนำไข่ด้วย 70 % ethanol 2 ครั้ง เก็บรวบรวมเซลล์บุท่อนำไข่โดยใช้ปากคีบขูดเซลล์จากภายในท่อนำไข่ออกมาล้างด้วยน้ำยา mDPBS 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ใช่เซลล์บุท่อนำไข่ออก จากนั้นล้างในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS 2 ครั้ง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโดยย้ายใส่ใน 100 µl หยดน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm แล้วปิดด้วย mineral oil เพาะเลี้ยงภายในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อนำไข่ไว้ทำ co-culture กับตัวอ่อน (Parnpai และคณะ, 1999)

2.2.4 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดทดลอง

นำน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70 % ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วดูดน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด Conical ขนาด 15 ml ที่มีน้ำยา TALP ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปวางเอียง 45 องศา ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวจะเกิดความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิโดยมีความสามารถในการเคลื่อนที่เร็ว (hyperactive) และเกิดคาพาซิเตชั่น (capacitation) ทำให้เพิ่มอัตราการเจาะทะลุ (penetration) ชั้นของเซลล์คิวมูลัสและ zona pellucida (Dode et al., 2002; Saito, 1994) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1 ml ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา TALP 5 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้

เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วยน้ำยา TALP ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัวต่อซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µl/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

2.2.5 การปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization, IVF)

นำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัส ออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา TALP 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 13.1.5 แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง

2.2.6 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*in vitro* embryo culture, IVC)

เมื่อบ่มไข่และอสุจิด้วยกันครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปล้างด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (modified synthetic oviduct fluid, mSOF; Dinnyes et al., 1996) ที่เติมด้วย 3 mg/mL BSA (mSOF-BSA) เพื่อให้อสุจิ และเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบ ๆไข่ออกให้มากที่สุด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในสัดส่วน 20 ใบ/100 µlในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOF-BSA (10 ใบ/100 µl) ร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 4 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาออกครึ่งหนึ่งทุกๆวัน

2.2.7 ระเบียบแผนการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อน IVF ที่ได้จากไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ เจาะเก็บไข่จากกระบือ 10 ตัว และเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ แล้วนำไข่ที่ได้มาเลี้ยงให้สุกในหลอดทดลอง ทำ IVF และ IVC โดยบันทึกอัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส โดยทำการทดลองอย่างน้อย 10 ครั้ง และจำนวนไข่อย่างน้อยครั้งละ 100 ใบ จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ไปใช้ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

2.3 การทดลองที่ 2

2.3.1 การแช่แข็งและทำละลายตัวอ่อนด้วยน้ำยาสูตร VA

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 6 วัน จากการทดลองที่ 1 มาทำการแช่แข็ง โดยนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย TCM199 Hepes (Sigma, H-4034) + 10% ethylene glycol (EG, Sigma, E-9129) + 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, D-1435) เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา vitrification solution ซึ่งประกอบด้วย TCM199 Hepes + 20% EG+20% DMSO + 0.5 M sucrose (Sigma, S-1888) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำตัวอ่อนกลุ่มละ 1-2 ใบ วางบนปลายของ Cryotop แล้วนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วทำการปิดครอบปลาย Cryotop หรือ นำตัวอ่อน 1-2 ใบ ที่มีน้ำยา 1-2 µl ไปหยดลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งอยู่ในอะลูมิเนียมฟอยด์ที่ลอยอยู่ไนโตรเจนเหลว แล้วใช้ปากคีบคีบหยดน้ำยาที่แช่แข็ง (Microdrop) เก็บไว้ในหลอด Cryotube จากนั้นนำตัวอ่อนที่แช่แข็งไปเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1-2 เดือน

นำตัวอ่อนที่แช่แข็งมาทำการละลาย โดยนำปลายของ Cryotop หรือหยดน้ำยาที่แช่แข็ง (Microdrop) ไปไว้ในน้ำยา TCM199 Hepes + 20% FBS + 0.5 M sucrose 3 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 mm ที่ 38.5 ºC นาน 5 นาที แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา TCM199 Hepes + 20% FBS ที่มี 0.4 M sucrose, 0.3 M sucrose, 0.2 M sucrose, 0.1 M sucrose และ 0 M sucrose ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งจะพักตัวอ่อนในน้ำยานานหลุมละ 2 นาที

2.3.2 การแช่แข็งและทำละลายตัวอ่อนด้วยน้ำยาสูตร VB

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 6 วัน จากการทดลองที่ 1 มาทำการแช่แข็ง โดยนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา equilibration medium ซึ่งประกอบด้วย TCM199 Hepes + 20% FBS + 4% EG เป็นเวลา 12-15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา vitrification solution ซึ่งประกอบด้วย TCM199 Hepes + 35% EG + 50 mg/ml PVP + 0.4 M trehalose (Sigma, T-0167) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำตัวอ่อนกลุ่มละ 1-2 ใบ วางบนปลายของ Cryotop แล้วนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วทำการปิดครอบปลาย Cryotop หรือนำตัวอ่อน 1-2 ใบ ที่มีน้ำยา 1-2 µl ไปหยดลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งอยู่ในอะลูมิเนียมฟอยด์ที่ลอยอยู่ไนโตรเจนเหลว แล้วใช้ปากคีบคีบหยดน้ำยาที่แช่แข็ง (Microdrop) เก็บไว้ในหลอด Cryotube (Microdrop) จากนั้นนำตัวอ่อนที่แช่แข็งไปเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1-2 เดือน

