รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-60-12-22

รายงานการวิจัย

การเพิ่มจำนวนโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมโดยการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์เพื่อลดการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม

Increasing elite genetics dairy cattle by embryo transfer using ultrasound ovum pick up derived oocytes fertilized in vitro

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-60-12-22

รายงานการวิจัย

การเพิ่มจำนวนโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมโดยการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์เพื่อลดการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม

Increasing elite genetics dairy cattle by embryo transfer using ultrasound ovum pick up derived oocytes fertilized in vitro

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมจังหวัดสระบุรีและนครราชสีมาที่เข้าร่วมโครงการ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

ธันวาคม 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วจากไข่ที่เก็บจากโคนมโดยวิธี OPU แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับจะสามารถผลิตลูกโคเกิดมามากกว่าการผสมเทียมได้ถึง 10-20 เท่า ทำการฉีดฮอร์โมน FSH ก่อนเจาะเก็บไข่โคนมสาว 8 ตัว ด้วยวิธี OPU โดยทำ OPU ต่อเนื่อง 8 ครั้ง ได้ไข่เฉลี่ย 18.78 ใบ/ตัว/ครั้ง มีอัตราการเก็บไข่ได้ 79.20% (952/1,202 ใบ) ในจำนวนนี้เป็นไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัส กระจายตัว และ ไม่กระจายตัว 637 ใบ (66.91%) และ 315 ใบ (33.08%) ตามลำดับ ผลการใช้น้ำเชื้อแยกเพศทำปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัวได้อัตราตัวอ่อนแบ่งตัว, ระยะ 8 เซลล์ และระยะ บลาสโตซีสต์วันที่ 7 สูงกว่ากลุ่มไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (54.63, 46.93 และ 23.07% vs 42.85, 34.74 และ 13.63% ตามลำดับ) ผลการนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ กลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัวมีอัตราการตั้งท้อง 40.62% (26/64) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวที่ได้อัตราการตั้งท้อง 41.66% (10/24) กลุ่มตัวรับฝากตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัวคลอดลูกเป็นเพศเมีย 25 ตัว (96.15%) และเป็นเพศผู้ 1 ตัว (3.85%) ส่วนกลุ่มตัวรับฝากตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวคลอดลูกเป็นเพศเมีย 9 ตัว (90.00%) และเป็นเพศผู้ 1 ตัว (10.00%) การวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสามารถผลิตลูกโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมเพศเมียจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการทำ OPU-IVP-ET และปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อแยกเพศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In vitro embryo production using oocytes collected by OPU and transfer embryos to recipients will produce calves born more than artificial insemination 10-20 times. The eight dairy cattle heifers were injected with FSH before collected oocytes using OPU technique. The OPU was consecutively conducted for 8 times. The average numbers of oocytes collected from donors per session were 18.78. The recovery rate of oocytes was 79.20% (952/1,202), from these, oocytes have cumulus cells expansion and not expansion were 637 (66.91%) and 315 (33.08%), respectively. Results of in vitro fertilized with sex-sorted semen in a group of oocytes that have cumulus cells expansion developed to cleavage, 8-cell and blastocyst stages were significantly higher than those in a group of oocytes that have cumulus cells not expansion (54.63, 46.93 and 23.07% vs 42.85, 34.74 and 13.63%, respectively). The pregnancy rates after transferred blastocysts derived from a group of oocytes that have cumulus cells expansion and not expansion were not significantly different (40.62%, 26/64 vs 41.66%, 10/24, respectively. The recipients received embryos derived from a group of oocytes that have cumulus cells expansion gave birth to 25 female calves (96.15%) and 1 male calf (3.85%). The recipients received embryos derived from a group of oocytes that have cumulus cells not expansion gave birth to 9 female calves (90.00%) and 1 male calf (10.00%). In summary, this research demonstrated that elite genetics female dairy calves can be produced by transferred embryos derived from OPU and fertilized by sex-sorted semen.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	1
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	6
3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล	6
3.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	6
3.3. การทำ OPU	6
3.4 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดทดลอง	7
3.5. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง	7
3.6 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง	8
3.7 การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ	8
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	9
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	12
5.1 สรุปผลการวิจัย	12
5.2 ข้อเสนอแนะ	12
บรรณานุกรม	13
ประวัติผู้วิจัย	19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกา (American Embryo Transfer Association (AETA), 2018) 5

ตารางที่ 2 ผลการทำ OPU โคนม 8 ตัว 10

ตารางที่ 3 ผลการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ 10

ตารางที่ 4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับและการคลอด 11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โปรแกรมการฉีดฮอร์โมน FSH และ GnRH เพื่อทำ OPU 7

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แม้ว่าการเลี้ยงโคนมของประเทศไทยมีมานานกว่า 50 ปี แต่ยังผลิตน้ำนมไม่เพียงพอต่อการบริโภค เนื่องจากเป็นโคนมลูกผสมให้น้ำนมเฉลี่ย 12 กิโลกรัม/วัน และมีจำนวนโคนมไม่เพียงพอ ทำให้ต้องนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมทุกๆปี โดยในปี 2557 มีการนำเข้ามูลค่า 19,000 ล้านบาท อย่างไรก็ตามยังมีโคนมลูกผสมที่พันธุกรรมดีให้ผลผลิตน้ำนมมากกว่า 25 กิโลกรัม/วัน แต่มีเพียงประมาณ 5% ของโคนมที่มีอยู่ทั้งประเทศ นอกจากนี้ลูกโคนมที่เกิดมาครึ่งหนึ่งเป็นเพศผู้ไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากรีดนมไม่ได้ ทำให้การเพิ่มจำนวนโคนมเพศเมียพันธุ์ดีทำได้ช้า ดังนั้นจึงควรเร่งการผลิตโคนมพันธุ์ดีด้วยการคัดเลือกโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงมาเจาะเก็บไข่ด้วยอัลตราซาวด์ ซึ่งทำซ้ำได้ทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ติดต่อกัน 8-10 ครั้ง เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อแยกเพศเฉพาะเพศเมีย แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคนมตัวรับที่ให้น้ำนมไม่สูงที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก และนำตัวอ่อนที่เหลือใช้ไปทำตัวอ่อนแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป การใช้เทคโนโลยีนี้จะสามารถเพิ่มจำนวนโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมียมากขึ้นกว่าการผสมเทียม 10-20 เท่า ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่จะเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพไปพร้อมกัน เพื่อเป้าหมายลดการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศ และทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1. เพื่อหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนโคนมในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์