นำตัวอ่อนที่แช่แข็งมาทำการละลาย โดยนำปลายของ Cryotop หรือหยดน้ำยาที่แช่แข็ง (Microdrop) ไปไว้ในน้ำยา TCM199 Hepes + 20% FBS + 0.15 M trehalose 3 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 mm ที่ 38.5 ºC นาน 3 นาที แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา TCM199 Hepes + 20% FBS ที่มี 0.0075 M trehalose, 0.0375 M trehalose และ 0 M trehalose ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งจะพักตัวอ่อนในน้ำยานานหลุมละ 2 นาที

2.3.3 อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำละลาย

นำตัวอ่อนหลังจากการทำละลายไปล้างในน้ำยา mSOF+BSA จำนวน 3 ครั้ง แล้วเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตโดยดูรูปร่างของตัวอ่อน จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนต่อไปนาน 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

2.3.4 ระเบียบแผนการทดลอง

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทดลองที่ 1 ทั้งกลุ่มของไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ มาทำการแช่แข็งโดยทำการเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง (Cryotop และ Microdrop) และน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็ง (VA และ VB) ตัวอ่อนที่ทำการแช่แข็งจะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1-2 เดือน แล้วจึงนำมาละลาย ตรวจสอบอัตรารอดชีวิตและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

2.4 การทดลองที่ 3

2.4.1 การย้ายฝากตัวอ่อน

เตรียมกระบือตัวรับอายุระหว่าง 3-4 ปี ให้เป็นสัดพร้อมกัน โดยจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนสด อีกกลุ่มหนึ่งจะได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง โดยทำการฝังหูด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Syncromate B, Intervet) นาน 8 วัน แล้วดึงฮอร์โมนออกจากใบหูและฉีด $PGF_2\alpha$ 375 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และตรวจการเป็นสัดหลังจากฉีดฮอร์โมน 48-72 ชั่วโมง การย้ายฝากตัวอ่อนทำโดยนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา SynGro holding medium (Bioniche, Canada) 3 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน 2 ใบ ในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ซีซี แล้วนำไปใส่ในปืนฉีดตัวอ่อน (IMV) แล้วสวมด้วย ET sheath และ sanitary sheath ตัวอ่อนจะได้รับการย้ายฝากเข้าสู่ปลายปีกมดลูกด้านที่รังไข่มี CL ของกระบือตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-7.5 วัน ตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์ และสรรเพชญ (2530) ในการทดลองครั้งนี้ จะทำการฝากตัวอ่อนให้แก่กระบือตัวรับ จำนวน 2 ตัวอ่อน/1 ตัวรับ ทั้งในกลุ่มของตัวอ่อนสด และตัวอ่อนแช่แข็ง

กระบือตัวรับจะได้รับการตรวจการตั้งท้อง ที่วันที่ 45 หลังจากย้ายฝากด้วยอัลตร้าซาวด์ และจะได้รับการล้วงตรวจทางทวารหนักอีกครั้งภายหลังการย้ายฝาก 60 วัน กระบือที่ตั้งท้อง จะได้รับการล้วงตรวจเพื่อยืนยันทุกเดือน จนกว่าจะครบกำหนดคลอด

2.4.2 ระเบียบแผนการทดลอง

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทดลองที่ 1 ทั้งกลุ่มของไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (กลุ่มไข่สด) และตัวอ่อนหลังการทำละลายจากการทดลองที่ 2 ทั้งกลุ่มไข่ที่เก็บจากกระบือมีชีวิตด้วยการทำ OPU และไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ โดยเลือกตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธีและน้ำยาแช่แข็งที่ให้อัตรารอดชีวิตและอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการละลายสูงสุด (กลุ่มไข่แช่แข็ง) มาย้ายฝากให้กระบือตัวรับ 2 ตัวอ่อนต่อตัวรับ ตรวจสอบการตั้งท้องและการเจริญของลูกอ่อนจนครบกำหนดคลอด

2.4.3. สถิติที่ใช้ทดลอง

ใช้ Chi square วิเคราะห์ผลการทดลง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $P<0.05$