1.2.2. เพื่อผลิตลูกโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมเพศเมียเกิดมาเป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเจาะเก็บไข่จากโคนมเพศเมียที่ให้น้ำนมดี จากนั้นนำมาปฏิสนธิในหลอดแก้วกับน้ำเชื้อโคนมแยกเพศเฉพาะเพศเมีย จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไปย้ายฝากให้โคตัวรับ และนำตัวอ่อนที่เหลือไปทำการแช่แข็งแล้วย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อดูอัตราการตั้งท้องและคลอดลูก

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย (ถ้ามี)

ตัวอ่อนโคนมแยกเพศที่ได้จากไข่ OPU มีอัตราการตั้งท้องและอัตราการเจริญจนครบกำหนดคลอดปกติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตรฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1. ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนโคนมในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์

1.5.2. ได้ลูกโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมเพศเมียเกิดมาเป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

เพิ่มจำนวนโคนมพันธุ์ดีเพศเมียให้พอเพียงกับความต้องการของเกษตรกร ถ่ายทอดองค์ความรู้ให้สหกรณ์โคนมที่มีความสนใจใช้เทคโนโลยีนี้ ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง หรือนำผลงานไปนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

Ovum pick-up (OPU) เป็นเทคนิคการเก็บไข่โดยใช้ probe พิเศษร่วมกับการใช้อัลตร้าซาวด์สแกนรังไข่เพื่อให้มองเห็นฟอลลิเคิลขณะเจาะเก็บไข่ เทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในคลินิคผู้มีบุตรยาก (Gleichert และคณะ 1984, Dellenbach และคณะ 1983) ต่อมาในปี ค.ศ. 1987 นักวิจัยชาวเดนมาร์กรายงานการเก็บไข่โคด้วยวิธี OPU ที่ประยุกต์จากเทคนิคที่ใช้ในมนุษย์ (Callesen และคณะ 1987) และในปีต่อมา Pieterse และคณะ (1988) ประสบความสำเร็จในการทำ OPU ในโคเป็นครั้งแรกของโลก ในการทำ OPU สามารถเหนี่ยวนำโคตัวให้โดยใช้ฮอร์โมนกระตุ้นเพื่อให้ไข่สุกมากๆ หรือสามารถเจาะเก็บไข่อ่อนจากฟอลลิเคิล ขนาด 2-8 มิลลิเมตร แล้วนำไปเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วก็ได้ (*in vitro* maturation: IVM) จากนั้นนำไข่สุกที่ได้มาปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization: IVF) แล้วเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*in vitro* culture: IVC) เป็นเวลา 7 วัน โดยปรับสภาวะที่เลี้ยงให้คล้ายกับสภาวะในระบบสืบพันธุ์ของโคเพศเมีย หลังจากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ไปย้ายฝากให้แม่โคตัวรับ หรือนำไปแช่แข็งเพื่อรอการย้ายฝากในภายหลัง

การเก็บไข่ด้วยวิธี OPU แล้วนำมาผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*in vitro* embryo production, IVP) นั้นเป็นเทคนิคที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตของโคเนื้อและโคนม ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีการผลิตตัวอ่อนโคในหลอดแก้วเพิ่มมากขึ้น อัตราความสำเร็จในการทำ OPU-IVP ขึ้นอยู่กับจำนวนและคุณภาพของไข่ที่เจาะเก็บได้ ทั้งนี้ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ส่งผลต่อคุณภาพของไข่เช่น ขนาดของรังไข่ (Lonergan และคณะ 1994, Seneda และคณะ 2001) ความเครียดของโคจากความร้อน (de S Torres-Júnior และคณะ 2008, Ferreira และคณะ 2011, Ferreira และคณะ 2016) พันธุกรรม (Gimenes และคณะ 2015, Sales และคณะ 2015) อายุ (Batista และคณะ 2016) และสถานะการให้น้ำนมของโค (Baruselli และคณะ 2016) สายพันธุ์ของโคก็มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการทำ OPU-IVP มีรายงานว่า ไข่ที่เจาะเก็บได้จากโคเนื้อมีจำนวนมากกว่า (Batista และคณะ 2014) อีกทั้งมีคุณภาพดีกว่าไข่ที่เจาะได้จากโคนม (Guerreiro และคณะ 2014, Gimenes และคณะ 2015)

ในรังไข่ของโคแรกเกิดมีฟอลลิเคิลอยู่ประมาณ 235,000 ใบ (Ericksson 1996, Betteridge และคณะ 1989) ซึ่งฟอลลิเคิลเหล่านี้จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออายุมากขึ้น เหมือนกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ (Ericksson 1996) มีรายงานว่าฟอลลิเคิลที่มีช่องว่างภายใน (Antral follicle) จากรังไข่ของโคเด็กตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนได้ดีกว่า และยังเก็บไข่ได้มากกว่าโคโตเต็มวัย (Armstrong และคณะ 1994, Duby และคณะ 1996, Tervit 1996) อย่างไรก็ตามรายงานนี้ขัดแย้งกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่าไข่ที่ได้จากโคเด็กมีอัตราการเจริญต่ำกว่าไข่ที่ได้จากโคเต็มวัย (Khatir และคณะ 1998, Presicce และคณะ 1997, Majerus และคณะ 1999) นอกจากนี้ Baruselli และคณะ (2016) รายงานว่าจำนวนของไข่ที่เจาะเก็บจากโคเด็กอายุ 8-12 เดือน (7.6 ± 1.0) ต่ำกว่าที่ได้จากโคอายุ 18-22 เดือน (16.8 ± 2.7) และ 22-26 เดือน (15.1 ± 2.2) นอกจากนี้อัตราเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนที่ได้จากโคเด็กอายุ 8-12 เดือน (20.2%) ต่ำกว่าที่ได้จากโคอายุ 18-22 เดือน (28.1%) และ 22-26 เดือน (47.0%) (Baruselli และคณะ 2016)