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

จากตารางที่ 1 ผลการเจาะเก็บไข่โดยการทำ OPU ในทดลองนี้ พบว่ากระบือสาวกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FSH ก่อนการทำ OPU ได้อัตราการเก็บไข่ (7.2 ใบ/ครั้ง/ตัว) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่กระตุ้นด้วย FSH (2.8 ใบ/ครั้ง/ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ไข่ที่ใช้ได้ของกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FSH (85.5%; 153/179) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น FSH (76.8%; 53/69) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boni (1994), Boni และคณะ (1997) และ Techakumpu และคณะ (2000a, b; 2004a, b) ซึ่งพบว่าการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH ในกระบือสามารถเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวที่เก็บได้ นอกจากนี้ Promdireg และคณะ (2005) รายงานว่าการกระตุ้นรังไข่ด้วย FSH มีผลต่อการเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวที่เก็บได้ทั้งในกระบือระยะให้นมและระยะพัก เช่นเดียวกับที่พบในรายงานก่อนหน้านี้ของ Techakumphu และคณะ (2004a) ที่พบว่าการกระตุ้นรังไข่ด้วย FSH มีผลต่อการเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวในกระบือที่เก็บได้ก่อนวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งผลของการกระตุ้นรังไข่กระบือด้วย FSH สอดคล้องกับผลการศึกษาในโค ที่พบว่า การกระตุ้นรังไข่โคด้วย FSH จะช่วยเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวได้ (Bungartz et al., 1995) และการให้ FSH ในแม่โคที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์จะช่วยเพิ่มจำนวนไข่ที่สามารถเจาะเก็บได้มากกว่ากลุ่มของแม่โคที่ไม่ถูกจะตุ้นด้วย FSH (Looney et al., 1994) อย่างไรก็ตามปริมาณรวมของ FSH ที่ใช้กระตุ้นรังไข่กระบือในการศึกษานี้ (240 mg) น้อยกว่าที่ใช้ในรายงานก่อนหน้านี้ของ Techakumphu และคณะ (2000a, b; 2004a, b) และ Promdireg และคณะ (2005) ที่ใช้ FSH รวม 400 mg/ตัว อาจเนื่องมากจากในการทดลองนี้มีความถี่ของการเจาะเก็บไข่โดยการทำ OPU สัปดาห์ละครั้ง แต่ในการทดลองดังกล่าวข้างต้นมีความถี่ของการเจาะเก็บไข่โดยการทำ OPU 2 สัปดาห์ต่อครั้ง แต่ให้ผลในการเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวในกระบือที่เก็บได้เช่นกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 จำนวนไข่ที่เก็บได้โดยวิธี OPU จากกระบือที่กระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วย FSH

การกระตุ้น FSH	จำนวนไข่ที่เก็บได้	จำนวน (%) ไข่ที่ใช้ได้	จำนวน (%) ไข่ที่ใช้ไม่ได้
กระตุ้น	179[a] (7.2 ใบ/ครั้ง/ตัว)	153 (85.5)[a] (6.1 ใบ/ครั้ง/ตัว)	26 (14.5)[a] (1.0 ใบ/ครั้ง/ตัว
ไม่กระตุ้น	69[b] (2.8 ใบ/ครั้ง/ตัว)	53 (76.8)[b] (2.1 ใบ/ครั้ง/ตัว)	16 (23.2)[b] (0.6 ใบ/ครั้ง/ตัว)

[a,b] Means within columns with different superscripts differ (P<0.05); 5 replications.

จากตารางที่ 2 ผลการนำไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และไข่ที่เก็บโดย OPU มาทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง และนำไปเลี้ยงเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดทดลอง จากการทดลองนี้ ไข่ที่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH ให้อัตราการแบ่งตัว (109/153, 71.2%) สูงกว่าไข่ที่เก็บโดย OPU จากกระบือที่ไม่กระตุ้นด้วย FSH (32/53, 60.4%) และไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ (102/170, 60.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะ 5-8 เซลล์ มอรูลา และบลาสโตซีส ของไข่ไข่ที่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH (76/153, 49.7%; 49/153, 32.0% และ 39/153, 25.5% ตามลำดับ) สูงกว่าไข่ที่เก็บโดย OPU จากกระบือที่ไม่กระตุ้นด้วย FSH (22/53, 41.5%; 12/53, 22.6% และ 8/53, 15.1% ตามลำดับ) และไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ (69/170, 40.6%; 39/170, 22.9% และ 29/170, 17.0% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาก่อนหน้านี้ในกระบือแม่น้ำรายงานว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บด้วยวิธี OPU สูงกว่าการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (Neglia และคณะ, 2003; Manjunatha และคณะ, 2008) เนื่องมาจากไข่ได้จากรังไข่ที่เจาะเก็บโดย OPU มีความแปรปรวนของคุณภาพไข่น้อยกว่าไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งไม่ทราบแหล่งพันธุกรรมของสัตว์ (Manjunatha และคณะ, 2008) จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับผลในการทดลองนี้ที่พบว่าไข่ได้จากรังไข่ที่เจาะเก็บโดย OPU ให้อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสสูงกว่าไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์

อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่ากลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บโดย OPU ของกระบือที่ไม่กระตุ้นด้วย FSH เมื่อนำมาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ให้อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะ บลาสโตซิสไม่แตกต่างจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ เนื่องจากการกระตุ้นด้วย FSH ทำให้รังไข่ของกระบือเพิ่มอัตราการเจริญของฟอลลิเคิล และเกิดโดมิแนนท์ฟอลลิเคิล (≥10 มิลลิเมตร) ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของไข่เมื่อนำไปเลี้ยงให้สุกในหลอดทดลอง ซึ่งกลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ของกระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH และกลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์จะมีฟอลลิเคิลขนาดเล็กขนาด 1-2 มิลลิเมตรอยู่มาก และฟอลลิเคิลขนาดเล็กเหล่านี้อาจเป็นฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลาย (atresia) ซึ่งไข่ที่อยู่ภายใต้ฟอลลิเคิลเหล่านี้มีคุณภาพต่ำ (Manjunatha และคณะ, 2008) จากรายงานการศึกษาของ Baruselli และคณะ (1997) พบว่าอัตราการการเกิดปฏิสนธิของไข่มีความสัมพันธ์กับขนาดของฟอลลิเคิลซึ่งสูงในแอนทรัลฟอลลิเคิล ดังนั้นกลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ของกระบือที่ถูกกระตุ้นด้วย FSH เมื่อนำมาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง จึงให้อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสสูงกว่ากลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ของกระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้น หรือกลุ่มของไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์

ตารางที่ 2 การเจริญของตัวอ่อนกระบือหลังจากทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง

ชนิดของไข่	จำนวนไข่ทำ IVF	จำนวนไข่แบ่งตัว (%)	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ		
			5-8 เซลล์ (%)	มอรูลา (%)	บลาสโตซีส (%)
ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์	170	102[a] (60.0)	69[a] (40.6)	39[a] (22.9)	29[a] (17.0)
เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH	153	109[b] (71.2)	76[b] (49.7)	49[b] (32.0)	39[b] (25.5)
เก็บโดย OPU จากกระบือที่ไม่กระตุ้นด้วย FSH	53	32[a] (60.4)	22[a] (41.5)	12[a] (22.6)	8[a] (15.1)

[a,b] Means within columns with different superscripts differ (P<0.05)

5 replications

จากตารางที่ 3 นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตได้ดังตารางที่ 2 มาทำแช่แข็งโดยแบบ vitrification โดยใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (CT-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (CT-VB) และใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (Microdrop-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (Mirodrop-VB) แล้วนำตัวอ่อนแช่แข็งจากวิธีดังกล่าวมาทำละลายแล้วเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อศึกษาอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่ง บลาสโตซีส โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็นตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง จากการทดลองพบว่า ตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งCT-VA (5/6, 83.3%) และ Microdrop-VA (5/6, 83.3%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวอ่อนแช่แข็งกลุ่ม CT-VB (4/6, 66.7%) และ Microdrop-VB (4/6, 66.7%) แต่ยังต่ำกว่าตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และตัวอ่อนที่ผลิตจากจากไข่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส ของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็ง CT-VA (7/8, 87.5%) และ Microdrop-VA (7/8, 87.5%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวอ่อนแช่แข็งกลุ่ม CT-VB (6/8, 75%) และ Microdrop-VB (6/8, 75%) แต่ยังต่ำกว่าตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง

ผลการทดลองข้างต้นพบว่าแหล่งของตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์หรือจากไข่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสหลังการทำละลายของตัวอ่อนแช่แข็ง ซึ่งตรงกันข้ามกับผลการศึกษาของ Manjunatha และคณะ (2008) ในกระบือแม่น้ำที่พบว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่เก็บโดย OPU เมื่อนำมาทำการแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 mL มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสหลังการทำละลายสูงกว่ากลุ่มของตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการใช้น้ำยาแช่แข็งและวิธีการแช่แข็งที่ต่างกัน ซึ่งการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Microdrop ที่ใช้ในการทดลองนี้นั้นตัวอ่อนจะสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง รวมถึงการใช้ปริมาณของน้ำยาแช่แข็งที่น้อยมาก (1-2 µl) ทำให้อัตราการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่าง

รวดเร็ว ส่งผลต่อการลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่แข็ง (Papis และคณะ, 2000; Kuwayama และ Kato, 2000) ในขณะที่การแช่แข็งโดยการใช้หลอดฟางขนาด 0.25 mL นั้นเป็นการแช่แข็งในระบบปิดที่ตัวอ่อนจะไม่สัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง และควบคุมปริมาณของน้ำยาแช่แข็งได้ยากเนื่องจากต้องมองผ่านเข้าไปในหลอดซึ่งทำได้ยากกว่าการแช่แข็งโดยการใช้ Cryotop หรือ Microdrop Shaw และคณะ (1991) รายงานว่าอัตราการลดอุณหภูมิของการแช่แข็งด้วยการใช้หลอดฟางขนาด 0.25 mL อยู่ที่ 2,500 ºC/นาที ในขณะที่การแช่แข็งด้วย Cryotop มีอัตราการลดอุณหภูมิอยู่ที 20,000 ºC/นาที (Kuwayama และคณะ, 2005) ซึ่งอาจส่งผลให้ตัวอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าในการทดลองนี้