การใช้ฮอร์โมนกระตุ้นไข่มีผลดีต่อการเจริญของตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วและอัตราการตั้งท้อง (Cavalieri และคณะ 2018) Blondin และคณะ (2012) รายงานว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์ของไข่ที่ได้จากโคที่ใช้ฮอร์โมนกระตุ้นมีจำนวนมากกว่าโคที่ไม่ได้รับการกระตุ้นถึงสองเท่า ฮอร์โมน follicle-stimulating hormone, FSH) นิยมใช้สำหรับกระตุ้นไข่ก่อนการทำ OPU-IVP (Armstrong และคณะ 1992, Fry และคณะ 1998) การใช้ FSH ฉีดกระตุ้นเป็นจำนวน 6 ครั้ง หรือเพิ่มโดสของ FSH ก่อนการทำ OPU จะสามารถได้ไข่เป็นจำนวนมากขึ้นกว่าการฉีด FSH แค่ครั้งเดียว (Chaubal และคณะ 2007, Sirard และคณะ 1999)

โดยปกติการทำ OPU-IVP ทางการค้า จะทำในโคเนื้อเป็นส่วนใหญ่และไม่ได้ใช้ฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้ไข่ตกมากๆ (Morotti และคณะ 2014, Pellegrino และคณะ 2016, Santos และคณะ 2016, Silva-Santos และคณะ 2014, Pontes และคณะ 2009, 2010, 2011) ในปัจจุบัน มีการเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วเพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้สามารถกำหนดเพศของลูกเกิดได้โดยทำการเก็บไข่ด้วยวิธี OPU แล้วนำไข่ที่ได้มาทำปฏิสนธิกับน้ำเชื้อแยกเพศ (sexed sperm; Pontes และคณะ 2011) หรือ reverse-sorted sperm ซึ่งเป็นการแยกเพศของน้ำเชื้อแช่แข็ง (Morotti และคณะ 2014) สามารถได้ลูกเกิดที่มีเพศตามที่ต้องการได้ (Faber และคณะ 2003, Wheeler และคณะ 2006) การทำ OPU-IVP ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความคุ้มค่าอีกทั้งยังได้ผลดี ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปต่อยอดใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โคได้ (Wrenzycki และคณะ 2018)

จากรายงานของ American Embryo Transfer Association (AETA) รายงานข้อมูลการย้ายฝากตัวอ่อนได้จากการผลิตในร่างกายและในหลอดแก้วในประเทศสหรัฐอเมริกาช่วงปีค.ศ. 2017 โดยมีการย้ายฝากตัวอ่อนโคสดจำนวน 222,207 ใบ และตัวอ่อนโคแช่แข็ง 179,643 ใบ ทั้งนี้พบว่าเป็นตัวอ่อนที่ได้จากการทำ OPU ในโคนม 57,708 ใบและโคเนื้อ 166,573 ใบ จากตารางที่ 1 พบว่าในโคนม จำนวนไข่ที่ได้ต่อตัวจากโคตัวให้ที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น แต่เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนที่นำไปย้ายฝากได้จากกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FSH สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น ในส่วนของโคเนื้อ การกระตุ้นโคตัวรับด้วยฮอร์โมน FSH ก่อนการทำ OPU ไม่ได้มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้นมากนัก (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ข้อมูลการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วที่ได้จาก 138 บริษัทที่ผลิตตัวอ่อนทางการค้า สายพันธุ์โคที่นิยมใช้การผลิตตัวอ่อนในร่างกายและในหลอดแก้ว อันดับหนึ่งคือ โฮลสไตน์ฟรีเซียน (9,351 ใบ) รองลงมาคือแองกัส (1,773 ใบ) และวากิว (1,108 ใบ) ตามลำดับ มีการส่งออกตัวอ่อนไปยังประเทศในทวีปยุโรป ประเทศจีนและญี่ปุ่น (American Embryo Transfer Association, 2018)

ในการวิจัยนี้จะเป็นการเจาะเก็บไข่โคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมด้วยอัลตราซาวด์แล้วนำไปผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคนมตัวรับเพื่อเพิ่มจำนวนโคนมพันธุกรรมดี

ตารางที่ 1 การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วทางการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกา (American Embryo Transfer Association (AETA), 2018)

รายการ	โคนม		โคเนื้อ	
	ไม่กระตุ้นด้วย FSH	กระตุ้นด้วย FSH	ไม่กระตุ้นด้วย FSH	กระตุ้นด้วย FSH
บริษัทที่ทำ OPU อย่างเดียว				
ไข่ที่ได้ต่อตัว	15.6	16.8	17.8	22.3
บริษัทที่ทำ OPU และ IVF				
ไข่ที่ได้ต่อตัว	15.6	16.6	17.8	22.5
% ตัวอ่อนที่คุณภาพดี	18%	31%	31%	29%
บริษัทที่ใช้ไข่จากโรงฆ่าสัตว์และ IVF	**โคนม**		**โคเนื้อ**	
% ตัวอ่อนที่คุณภาพดี	35%		35%	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

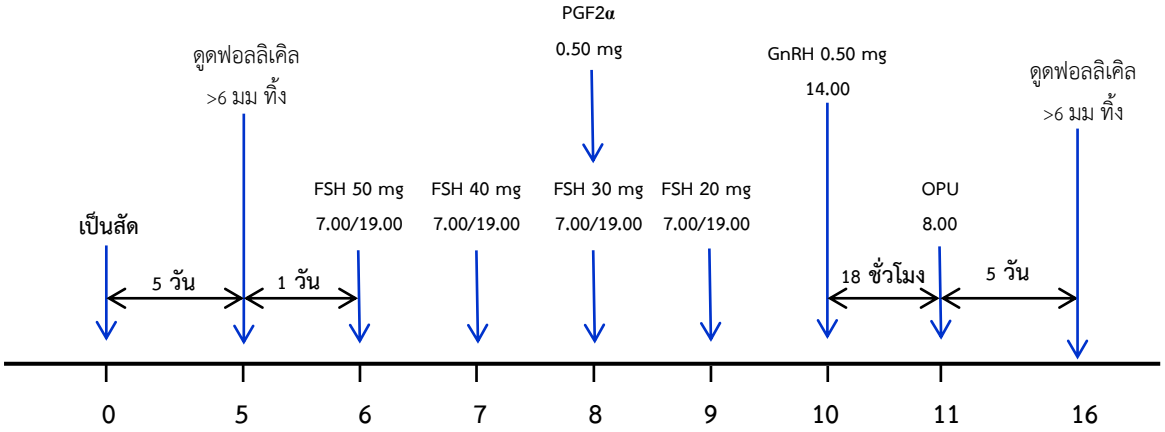
ทำการทดลอง ณ ฟาร์มวิจัยของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดนครราชสีมาและสระบุรี

3.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลองนี้ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) หากไม่ใช่จะระบุไว้

3.3 การทำ OPU

นำโคนมสาวอายุ 16-20 เดือน ที่แม่มีประวัติให้น้ำนมอย่างน้อย 7,000 กก/ปี จำนวน 8 ตัว เลี้ยงในฟาร์มวิจัยของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มีการจัดการเลี้ยงดู การให้อาหารเหมือนกัน มาทำการเจาะดูดไข่ด้วยอัลตราซาวด์ต่อเนื่อง รวม 8 ครั้ง โดยจะฉีดฮอร์โมน FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health Canada Inc., Ontario, Canada) 8 ครั้งรวม 280 mg/ตัว (ดังรูปที่ 1) หลังจากฉีด FSH 48 ชั่วโมงจะฉีดฮอร์โมน Prostglandin F2 alpha (PGF2α, Estrumate®, Vet Pharma Friesoythe GmBH, Friesoyth, Germany) 0.5 mg/ตัว และฉีดฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH, Fertagyl®, Intervet International GmBH, Unterschleissheim, Germany) ปริมาณ 0.5 mg/ตัว ให้โค 18 ชั่วโมงก่อนเจาะเก็บไข่โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (Prosound 2, Tokyo, Japan) ที่มีหัวอ่าน 7.5 MHz convex vaginal transducer ใช้เข็มโควา (Cova needle, Misawa Medical, Tokyo, Japan) ต่อกับเครื่องดูดสุญญากาศ 120 mmHg ไข่โคที่เก็บได้จะอยู่ในหลอดทดลอง ขนาด 50 ml น้ำยาเจาะดูดไข่ประกอบด้วยสารละลาย Lactate Ringer เติมด้วย 0.1% polyvinyl alcohol และ 10 IU/ml Heparin (Juanpanich และคณะ, 2018) โดยเจาะเก็บจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดระหว่าง 10-16 มิลลิเมตร ขณะที่เจาะดูดไข่ให้ทำการชะล้างท่อเข็มด้วยสารละลายดูดเจาะไข่ทุกๆ 2 นาที หลังจากการดูดเจาะไข่เสร็จสิ้น นำน้ำยาที่ได้มากรองไข่ด้วยถ้วยกรอง (Emcon Filter, Spring Valley, WI, USA) แล้วนำไข่ไปเข้าเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µL น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco), 50 IU/mL hCG (Intervet), 0.02 AU/mL FSH (Antrin®, Kyoritsu Seiyaku, Japan) และ 1 µg/mL 17β-estradiol (Paul และคณะ, 2014) โดยเลี้ยงไข่ไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลานาน นาน 3 ชั่วโมง (สำหรับไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายตัว) และนาน 18 ชั่วโมง (สำหรับไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว) หลังจากทำ OPU เจาะไข่ 5 วัน จะทำการดูดฟอลลิเคิล >6 มม ทิ้งไป แล้วเริ่มโปรแกรมฉีด FSH อีกครั้ง ซึ่งจะทำ OPU ซ้ำจนครบ 8 ครั้ง



รูปที่ 1 โปรแกรมการฉีดฮอร์โมน FSH และ GnRH เพื่อทำ OPU

3.4. การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดทดลอง

ใช้วิธีที่รายงานมาแล้วโดย Suteevun และคณะ (2006) นำน้ำเชื้อโคนมแยกเพศเมียครั้งละ 1 หลอด มาทำละลาย โดยนำขึ้นมาจากถังไนโตรเจนเหลว ทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70 % ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วปิเปตน้ำเชื้อไปไว้ด้านบนของชั้นน้ำยาที่มี percoll ความเข้มข้น 45 และ 90% ความเข้มข้นชั้นละ 500 µL ในหลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นที่ 500x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาด้านบนออกเหลือไว้เฉพาะตะกอนน้ำเชื้อที่ก้นหลอด แล้วทำการล้างน้ำเชื้อ 1 ครั้งด้วยการดูดตะกอนน้ำเชื้อไปไว้ในหลอด conical (Corning, USA) ที่มีน้ำยา BO 5 ซีซี ที่เติมด้วย 3 mg/mL BSA, 2.5 mM caffeine และ 100 µg/mL heparin แล้วนำไปปั่นที่ 500x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะน้ำเชื้อที่ก้นหลอด เจือจางน้ำเชื้อที่ได้ด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิ (BO medium ที่เติมด้วย 6 mg/mL BSA, 2.5 mM caffeine และ 100 µg/mL heparin) ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัว/ซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µL/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

3.5. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง

นำไข่ที่ได้จากข้อ 3.3. มาล้างด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 10-15 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4. แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง (Suteevun และคณะ, 2006)

3.6. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

เมื่อบ่มไข่และอสุจิร่วมกันครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปล้างด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (modified synthetic oviduct fluid, mSOF ที่เติมด้วย 3 mg/mL BSA, mSOF-BSA, Parnpai และคณะ, 1999) แล้วปิเปตขึ้นลงหลายๆครั้ง เพื่อให้อสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกให้มากที่สุด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในสัดส่วน 20 ใบ/100 µL ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 5% CO_2 และ 90% N_2 เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยา 50% ทุกๆ 2 วัน

3.7. การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

ทำการเหนี่ยวนำให้โคตัวรับเป็นสัดและตกไข่ด้วยการสอด CIDR (Progesterone intravaginal insert) ไว้ในช่องคลอดโค และฉีดฮอร์โมน Eestradiol Benzoate หลังจากนั้น 8 วันจะดึง CIDR ออก แล้วฉีดฮอร์โมน PGF2α หลังจากฉีด PGF2α 60 ชั่วโมงจะฉีดฮอร์โมน GnRH หลังจากนั้น 7-8 วัน จะนำตัวอ่อนสดย้ายฝากให้โคตัวรับ 1 ตัวอ่อน/ตัว หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 35 วัน จะตรวจการตั้งท้องด้วยอัลตราซาวด์ และล้วงตรวจการตั้งท้องอีกครั้งที่ 60 วันหลังย้ายฝากตัวอ่อน แล้วเก็บข้อมูลการคลอด และเพศของลูกโคที่เกิดมา

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ทำการเปลี่ยนข้อมูลเปอร์เซ็นต์เป็น arcsine ก่อนทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเมื่อค่า P น้อยกว่า 0.05

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

จากตารางที่ 2 การเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU ในโคนมสาว 8 ตัว โดยฉีดฮอร์โมน FSH ก่อนทำ OPU ได้ไข่เฉลี่ย 18.78 ใบ/ตัว/ครั้ง มีอัตราการเก็บไข่ได้ 79.20% (952/1,202 ใบ) ในจำนวนนี้เป็นไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายตัว 637 ใบ (66.91%) และเซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว 315 ใบ (33.08%) Watanabe และคณะ (2017) รายงานการทำ OPU 25,363 ครั้ง ได้ไข่เฉลี่ย 19.2 ใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ ในการทำ OPU มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเก็บไข่ได้มากหรือน้อย ได้แก่พันธุ์โค ซึ่งมีรายงานว่าโคพันธุ์เนลลอร์ ซึ่งเป็นโคเนื้อเมืองร้อนจะมีฟอลลิเคิลในรังไข่มากกว่าโคพันธุ์อื่น ทำให้เก็บไข่โดยวิธี OPU ได้มากกว่าโคพันธุ์อื่น (Monteiro และคณะ, 2017) นอกจากนี้โคนมที่กำลังรีดนมจะได้ไข่น้อยกว่าโคนมที่ไม่ได้รีดนม (Vieira และคณะ, 2014) การฉีด GnRH ก่อนทำ OPU 48 ชั่วโมง ทำให้เก็บไข่ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ฉีด GnRH (Ogata และคณะ, 2016) มีรายงานว่าการฉีด FSH ก่อนการทำ OPU ในโคนมทำให้เก็บไข่ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีด (Vieira และคณะ, 2014, 2016) แต่รายงานของ Barboza da Silva และคณะ (2017) ซึ่งทำ OPU ในโคนมที่ไม่รีดนม พบว่าการฉีด FSH วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 หรือ 4 วัน ก่อนการทำ OPU จำนวนไข่ที่เก็บได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้ฉีด FSH

จากตารางที่ 3 จากการใช้น้ำเชื้อแยกเพศทำปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัว ได้อัตราตัวอ่อนแบ่งตัว, ระยะ 8 เซลล์ และระยะบลาสโตซีสต์วันที่ 7 สูงกว่ากลุ่มไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (54.63, 46.93 และ 23.07% vs 42.85, 34.74 และ 13.63% ตามลำดับ) การใช้น้ำเชื้อแยกเพศปฏิสนธิในหลอดแก้วให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ไม่สูงมากนักมีสาเหตุมาจากในกระบวนการแยกเพศน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Flow cytometer น้ำเชื้อจะอยู่ในน้ำยาที่มีสี Hoecst 33342 อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ซึ่งจะไปมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิและอัตราการเจริญของตัวอ่อนลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่แยกเพศ มีรายงานอื่นที่ทำ OPU และนำไข่ไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อไม่แยกเพศได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 33.9-34.2% (Monteiro และคณะ, 2017) ส่วนการใช้น้ำเชื้อแยกเพศได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ระหว่าง 23-26% (Barboza da Silva และคณะ, 2017) ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไข่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายตัวในการทดลองนี้

จากตารางที่ 4 ผลการนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ กลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัว มีอัตราการตั้งท้อง 40.62% (26/64) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวที่ได้อัตราการตั้งท้อง 41.66% (10/24) โดยทั้งสองกลุ่มไม่พบการแท้ง กลุ่มตัวรับฝากตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัวคลอดลูกเป็นเพศเมีย 25 ตัว (96.15%) และเป็นเพศผู้ 1 ตัว (3.85%) ส่วนกลุ่มตัวรับฝากตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัวคลอดลูกเป็นเพศเมีย 9 ตัว (90.00%) และเป็นเพศผู้ 1 ตัว (10.00%) Ogata และคณะ (2016) รายงานการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ได้จาก

การทำ OPU และทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว ได้อัตราตั้งท้อง 42-57% ส่วนรายงานของ Vieira และคณะ (2016) ได้อัตราการตั้งท้อง 33-60% Watanabe และคณะ (2017) รายงานอัตราการตั้งท้อง 40.0% จากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วโดยใช้ไข่ OPU ในการทดลองนี้ได้ลูกโคเกิดมาทั้งหมด 36 ตัว เป็นเพศเมีย 34 ตัว (94.44%) เพศผู้ 2 ตัว (5.56%) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้การทำ OPU เจาะไข่โคนมที่พันธุกรรมดีไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อแยกเพศเพื่อผลิตตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับพันธุกรรมทั่วไปสามารถได้ลูกโคเพศเมียพันธุกรรมดีมากกว่าการผสมเทียมหลายเท่า

ตารางที่ 2 ผลการทำ OPU โคนม 8 ตัว

Donor ID	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ (%)	จำนวนไข่ที่เจาะได้ (%)	ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัว (%)	ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว (%)
1	130 (16.25)	97 (74.61)	53 (54.63)	44 (45.36)
2	172 (21.50)	135 (78.48)	92 (68.14)	43 (31.85)
3	143 (17.87)	115 (80.41)	69 (60.00)	46 (40.00)
4	151 (18.87)	117 (77.48)	76 (64.95)	41 (35.04)
5	168 (21.00)	134 (79.76)	93 (69.40)	41 (30.59)
6	139 (17.37)	112 (80.57	78 (69.64)	34 (30.35)
7	154 (19.25)	129 (83.76)	92 (71.31)	37 (28.68)
8	145 (18.12)	113 (77.93)	84 (74.33)	29 (25.66)
รวม	**1,202 (18.78)**	**952 (79.20)**	**637 (66.91)**	**315 (33.08)**