การแช่แข็งตัวอ่อนกระบือด้วยวิธี Cryotop หรือ Microdrop ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสหลังการทำละลายในการทดลองนี้ แต่พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือด้วยน้ำยาแช่แข็ง VA ตัวอ่อนมีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสหลังการทำละลายสูงกว่ากลุ่มของตัวอ่อนกระบือที่แช่แข็งด้วยน้ำยา VB ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในการแช่แข็งไข่กระบือระยะ MII ที่พบว่ากลุ่มของไข่กระบือระยะ MII ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA แล้วทำการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Microdrop มีอัตราการรอดหลังการทำละลายรวมถึงอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่สูงกว่ากลุ่มของไข่กระบือระยะ MII ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VB ในการแช่แข็งในทั้งสองวิธีการ (Liang และคณะ, 2012) เนื่องจากสูตรน้ำยาแช่แข็ง VA ประกอบด้วยสารป้องกันการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์ได้สองชนิด (20% EG+20% DMSO) ทำให้ลดความเข้มข้นของการใช้สารป้องกันการแช่แข็งลง และสามารถลดความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งแต่ละตัวที่ใช้ประกอบกันในสูตรน้ำยา ซึ่งการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์เพียงชนิดเดียวในสูตรน้ำยาแช่แข็ง ส่งผลให้มีความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งชนิดใดชนิดหนึ่งในปริมาณที่สูงเกินไป (Sharma และคณะ, 2010) เช่น ผลของการใช้ความเข้มข้นของ EG ที่ 35% ในสูตรน้ำยา VB ในการทดลองนี้ นอกจากนี้ Vajta และคณะ (1999) รายงานว่าการใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย EG และ DMSO ให้ผลดีกว่าการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์เพียงชนิดเดียวในสูตรน้ำยา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Agca และคณะ (1998) พบว่า DMSO มีอัตราการแพร่ผ่านเซลล์สูงกว่า EG แต่พบว่า EG มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอ่อนต่ำเมื่อเทียบกับสารป้องกันการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น DMSO (Newton และ Subramoniam, 1996) นอกจากนี้ยังพบรายงานประสิทธิภาพของการใช้สูตรน้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย DMSO และ EG ในการแช่แข็งไข่ระยะ MII ด้วยหลอดฟาง ซึ่งเมื่อนำไข่หลังการทำละลายมาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าตัวอ่อนสามารถเจริญสู่ระยะมอรูล่า 11.5% และเข้าสู่ระยะบลาสโตซิส 5.5% (Gautam และคณะ, 2008)

เนื่องจากจำนวนไข่กระบือที่ใช้ในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง เพื่อผลิตตัวอ่อนมีจำนวนจำกัด ทำให้ได้จำนวนตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซิสที่ใช้ในการทดลองได้น้อย ดังนั้นจึงควรทำการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซิสให้มากขึ้น เพื่อให้การสรุปผลของวิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักระยะบลาสโตซีสมีความแม่นยำมากขึ้น

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนกระบือหลังจากแช่แข็งด้วยวิธีต่างๆ

แหล่งตัวอ่อน	ชนิดตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนแช่แข็ง	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้หลังละลาย (%)	จำนวนตัวอ่อนเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (%)
ตัวอ่อนผลิตจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์	ตัวอ่อนสด	-	5	5[a] (100)
	CT-VA	6	6 (100)	5[b] (83.3)
	CT-VB	6	6 (100)	4[c] (66.7)
	Microdrop-VA	6	6 (100)	5[b] (83.3)
	Microdrop-VB	6	6 (100)	4[c] (66.7)
ตัวอ่อนผลิตจากไข่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH	ตัวอ่อนสด	-	7	8[a] (100)
	CT-VA	8	8 (100)	7[b] (87.5)
	CT-VB	8	8 (100)	6[c] (75.0)
	Microdrop-VA	8	8 (100)	7[b] (87.5)
	Microdrop-VB	8	8 (100)	6[c] (75.0)

[a,b,c] Means within columns with different superscripts differ (P<0.05)

3 replications

CT-VA: ใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA

CT-VB: ใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VB

Microdrop-VA: ใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA

Microdrop-VB: ใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VB

จากตารางที่ 4 นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่ได้จากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่กระบือสองกลุ่มคือ (1) ไข่จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และ (2) ไข่ที่ได้มาจากรังไข่เก็บโดย OPU จากกระบือที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กระตุ้นด้วย FSH มาทำการแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (CT-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (CT-VB) และใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA (Microdrop-VA) และน้ำยาแช่แข็ง VB (Mirodrop-VB) หลังจากนั้นนำตัวอ่อนแช่แข็งจากวิธีดังกล่าวมาทำการละลายแล้วเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาทำการย้ายฝากให้กับกระบือตัวรับ เพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องและการเกิดลูกแรกคลอด โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เป็นตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง จากผลการทดลองพบการตั้งท้องของตัวรับจำนวน 50% (1/2) ของการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งในกลุ่ม CT-VA ได้มาจากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่กระบือจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการเกิดลูกแรกคลอดของการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในกลุ่มนี้ ส่วนผลของการย้ายฝากตัวอ่อนสดที่ได้มาจากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่กระบือจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์นั้นพบว่ามีตัวรับตั้งท้องจำนวน 50% (1/2) และเกิดลูกกระบือแรกคลอดจำนวน 1 ตัว นอกจากนี้ผลของการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้มาจากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่จากรังไข่ที่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH พบการตั้งท้องของตัวรับจำนวน 50% (1/2) และเกิดลูกกระบือแรกคลอด 1 ตัว จากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในกลุ่ม CT-VA และในกลุ่มตัวอ่อนสด