เจาะไข่ทั้งหมดตัวละ 8 ครั้ง

ตารางที่ 3 ผลการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

ชนิดของไข่	จำนวนไข่ปฏิสนธิในหลอดแก้ว	จำนวน (%) ตัวอ่อนเข้าเลี้ยง[a]	จำนวน (%) ตัวอ่อนแบ่งตัว[b]	จำนวน (%) ตัวอ่อน 8 เซลล์[c]	จำนวน (%) บลาสโตซีสต์วันที่ 7[d]	จำนวน (%) บลาสโตซีสต์เกรด 1-2[e]
ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัว	637	637 (100)	348 (54.63)^{A}	299 (46.93)^{A}	147 (23.07)^{A}	122 (82.99)
ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว	315	308 (97.77)	132 (42.85)^{B}	107 (34.74)^{B}	42 (13.63)^{B}	31 (73.80)

ไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายตัว นำมาเลี้ยงในน้ำยา IVM 3 ชั่วโมงก่อนนำไปปฏิสนธิในหลอดแก้ว ;
ไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว นำมาเลี้ยงในน้ำยา IVM 18 ชั่วโมงก่อนนำไปปฏิสนธิในหลอดแก้ว

$^{A, B}$ ในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$, ANOVA)

[a] % ของไข่ที่เข้าปฏิสนธิในหลอดแก้ว ; [b] % ของตัวอ่อนที่เข้าเลี้ยง ; [c] % ของตัวอ่อนที่เข้าเลี้ยง;

[d] % ของตัวอ่อนที่เข้าเลี้ยง; [e] % ของตัวอ่อนวันที่ 7

ตารางที่ 4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับและการคลอด

ชนิดของไข่ที่ผลิตตัวอ่อน	**จำนวนตัวรับ**	**ตั้งท้อง (%)**	**คลอดลูก (%)**	**ลูกเพศผู้ (%)**	**ลูกเพศเมีย(%)**
ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสกระจายตัว	64	26 (40.62)	26 (100)	1 (3.85)	25 (96.15)
ไข่ที่เซลล์คิวมูลัสไม่กระจายตัว	24	10 (41.66)	10 (100)	1 (10.00)	9 (90.00)
รวม	**88**	**36 (40.90)**	**36 (100)**	**2 (5.56)**	**34 (94.44)**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สามารถเก็บไข่โคนมสาวโดยวิธี OPU ได้ต่อเนื่อง 8 ครั้ง

5.1.2 สามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์จากไข่ที่เก็บโดยวิธี OPU โดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศ

5.1.3 สามารถผลิตลูกโคนมพันธุกรรมดีเยี่ยมเพศเมีย จากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการทำ OPU และปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อแยกเพศ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการนำวิธีการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธี OPU-IVP ไปใช้เพิ่มจำนวนโคนมและโคเนื้อพันธุกรรมดีเยี่ยมในประเทศไทยอย่างจริงจัง

5.3 ต้นทุนในการผลิตตัวอ่อน

รายการ	**จำนวนเงิน (บาท)**
น้ำยา Ringer เก็บไข่ 8 ตัว x 300 บาท	2,400
หลอด Conical เก็บไข่ 8 ตัว x 90 บาท	720
ท่อยางดูดไข่ 8 ตัว x 200 บาท	1,600
เข็มเจาะเก็บไข่ 8 ตัว x 160 บาท	1,280
Emcon กรองไข่ 8 ตัว x 500 บาท	4,000
Dish ส่องตรวจไข่ 8 ตัว x 50 บาท	400
4-well dish เก็บไข่ 8 ตัว x 50 บาท	400
น้ำยา holding ไข่ 8 ตัว x 300 บาท	2,400
น้ำยา IVM-IVF-IVC-วัสดุ 8 ตัว x 1,000	8,000
น้ำเชื้อแยกดพศแข็ 4 หลอด x 2,000	8,000
อื่นๆ	3,000
รวม	29,200
8 ตัวให้ x 3 ตัวอ่อน = 24 ใบ	**1,217 บาท/ใบ**

หมายเหตุ 1. คิดจากการทำครั้งละ 8 ตัว

2. ยังไม่คิดเงินเดือนผู้ทำ

3. ยังไม่คิดค่าเสื่อมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

American Embryo Transfer Association. Statistics Committee Report - AETA 2018. 2018 https://www.aeta.org/docs/2017_Stats.pdf

Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF. 1992. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. ***Theriogenology.*** 38: 667-678.

Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF. 1994. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. ***Theriogenology.*** 42: 1227-1236.

Barboza da Silva, J.C., Ferreira, R. M., Filho M. M., Naves, J.R., Santin, T., Pugliesi, G., Madureira, E. H. 2017. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. ***Theriogenology.*** 90: 65-73.

Baruselli PS, Vieira LM, Sá Filho MF, Mingoti RD, Ferreira RM, Chiaratti MR, Oliveira LH, Sales JN, Sartori R. 2016. Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. ***Theriogenology.*** 86: 263-269.

Batista EO, Guerreiro BM, Freitas BG, Silva JC, Vieira LM, Ferreira RM, Rezende RG, Basso AC, Lopes RN, Rennó FP, Souza AH, Baruselli PS. 2016. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. ***Domest. Anim. Endocrinol.*** 54: 1-9.

Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Rennó FP, Baruselli PS. 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. ***Reprod. Domest. Anim.*** 49: 448-452.

Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. ***J. Reprod. Fertil.*** Suppl. 38: 87-98.

Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA. 2012. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? ***Anim. Reprod.*** 9: 281-289.

Callesen H, Greve T, Christensen F. 1987 .Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. ***Theriogenology.*** 27: 217 (abstract).

Cavalieri FLB, Morotti F, Seneda MM, Colombo AHB, Andreazzi MA, Emanuelli IP, Rigolon LP. 2018. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. ***Theriogenology.*** 117: 57-60.

Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PE, Rezamand P, Tian X, Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. ***Theriogenology.*** 67: 719-728.

Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P, Brun B, Rumpler Y. 1983. Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. ***Lancet.*** 1: 1467.

de S Torres-Júnior JR, de F A Pires M, de Sá WF, de M Ferreira A, Viana JH, Camargo LS, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, de Freitas C, Clemente CA, de Sá Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in Bos indicus cattle. ***Theriogenology.*** 69: 155-166.

Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. ***Theriogenology.*** 45: 121-130.

Erickson BH. 1996. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. ***J. Anim. Sci.*** 25: 800-805.

Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferré LB. 2003. Commercialization of animal biotechnology. ***Theriogenology.*** 59: 125-138.

Ferreira RM, Ayres H, Chiaratti MR, Ferraz ML, Araújo AB, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA, Joaquim DC, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS. 2011. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. ***J. Dairy Sci.*** 94: 2383-2392.

Ferreira RM, Chiaratti MR, Macabelli CH, Rodrigues CA, Ferraz ML, Watanabe YF, Smith LC, Meirelles FV, Baruselli PS. 2016. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. ***Biol. Reprod.*** 94: 66.

Fry RC, Simpson TL, Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. ***Theriogenology.*** 49: 1077-1082.

Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho MF, Meirelles FV, Trinca LA, Rennó FP, Watanabe YF, Baruselli PS. 2015. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum

pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. ***Theriogenology.*** 83: 385-393.

Gleicher N, Friberg J, Fullan N, Giglia RV, Mayden K, Kesky T, Siegel I. 1984. EGG retrieval for in vitro fertilisation by sonographically controlled vaginal culdocentesis. ***Lancet.*** 2: 508-509.

Guerreiro BM, Rodrigues CA, Castro Neto A, Silveira CRA, Vieira LM, Oliveira RC, Freitas BG, Baruselli PS. 2014. Prepubertal Holstein heifers have low efficiency when submitted to ovum pick-up and in vitro embryo production. ***Anim. Reprod.*** 11: 405. (abstract)

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., Parnpai, R. and and Imai, K. 2018. Effects of gel-embedded embryos on developmental competence of separated bovine blastomeres. ***Livestock Sci.*** 207: 25-29.

Khatir H, Lonergan P, Touze JL, Mermillod P. 1998. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after nonsurgical embryo transfer. ***Theriogenology.*** 50: 1201-1210.

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. ***Mol. Reprod. Dev.*** 37: 48-53.

Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. ***Theriogenology.*** 52: 1169-1179.

Monteiro, F.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Bayeux, B.M., Accorsi, M., Campanholi, S.P., Dias, E.A.R., Souza, A.H., Baruselli, P.S. 2017. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. ***Theriogenology.*** 90: 54-58.

Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. ***Theriogenology.*** 81: 696-701.

Ogata, Y., Yu, G.M., Hidaka, T., Matzushige, T., Maeda, T. 2016. Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation. ***Theriogenology.*** 86: 1421-1426.

Parnpai R, Tasripoo K and Kamonpatana M 1999. Deveopment 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.

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.

Pellegrino CA, Morotti F, Untura RM, Pontes JH, Pellegrino MF, Campolina JP, Seneda MM, Barbosa FA, Henry M. 2016. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. ***Theriogenology.*** 86: 888-893.

Pieterse M, Kappen K, Kruip TA, Taverne M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. ***Theriogenology.*** 30: 751-762.

Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. ***Theriogenology.*** 71: 690-697.

Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. ***Theriogenology.*** 74: 1349-1355.

Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. ***Theriogenology.*** 75: 1640-1646.

Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. ***Biol Reprod.*** 56: 386-392.

Sales JN, Iguma LT, Batista RI, Quintão CC, Gama MA, Freitas C, Pereira MM, Camargo LS, Viana JH, Souza JC, Baruselli PS. 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. ***J. Dairy Sci.*** 98: 3086-3099.

Santos GMGD, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, de Moraes FLZ, Blaschi W, Seneda MM. 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. ***Anim. Reprod. Sci.*** 165: 17-21.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. ***Anim. Reprod. Sci.*** 67: 37-43.

Silva-Santos KC, Santos GM, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DC, Seneda MM. 2014. Antral follicle populations and embryo production in vitro and in vivo of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. ***Reprod. Domest. Anim.*** 49: 228-232.

Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K, Blondin P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. ***Theriogenology.*** 51: 699-708.

Suteevun, T., Parnpai, R., Smith, S.L., Chang, C.C., Muenthaisong, S., Tian, X.C. (2006). Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. ***J Anim Sci.*** 84: 2065-2071.

Tervit HR. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. ***Anim. Reprod Sci.*** 42: 227-238.

Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Guerreiro, B.M., Silveira, C.R.A., Moreira, R.J.C., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improvein vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. ***Theriogenology.*** 82: 318-324.

Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Guerreiro, B.M., Silveira, C.R.A., Freitas, B.G., L.G.M. Bragança, K.N.G. Marques, M.F. Sá Filho, Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S. 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle ***Theriogenology.*** 85: 877-886.

Watanabe, Y.F., de Souza, A.H., Mingoti, R.D., Ferreira, R.M., Santana Batista, E.O., Dayan, A., Watanabe, O., Meirelles, F.V., Gouveia Nogueira, M.F., Sterman Ferraz, J.B. and Baruselli, P.S. 2017. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. ***Anim. Reprod.*** 14: 635-644.

Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ. 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. ***Theriogenology.*** 65: 219-227.

Wrenzycki C. 2018. Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. ***Reprod. Domest. Anim.*** 53: 14-19.

ประวัติผู้วิจัย

1. (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. **เกิด**วันที่ 7 มีนาคม 2502

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน รอง**ศาสตราจารย์

ยื่นผลงานเพื่อขอกำหนดตำแหน่งศาสตราจารย์เมื่อวันที่ 19 กันยายน 2560 และผ่านการประเมินจากมหาวิทยาลัยแล้ว ขณะนี้อยู่ระหว่างรอพระบรมราชโองการโปรดเกล้าโปรดกระหม่อมแต่งตั้ง

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 ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

5.5.4. Asian Reproductive Biotechnology Society

5.5.5. Thai Society for Biotechnology

5.5.6. Thai Society for Reproductive Medicine

5.5.7. Thai Society for Animal Reproduction

5.5.8. Thai Society for Gametes and Embryo Research

5.5.9. Society for Stem Cell Research

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 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* 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), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* 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.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 314 533 Stem Cell Technology. 238 หน้า.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2560. การโคลนนิ่งโค โรงพิมพ์ หจก. เลิศศิลป์ สาส์ณ โฮลดิ้ง, นครราชสีมา, 274 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.

9. ผลงานตีพิมพ์ย้อนหลัง 5 ปี

2020

Kunkanjanawan, H., Kunkanjanawan, T., Khemarangsan, V., Yodsheewan, R., Theerakittayakorn, K. and **Parnpai, R.***. 2020. A xeno-free strategy for derivation of human umbilical vein endothelial cells and Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: a feasibility study toward personal cell and vascular based therapy. ***Stem Cell International.*** Accepted 18 August, 2020

Yodrug, T., **Parnpai, R.*.**, Hirao, Y. and Somfai, T. 2020. The effects of vitrification after equilibration in different concentrations of cryoprotectants on the survival and quality of bovine blastocysts. **Anim. Sci. J.** Accepted 2 August, 2020.

Liang, Y.Y., Yoisungnern, T., Huang, Y. **Parnpai, R*.** 2020. Effects of Lcarnitine on embryo development of vitrified swamp buffalooocytes following in vitro fertilization. ***Livestock Sci.*** doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103933

2019

Hassan, F.A., Wernery, U., Joseph, M., Anouassi, A., Ketudat-Cairns, M. and **R. Parnpai.** 2019. Molecular identification of 20 Escherichia coli isolates from dead neonatal camel calves (*Camelus dromedarius*) in the United Arab Emirates. J. Camel Pract. Res. 26: 259-260.

Wachira Panta, Sumeth Imsoonthornruksa, Ton Yoisungnern, Sanong Suksaweang, Mariena Ketudat-Cairns and **Rangsun Parnpai.*** 2019. Enhanced hepatogenic differentiation of human Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells by using three-step protocol. ***Int. J. Mol. Sci.*** 20: 3016; doi:10.3390/ijms20123016.

2018

Wipassa, V. and **Parnpai, R.*** 2018. The effects of permeating cryoprotectant combination and IGF-1 supplementation for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. ***J. Applied Anima. Sci.*** 11 (Supplement): 72-75.

Liang, Y. and **Parnpai, R.*** 2018. Effect of vitrification procedures on the subsequent development of *in vitro* matured swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. ***Anim. Sci. J.*** DOI: 10.1111/asj.13044

Licia Colli, Marco Milanesi, Elia Vajana, Daniela Iamartino, Lorenzo Bomba, Francesco Puglisi, Marcello Del Corvo, Ezequiel L. Nicolazzi, Sahar S. E. Ahmed, Jesus R. V. Herrera, Libertado Cruz, Shujun Zhang , Aixin Liang, Guohua Hua,Liguo Yang, Xingjie Hao, Fuyuan Zuo, Song-Jia Lai , Shuilian Wang, Ruyu Liu, Yundeng Gong, Mahdi Mokhber, Yongjiang Mao, Feng Guan, Augustin Vlaic, Bogdan Vlaic, Luigi Ramunno, Gianfranco Cosenza, Ali Ahmad, Ihsan Soysal, Emel Ö. Ünal, Mariena Ketudat-Cairns, José F. Garcia, Yuri T. Utsunomiya, Pietro S. Baruselli, Maria E. J. Amaral, **Rangsun Parnpai,** Marcela G. Drummond, Peter Galbusera, James Burton, Eileen Hoal 31, Yulnawati Yusnizar, Cece Sumantr, Bianca Moioli, Alessio Valentini, Alessandra Stella, John L. Williams and Paolo Ajmone-Marsan. 2018. New Insights on Water Buffalo Genomic Diversity and Post-Domestication Migration Routes From Medium Density SNP Chip Data. ***Frontiers Genetics.*** 9: 53: 1-17.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2018. Effects of gel-embedded embryos on developmental competence of separated bovine blastomeres. ***Livestock Sci.*** 207: 25-29.

2017

Ye, D., Heraud, P., **Parnpai, R.*** and Li, T. 2017. Reversal of experimental liver damage after transplantation of stem-derived cells detected by FTIR spectroscopy. ***Stem Cell Intl.*** 4585169

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of storage tube material and resveratrol during liquid storage of matured bovine oocytes on subsequent development. ***Acta Veterinaria Hungarica*** 65: 546–555.

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2017. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12892.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2017. Survival and developmental competence of bovine embryos at different developmental stages and separated blastomeres after vitrification in different solutions. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/asj.12890

Pitchayapipatkul, J., Somfai, T., Matoba, S., **Parnpai, R.,** Nagai, T., Geshi, M. and Vongpralub, T.* 2017. Microtubule stabilisers docetaxel and paclitaxel reduce spindle damage and maintain the developmental competence of in vitro-mature bovine oocytes during vitrification. ***Reprod Fertil Dev.*** doi: 10.1071/RD16193.

Tanthaisong P, Imsoonthornruksa S, Ngernsoungnern A, Ngernsoungnern P, Ketudat-Cairns M, Parnpai R.*. 2017. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells by GSK-3 Inhibitors. ***PLoS One.*** 12: e0168059.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 88: 231–240.

2016

Kunkanjanawan, T., Carter, R.L., Prucha, M., Yang, J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2016. miR-196a ameliorates cytotoxicity and cellular phenotype in transgenic Huntington's disease monkey neural cells. ***PloS One*** 11: e0162788.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. ***J. Reprod. Dev.*** 62: 577-585.

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. ***Theriogenology.*** 86: 214-220.

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai. R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. ***Stem Cell Intl.*** 3038764.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. ***Theriogenology.*** 85: 509-518.

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.,** Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380.

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.*** 71: 216-223.

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.

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.*** 61 : 431-437.

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.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384. (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ 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. รางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปีงบประมาณ 2564 จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

11.2. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

11.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.4. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.5. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

12. การจดสิทธิบัติ

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน 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 ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

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

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

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