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซิสที่ผลิตจากไข่ทั้งสองแหล่งดังกล่าวข้างต้นด้วยการใช้น้ำยาสูตร VA ร่วมกับการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ให้ผลดีกว่าการใช้น้ำยาสูตร VB หรือการแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ในแง่ของการย้ายฝากตัวอ่อน ที่ทำให้เกิดการตั้งท้องของตัวรับและเกิดลูกกระบือแรกคลอดเช่นเดียวกับการย้ายฝากตัวอ่อนสด ในปี 2012 Yang และคณะได้รายงานผลสำเร็จของการใช้น้ำยาสูตร VA แช่แข็งตัวอ่อนกระบือที่ได้มาจากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลองของไข่กระบือจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ผลการทดลองพบอัตราการตั้งท้องของตัวรับ และเกิดลูกกระบือแรกคลอดเช่นเดียวกับที่พบในการทดลองนี้ นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย EG และ DMSO (16.5% EG+16.5% DMSO) ร่วมกับการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือระยะแฮชบลาสโตซิส ที่ได้มาจากการทำปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของไข่จากรังไข่ที่เก็บโดย OPU ซึ่งพบว่ากลุ่มตัวรับที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนในกลุ่มนี้จะสามารถพยุงการตั้งท้องไปจนถึงระยะคลอดได้ถึง 20% (Boccia และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอ่อนที่นำไปทำการแช่แข็งในการทดลองนี้ยังมีจำนวนน้อย ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพิ่ม เพื่อให้ทราบถึงวิธีการแช่แข็งและชนิดของน้ำยาแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพต่ออัตราการรอดหลังการทำละลายของตัวอ่อนแช่แข็งที่ผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดทดลองของไข่ที่ได้มาจากรังไข่เก็บโดย OPU หรือทราบว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดทดลองของไข่ที่ได้มาจากรังไข่เก็บโดย OPU มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ไข่กระบือจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์หรือไม่

ตารางที่ 4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้กระบือตัวรับ

แหล่งตัวอ่อน	ชนิดตัวอ่อน	จำนวนตัวรับฝากตัวอ่อน	จำนวนตัวรับตั้งท้อง (%)	จำนวนตัวรับคลอดลูก (%)
ตัวอ่อนผลิตจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์	ตัวอ่อนสด	**2**	**1 (50)**	**1 (100)**
	CT-VA	**2**	**1 (50)**	**0 (0)**
	CT-VB	2	0	0
	Microdrop-VA	2	0	0
	Microdrop-VB	2	0	0
ตัวอ่อนผลิตจากไข่เก็บโดย OPU จากกระบือที่กระตุ้นด้วย FSH	ตัวอ่อนสด	2	1 (50)	1 (100)
	CT-VA	2	1 (50)	1 (100)
	CT-VB	2	0	0
	Microdrop-VA	2	0	0
	Microdrop-VB	2	0	0

CT-VA: ใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA

CT-VB: ใช้ Cryotop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VB

Microdrop-VA: ใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VA

Microdrop-VB: ใช้ Microdrop ที่ใช้น้ำยาแช่แข็ง VB

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตตัวอ่อนกระบือปลักในหลอดทดลองจากจากไข่ได้จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และจากการทำ OPU นอกจากนี้ยังสามารถผลิตลูกกระบือจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งแบบ vitrification ด้วยวิธี CT-VA ในการทดลองที่ 1 เมื่อกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH ในกระบือที่ทำ OPU พบว่าการกระตุ้นรังไข่ด้วย FSH สามารถเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวที่เก็บได้มากกว่ากลุ่มของกระบือที่ไม่ได้ทำการกระตุ้นด้วย FSH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH และไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH มาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิส โดยใช้ไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH มีอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสสูงสุด และไม่พบความแตกต่างของอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสระหว่างตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่เก็บโดย OPU จากกลุ่มกระบือที่ได้ไม่รับการกระตุ้นด้วย FSH และตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ จากนั้นเมื่อนำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 1 มาแช่แข็งในการทดลองที่ 2 ด้วยวิธี Cryotop หรือ Microdrop โดยการใช้น้ำยาแช่แข็งสูตร VA หรือ VB ซึ่งพบว่าวิธีการแช่แข็งและแหล่งของไข่ที่ใช้ในการผลิตตัวอ่อนไม่ส่งผลต่อศักยภาพในการเจริญเติบโตต่อไปได้หลังการทำละลาย ในขณะที่น้ำยาแช่แข็งสูตร VA มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซิสสูงกว่าน้ำยาแช่แข็งสูตร VB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งจากกลุ่มต่างๆ ดังการทดลองที่ 2 ให้แก่แม่กระบือตัวรับ โดยใช้ตัวอ่อนสดเป็นกลุ่มควบคุม และพบว่าตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี CT-VA มีประสิทธิภาพและให้อัตราการเกิดของลูกกระบือแรกคลอดเท่ากันกับการย้ายฝากตัวอ่อนสดให้กระบือตัวรับ ในกลุ่มของตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่เก็บโดย OPU ซึ่งประโยชน์จากงานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการผลิตกระบือปลักพันธุ์ดีได้ในอนาคต

อย่างไรก็ตามตัวอ่อนที่ใช้ในการย้ายฝากให้ตัวรับยังมีจำนวนน้อย ดังนั้นควรทำการทดลองต่อ โดยการคัดเลือกกระบือปลักพันธุกรรมดีมาเก็บไข่เพื่อนำไปปฏิสนธิกับน้ำเชื้อกระบือปลักพันธุกรรมดี เพื่อนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้กระบือตัวรับ ซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุกรรมดีได้มากขึ้น

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อน โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

Agca, Y., Liu, J., Peter, A.T., Critser, E.S. and Critser, J.K. 1998. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 408–415.

Baruselli, P.S., Mucciolo, R.G., Visintin, J.A., Viana, W.G., Arruda, R.P., Madureira, E.H., Oliveira, C.A. and Molero-Filho, J.R. 1997. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo. *Theriogenology* 47: 1531–1547.

Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Neglia, G., Vecchio, G., Campanile, G., Zicarelli, L. and Gasparrini, B. 2013. Developmental Speed Affects the Cryotolerance of *In Vitro* Produced Buffalo (*Babalus Bubalis*) Embryos. *ITAL. J. ANIM. SCI.* 12: 1-5.

Boni, R., Di Palo, R., Barbieri, V. and Zicarelli, L. 1994. Ovum pick up in deep anestrus buffaloes. *Proc IV World Buffalo Congr*. Sao Paolo, Brazil. 3: 480–482.

Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43: 667–675.

Boni, R., Roviello, S. and Zicarelli, L. 1996. Repeated ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899–909.

Boni, R., Roviello, S., Gasparrni, B. and Zicarelli, L. 1997. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up andin vitro embryo production in Italian buffalo cows. *Proc V World Buffalo Congr*. Caserta, Italy. pp. 787–792.

Dinnyes, A., Carolan, C., Lonergan, P., Massip, A. and Mermillod, P. 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology* 46: 1425-1439.

Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R. and Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341–1357.

Gautam, S.K., Verma, V., Palta, P., Chauhan, M.S. and Manik, R.S. 2008. Effect of type of cryoprotectant on morphology and developmental competence of *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes subjected to slow freezing or vitrification. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 490–496.

Dode, M.A., Rodovalho, N.C., Ueno, V.G. and Fernandes, C.E. 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 15-23.

Gasparrini, A. 2002. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57: 237–256.

Gasparrini, B., Boccia, L., Marchandise, J., Di Palo, R., George, F., Donnay, I. and Zicarelli, L. 2006. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 65: 275–287.

Gupta, V., Manik, R.S., Chauhan, M.S., Singla, S.K., Akshey, Y.S. and Palta, P. 2006. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): Oocyte recovery and quality. *Anim. Reprod. Sci.* 91: 89–96.

Hasler, J.F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci*. 15: 245–264.

Huang, Y., Zhuang, X., Gasparrini, B. and Presicce, G.A. 2005. Oocyte recovery by ovum pick-up and embryo production in Murrah and Nili-Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*) imported in China. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 273.

Hufana-Duran, D., Pedro, P.B., Venturina, H.V., Hufana, R.D., Salazar, A.L., Duran, P.G. and Cruz, L.C. 2004. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro*-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 61: 1429–1439.

Hufana-Duran, D., Pedro, P.B., Venturina, H.V., Duran, P.G. and Cruz, L.C. 2007. Full-term delivery of river buffalo calves (2n = 50) from *in vitro*-derived vitrified embryos by swamp buffalo recipients (2n = 48). 107: 213-219.

Kumar, A., Solanki, V.S., Jindal, S.K., Tripathi, V.N. and Jain, G.C. 1997. Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 189–195.

Kuwayama, M. and Kato, O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos, *J. Assist. Reprod. Genet.* 17: 477. abstract.

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S. and Kato, O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 11: 608–14.

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, M., Hochi, S. and Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64: 1185-1196.

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and Parnpai, R. 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology* 65: 151–156.

Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41: 67-72.

Manik, R.S., Chauhan, M.S., Singla, S.K. and Palta, P. 2002. Transvaginal ultrsound guided aspiration of follicles from Indian buffaloes with reproductive problems. *Vet. Rec.* 150: 22–24.

Manjunatha, B.M., Gupta, P.S., Ravindra, J.P., Devaraj, M. and Nandi, S. 2008. *In vitro* embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 419-426.

Manjunatha, B.M., Ravindra, J.P., Gupta, P.S., Devaraj, M., Honnappa, T.G. and Krishnaswamy, A. 2009a. Post-thaw development of *in vitro* produced buffalo embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *J. Vet. Sci.* 10:153-156.

Manjunatha, B.M., Gupta, P.S., Ravindra, J.P., Devaraj, M. and Nandi, S. 2009b. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced *in vitro*. *Vet. J.* 179:287-291.

Nandi, S., Girish Kumar, V., Gupta, P.S.P., Ramesh, H. and Manjunatha, B.M. 2006. Effect of ovine follicular fluid peptide on preantral, oocyte and somatic cells culture in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod.* 3: 61–69.

Neglia, G., Gasparrini, B., Brienza, V.C., di- Palo, R., Di- Campanile, G., Presicce, G.A. and Zicarelli, L. 2003. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123–1130.

Neglia, G., Gasparrini, B., Caracciolo di Brienza, V., Di Palo, R. and Zicarelli, L. 2004. First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced *in vitro*. *Vet. Res. Commun*. 28: 233–236.

Newton, S.S. and Subramoniam, T. 1996. Cryoprotectant toxicity in Penaeid prawn embryos. *Cryobiology* 33: 172–177.

Papis, K., Shimizu, M. and Izaike, Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology 15: 651–658.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.

Promdireg, A., Adulyanubap, W., Singlor, J., Na-Chiengmai, A. and Techakumphu, M. 2005. Ovum Pick-up in Cycling and Lactating Postpartum Swamp Buffaloes (*Bubalis bubalis*). Reprod. Dom. Anim. 40: 145–149.

Saito, N. 1994. Manual of embryo transfer and *in vitro* fertilization in cattle. *Nation Livestock Breeding Center.* Japan: MAFF.

Sharma, G.T., Dubey, P.K. and Chandra, V. 2010. Morphological changes, DNA damage and developmental competence of *in vitro* matured, vitrified-thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: a comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. *Cryobiology* 60: 315–321.

Shaw, J.M., Kola, I., MacFarlane, D.R. and Trounson, A.O. 1991. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fertil.* 91: 9–18.

Stringfellow, D.A. and Seidel, S.M. (Eds.) 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society, *Third ed. IETS* Savoy.

Techakumphu, M., Lohachit, C., Tantasuparuk, W., Intaramongkol, C. and Intaramongkol, S. 2000a. Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. *Theriogenology* 54: 305–312.

Techakumphu, M., Phutikanit, N., Suadsong, S., Bhumibhanom, T., Pita, A., Coygasem, G. 2000b.The effect of GnRH supplement of FSH and PMSG treatments for prepubertal swamp buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *J. Vet. Med. Sci.* 62: 269–272.

Techakumphu, M., Sukavong, Y., Yienvisavakul, V., Buntaracha, B., Pharee, S., Intaramongkol, S., Apimeteetumrong, M. and Intaramongkol, J. 2001. The transfer of

fresh and frozen embryos in an eliteswamp buffalo herd. *J. Vet. Med. Sci.* 63:849-852.

Techakumphu, M., Promdireg, A., Na-Chiengmai, A. and Phutikanit, N. 2004a. Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. *Theriogenology* 61: 1705-1711.

Techakumphu, M., Promdireg, A., Phutikanit, N., Na-Chiengmai, A. and Thongjan, S. 2004b. Transvaginal follicle aspiration in Thai swamp buffalo heifers using different vacuum pressures after FSH pretreatment (*Bubalus bubalis*). *J. Vet. Med. Sci.* 66: 973–975.

Vajta, G., Rindom, N., Peura, T.T., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 1999. The effect of media, serum and temperature onin vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52: 939–948.

Yang, C.Y., Pang, C.Y., Yang, B.Z., Li, R.C., Lu, Y.Q. and Liang, X.W. 2012. Optimization of cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 78: 1437–1445.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก
ประวัติผู้วิจัย
ประวัติ รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy
in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council
สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว โค กระบือ

7.4 Embryonic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T. 2015. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology***. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.002.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500.

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2013. Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2012-119

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., **Parnpai, R*.** and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. ***Mitochondrion***. 12: 506-513.

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.*** and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14: 79-87.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392.

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant humen leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R*.** 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** 22: 613-624.

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. ***Buffalo Bulletin.*** 32: (Special Issue 2): 617-621.

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. And Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology. 83: 891-896.

Kunkanjanawan, T., Noisa, P.* and **Parnpai, R*.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131.

Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R**. and Chan, A.W.S*. 2010. Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. ***BMC Cell Biology.*** 11: 12.

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin***. 32 (Special Issue 1): 196-203.

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology.*** 65: 151-156.

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R**.* 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01013.x

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73.

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology***. 75: 1652-1660.

Lorthongpanich, C*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R*.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22.

Noisa, P.* and **Parnpai, R.** 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. ***Stem Cells Int.*** 907961.

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 119-123.

Parnpai, R.*, Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med Suppl.*** 41: 77-85.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 237-240.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521.

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin***. 32: (Special Issue 2): 613-616.

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725.

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** Accepted 29 May, 2015.

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 241-243.

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205.

Putkhao, K., Yuksel, A., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis***. doi.org/10.4172/2168-9849.1000116

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499.

Sripunya, N., Somfai, T*., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** 2010. A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 176-181.

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 60: 336-341.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 49-54.

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R**. and Takeda, K*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82: 236-243.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M.* and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14: 248-257.

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R***. 2012. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** http://dx.doi.org/10.1016/j. smallrumres.2012.10.011

Takeda, K*, Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies

mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. ***J. Reprod. Dev.*** 58: 323-329.

Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R***. and Heraud, P*. 2010. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. ***J. Mol. Struct.*** 967: 189-195.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics.*** 16: 057005-1.

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai**, **R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst.*** 135: 4774-4784.

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170.

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health***. pii: 0748233715579805.

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อน*. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

10. งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จแล้ว

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384.

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

10.9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

10.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

11.4. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

11.9. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัติ

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คม สัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัติเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษย เดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทอง พานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ” ยื่นคำขอเมื่อวันที 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี