รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-59-24-15

รายงานการวิจัย

การศึกษาระบบการเลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของไข่อ่อนและตัวอ่อนโค

Study on improvement of *in vitro* culture system in bovine oocytes and embryos after *in vitro* fertilization

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-59-24-15

รายงานการวิจัย

การศึกษาระบบการเลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของไข่อ่อนและตัวอ่อนโค

Study on improvement of *in vitro* culture system in bovine oocytes and embryos after *in vitro* fertilization

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559-2560 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงฆ่าสัตว์พระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

ตุลาคม 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของไข่อ่อนโคในหลอดแก้วตลอดจนเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส รวมถึงสามารถพัฒนาวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดี จะสามารถนำไปใช้ในการผลิตตัวอ่อนโคในหลอดทดลองและย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ เพื่อเพิ่มจำนวนโคที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมในอนาคตต่อไป

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเลี้ยงไข่อ่อนโคให้สุกในหลอดแก้วด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนที่เติม EGF, cysteamine และเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว เพื่อศึกษาผลต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนโค พบว่าอัตราการปฏิสนธิ (61.36% - 78.72%) อัตรา polyspermy (2.27% - 18.86%) และ อัตรา normal fertilization (50.9% - 70.21%) ของไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มน้ำยาและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ((-)Cys; (-)EGF; 74.07%, 9.25% และ 64.81% ตามลำดับ) และภายหลังเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วต่อไป พบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ในกลุ่มไข่โคที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม cysteamine ((+)Cys; 48.38% และ 47.82%) และน้ำยาที่เติม cysteamine (%) และที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ((+)Cys; (+)COCs; 36.55% และ 36.95) ให้ผลที่สูงกว่ากลุ่มน้ำยาสูตรอื่น (35.86% - 36.90% และ 21.27% - 22.22%) และกลุ่มควบคุม (37.38% และ 24.29%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะคลีเวจ และ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกกันทางสถิติ ในแต่ละกลุ่มน้ำยาและระบบการเลี้ยง (74.44% – 84.44% และ 66.66% - 72.22%) และกลุ่มควบคุม (mSOFaa (5% O_2 8 วัน); 76.67% และ 65.55% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ในกลุ่มน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa+CCs (56.66% และ 45.55%) และ CR1aa-SOFaa+CCs (57.77% และ 44.44%) ให้ผลสูงกว่ากลุ่มน้ำยาอื่น (41.11& - 57.77% และ 33.33% - 45.55%) และกลุ่มควบคุม (38.88%-32.22%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจำนวน Trophectoderm (TE) และ Inner Cell Mass (ICM) ในบลาสโตซีส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในกลุ่มสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยงรวมทั้งกลุ่มควบคุม

การทดลองนี้สรุปได้ว่า การเลี้ยงไข่อ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine และมีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลส่งเสริมการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสภายหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการเลี้ยงตัวอ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในน้ำยา mSOFaa หรือ CR1aa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 6 วัน ซึ่งให้ผลของเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงสุด

Abstract

This research aimed to improving the maturation rate of immature bovine oocytes for *in vitro* fertilization (IVF) and embryo developmental rate into blastocyst stage as well as improving of culture system for increase the number and quality of embryos that can apply to *in vitro* embryo production and embryo transfer technuque for increase the good genetic cattle.

In experiment 1, bovine oocytes were cultured in different *in vitro* maturation (IVM) medium which were supplemented with epidermal growth factor (EGF), cysteamine (Cys) and cumulus cell monolayers (CCs). The fertilization rate and embryo developmental rate were evaluated after IVF. The results showed that the fertilization rate, polyspermy rate and normal fertilization rate were not significantly different within treatment groups (61.36% - 78.72%, 2.27% - 18.86% and 50.9% - 70.21%) and compared to control group ((-)Cys; (-)EGF; 74.07%, 9.25% and 64.81). The embryo developmental rate into morula and blastocyst stages of oocytes which were cultured in IVM medium supplemented with cysteamine ((+)Cys); 48.38% and 47.82%) and cysteamine with CCs ((+)Cys; (+)COCs; 36.55% and 36.95%, respectively) showed significantly higher ($P<0.05$) than those in other treatment groups (35.86% - 36.90% and 21.27% - 22.22%) and compared to control group (37.38% and 24.29%)

In experiment 2, bovine embryos after IVF were cultured in different embryo cultured medium including mSOFaa and CR1aa with/without cumulus cell monolayers. The results showed that the cleavage and 8-C rates were not significantly different within treatment groups (74.44% – 84.44% and 66.66% - 72.22%) and compared to control group (76.67% and 65.55%). However, the developmental rate into morula and blastocyst of embryos which were cultured in mSOFaa with CCs (mSOFaa+CCs; 56.66% and 45.55%) and CR1aa at early stage and then moved to SOFaa with CCs (CR1aa-mSOFaa+CCs 57.77% and 44.44%) showed significantly higher ($P<0.05$) than those in other treatment groups (41.11& - 57.77% and 33.33% - 45.55%) and compared to control group (38.88% – 32.22%). The number of TE and ICM cells in blastocysts were not significantly different among treatment and control groups.

This experiment can be concluded that IVM medium supplemented with cysteamine with cumulus cell monolayers has the adventages to improve the embryo developmental rate of oocytes into blastocyst stage after fertilization. Morover, *in vitro* culture of embryos

in medium supplemented with CCs can improve the developmental rate of embryo into blastocysts. Especially, when embryos were cultured in mSOFaa or CR1aa medium under humidified atmosphere of 5% O_2 for 2 days and then 8-cell embryo were seleted to continuous cultured in mSOFaa with CCs for 6 days which were gave a highest blastocyst rate in this study.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	5
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	5
3.2 การทดลองที่ 1	5
3.2.1 การเตรียมเซลล์คิวมูลัสและการเตรียมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่	5
3.2.2 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว	5
3.2.3 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว	6
3.2.4 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization, IVF)	6
3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	7
3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	7
3.3 การทดลองที่ 2	7
3.3.1 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	7
3.3.2 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectoderm (TE) และ Inner cell mass (ICM)	8
3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	9
4.1 ผลการทดลอง	9
4.1.1 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส	9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส	12
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	15
5.1 สรุปผลการวิจัย	15
5.2 ข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	16
ประวัติผู้วิจัย	21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิ	9
ตารางที่ 2 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน	10
ตารางที่ 3 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส	12
ตารางที่ 4 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่อจำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีส	13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การทำปฏิสนธิในหลอดแก้วในโค ตามปกติจะเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์แล้วจึงนำมาเจาะดูดไข่อ่อน จากนั้นนำมาเลี้ยงให้เป็นไข่สุกพร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้ว แต่ในปัจจุบันประเทศไทยมีโคเพศเมียส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์จำนวนน้อยลง ทำให้ได้รังไข่ในแต่ละวันมีจำนวนน้อยลงพร้อมทั้งคุณภาพไข่อ่อนที่ได้มีคุณภาพต่ำ และไข่อ่อนที่ได้ไม่เพียงพอต่อการทดลองในแต่วัน ดังนั้นจึงคิดค้นวิธีการเพิ่มอัตราการเจริญของไข่อ่อนให้สุกพร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้ว อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสให้มีอัตราที่สูงขึ้น รวมถึงสามารถพัฒนาวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดี ไปสู่ระบบอุตสาหกรรมการผลิตโค เพื่อเพิ่มจำนวนโคที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และผลของการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

1.2.2. เพื่อเปรียบเทียบสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และผลของการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

1.2.3. เพื่อเปรียบเทียบสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และผลของการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

1.2.4. เพื่อศึกษาคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ที่ผลิตได้จากสูตรน้ำยาและระบบการเลี้ยงตัวอ่อนในแบบต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำไข่อ่อนโคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาเลี้ยงในน้ำยาพร้อมให้ไข่สุกในหลอดแก้ว *(In vitro* maturation; IVM) โดยเปรียบเทียบน้ำยาที่เติมด้วย EGF, Cystemine และเลี้ยงกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว จากนั้นนำไข่โคไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว แล้วนำตัวอ่อนที่ได้ไปเลี้ยงต่อในหลอดแก้วจนถึงระยะบลาสโตซีส แล้วเปรียบเทียบระบบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วด้วยน้ำยา mSOFaa, CR1aa + 5% FBS และเลี้ยงกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว บันทึกอัตราการเจริญเติบโต แล้วนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่อายุ 8 วัน มาตรวจนับจำนวน Trophectroderm (TE) และ Inner cell mass (ICM)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1.ทราบสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนที่เหมาะสม และทราบวิธีการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วที่เหมาะสมต่ออัตราปฏิสนธิในหลอดแก้ว

1.4.2. ทราบสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนที่เหมาะสม และทราบวิธีการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

1.4.3. ทราบสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่เหมาะสม และทราบผลของการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

การนำเทคโนโลยีชีวภาพในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโค เช่น การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว (*in vitro* maturation, IVM) การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization, IVF) รวมถึงการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*in vitro* culture, IVC) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการขยายพันธุ์โคที่มีพันธุกรรมดี เนื่องจากโคเป็นสัตว์ที่การมีประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ต่ำ ให้ลูกครั้งละตัวและยังมีระยะเวลาตั้งท้องเฉลี่ยนานถึง 282 วัน ดังนั้นเมื่อนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน จะสามารถทำให้การขยายพันธุ์โคที่มีพันธุกรรมดีทำได้อย่างรวดเร็วขึ้น

การพัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายสัตว์นั้น เริ่มขึ้นในปี 1912 เมื่อ Brachet ทดลองเลี้ยงตัวอ่อนกระต่ายระยะบลาสโตซิสในจานทดลอง (glass dishes) โดยใช้ plasma clots เป็นอาหารเลี้ยง ในปี 1972 Tervit และคณะ ได้รายงานผลสำเร็จของการเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายสัตว์ มีรายงานการเกิดลูกสัตว์ในแกะโดยเลี้ยงตัวอ่อนแกะผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว โดยการใช้น้ำยา Synthetic Oviduct Fluid (SOF) หลังจากนั้นมีการพัฒนาสูตรน้ำยาเป็น Modified Synthetic Oviduct Fluid (mSOFaa) ซึ่งมีการใช้เลี้ยงตัวอ่อนโคกันอย่างแพร่หลาย และพบว่าทำให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสได้ดีขึ้น (Thompson และคณะ, 1996; Takahashi and First, 1992; Gardner และคณะ, 1994; Carolan และคณะ, 1995; Parnpai และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังพบรายงานการเลี้ยงตัวอ่อนโคด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ เช่น Shea และคณะ (1974) ใช้น้ำยา BMOC (Brinster's modified ova culture medium) เปรียบเทียบกับน้ำยา SOF ในการเลี้ยงตัวอ่อนโค ผลการศึกษาพบว่าตัวอ่อนโคระยะ 8-16 เซลล์ที่เลี้ยงในน้ำยา SOF สามารถเจริญไปจนถึงระยะบลาสโตซิสได้ดีกว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยา BMOC (57 และ 26% ตามลำดับ) และการใช้น้ำยา CR1aa (Charles Rosenkarns) (Sripanya และคณะ, 2010; Inaba และคณะ, 2011) รวมไปถึงการใช้น้ำยา KSOM (Nedambale และคณะ, 2004) ซึ่งพบว่าสามารถใช้เลี้ยงตัวอ่อนโคได้ผลดีเช่นกัน

อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบการเลี้ยงไข่และตัวอ่อนในหลอดแก้ว ได้เน้นไปที่การพัฒนาสูตรน้ำยาและระบบการเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของไข่และตัวอ่อน ซึ่งพบรายงานการศึกษาที่มีทั้งพัฒนาสูตรน้ำยาเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนเพียงอย่างเดียว และการพัฒนาระบบการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง Goto และคณะ (1994) และ Parnpai และคณะ (1999) ได้รายงานว่าการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส รวมถึงการเพิ่มคุณภาพของตัวอ่อน สูงกว่าเลี้ยงด้วยน้ำยาเพียงอย่างเดียว และพบว่าการเติมเซลล์พี่เลี้ยง เช่น เซลล์คิวมูลัส หรือ เซลล์แกนูโลซาเข้าไปจะสามารถเพิ่มอัตราการเกิดไข่สุก ระยะเมตาเฟต 2 ที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิและได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้วที่เพิ่มขึ้น (Fukui และคณะ, 1988) นอกจากนี้การเติมด้วยโกรทแฟ็กเตอร์ เช่น EGF ในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว และยังช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กเป็นแอลทรัลฟอลลิเคิลในโค (Kobayashi และคณะ, 1994), สุกร (Wang และคณะ, 1995) แต่การเติม EGF

เพียงอย่างเดียวยังไม่เพียงพอต่อการเจริญของไข่โค และยังพบรายงานการเติมสารเคมีชนิดอื่น เช่น Cysteamine เพื่อช่วยเสริมการทำงานของ EGF ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งพบว่าช่วยเพิ่มอัตราการเกิดไข่สุก ระยะเมตาเฟต 2 รวมถึงการเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิเข้าสู่ระยะมอลูราและบลาสโตซีสเพิ่มขึ้นในโค (Merton และคณะ, 2013; Takahashi และคณะ, 1993; de Matos และคณะ, 2000) การศึกษาวิจัยในครั้งจะศึกษาผลของน้ำยาเลี้ยงไข่ และตัวอ่อนในหลอดแก้ว รวมถึงระบบการเลี้ยงไข่และตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงคือ เซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ต่ออัตราการเกิดไข่สุก และอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ที่ได้จากน้ำยาและระบบการเลี้ยงในแบบต่างๆ เพื่อหาชนิดของน้ำยาและระบบการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของไข่และตัวอ่อนที่เลี้ยงในหลอดแก้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส

3.2.1 การเตรียมเซลล์คิวมูลัสและการเตรียมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่

หลังจากเลี้ยงไข่เป็นเวลา 23 ชั่วโมง ทำการย่อยเซลล์คิวมูลัสออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยไมโครปิเปต โดยทำการดูดขึ้น-ลง ในน้ำยา TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) เป็นเวลานาน 2 นาที จากนั้นทำการหยดน้ำยา 100 µl/หยด ลงจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) นำเข้าเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % CO_2 ในอากาศ บ่มเป็นเวลา 4 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงไข่อ่อนโคและตัวอ่อนโค

นำท่อนำไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ทำความสะอาดตัดเลาะส่วนที่เป็นเยื่อเมือกและไขมันออกให้มากที่สุด จากนั้นทำความสะอาดด้วย 70% Ethanol แล้วย้ายไปวางบนกระดาษทิชชูที่อบฆ่าเชื้อใช้เข็มขนาด 18 G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 5 mL เพื่อดูดน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) + 0.1% polyvinyl pyrolidone (PVP, Sigma, P-0930) จำนวน 1 ml ทำการสอดเข็มผ่านท่อนำไข่ เพื่อชะล้างและรีดส่วนที่เป็นเซลล์บุท่อนำไข่จากนั้นทำการย่อยเซลล์และล้างในน้ำยา mDPBS + 0.1% PVP จำนวน 2-3 ครั้ง รอให้ตกตะกอนแล้วล้างด้วยน้ำยาที่เติม TCM199 +10% FBS ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µl/หยด) แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของตัวอ่อนโค

3.2.2 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มขนาด 18 G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากถุงไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น นำมาล้างในน้ำยา mDPBS + 0.1% PVP ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100µl จากนั้นนำไข่อ่อนมาเลี้ยงในน้ำยาประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan), 1µg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-

8875) (Parnpai และคณะ, 1999) น้ำยาที่เติมด้วย 10 ng/ml EGF (Sigma, E-9644) , 100 μM/ml cysteamine (Sigma, M-9768) และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว เป็นเวลา 23 ชั่วโมง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ไม่เติม EGF และ cysteamine [(-)Cys; (-)EGF]

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม cysteamine [(+)Cys]

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม cysteamine และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว [(+)Cys; (+) COCs]

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม EGF [(+)EGF]

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม EGF และ เติม cysteamine [(+)EGF; (+)Cys]

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม EGF และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว [(+)EGF; (+)COCs]

กลุ่มที่ 7 เลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม EGF, เติม cysteamine และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว [(+)EGF; (+)Cys; (+)COCs]

3.2.3 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70% ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลาย แล้วไหลลงหลอด Eppendorf แล้วดูดน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด Conical ขนาด 15 ml ที่มีน้ำยา TALP (Lu และคณะ, 1987) ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปวางเอียง 45 องศา ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวจะเกิดความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิโดยมีความสามารถในการเคลื่อนที่เร็ว (hyperactive) และเกิดคาพาซิเตชั่น (capacitation) ทำให้เพิ่มอัตราการเจาะทะลุ (penetration) ชั้นของเซลล์คิวมูลัสและ zona pellucida (Dode และคณะ, 2002; Saito, 1994) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1ml ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา TALP 5 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วยน้ำยา TALP ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัวต่อซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 μl/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

3.2.4 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization, IVF)

นำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัสออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา TALP จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิเตรียมไว้ในข้อ 13.3 แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ นาน 10 ชั่วโมง

3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

เมื่อบ่มไข่และอสุจิด้วยกันครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid ที่เติมด้วยกรดอะมิโน (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) ในสัดส่วน 20 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เมื่อเลี้ยงตัวอ่อนต่ออีก 8 ชั่วโมง จะสุ่มตัวอย่างนำไป fixed และย้อมสีเพื่อตรวจสอบการปฏิสนธิของไข่แต่ละกลุ่ม ส่วนที่เหลือนำไปเลี้ยงต่อให้ครบ 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa ในสัดส่วน 10 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวัน

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากปฏิสนธิในหลอดแก้ว วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Sciences (SPSS®) โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

3.3. การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส

นำสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และระบบการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว ที่ให้อัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีสสูงสุด จากการทดลองที่ 1 เพื่อใช้เลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วซึ่งก็คือวิธีเลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาที่เติม cysteamine และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว [(+) Cys; (+)COCs]

3.3.1 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการบ่มเลี้ยงร่วมกับอสุจิแล้ว 10 ชั่วโมง ไปเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid with amino acids medium (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) หรือน้ำยา CR1aa +5% FBS (Rosenkrans และ คณะ, 1993) ในสัดส่วน 20 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคหรือคิวมูลัสเซลล์ ในน้ำยา mSOFaa หรือ CR1aa + 5% FBS ในสัดส่วน 10 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมงในน้ำยา mSOFaaและเลี้ยงกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว โดยสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมในน้ำยา mSOFaa ที่เลี้ยงภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 8 วัน [mSOFaa (5% O_2 8 วัน]

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน [mSOFaa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน]

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา CR1aa + 5% FBS ที่เลี้ยงภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 8 วัน [CR1aa (5% O_2 8 วัน)]

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา CR1aa + 5% FBS ที่เลี้ยงภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน, แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยา CR1aa + 5% FBS กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน [CR1aa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน]

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยา CR1aa + 5% FBS กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน (mSOFaa)-(CR1aa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา CR1aa + 5% FBS เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน (mSOFaa)-(CR1aa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)

ทำการบันทึกการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนหลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้วในกลุ่มการทดลองทั้ง 6 กลุ่ม

3.3.2 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectroderm (TE) และ inner cell mass (ICM)

เพื่อศึกษาคุณภาพของตัวอ่อนที่ผลิตได้ นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากแต่ละกลุ่มการทดลองมาย้อมเพื่อนับจำนวน TE และICM โดยปรับปรุงวิธีการย้อมจากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Suteevun และคณะ, 2006) กล่าวคือ ย่อยเปลือกตัวอ่อนออกโดยบ่มใน 0.5% protease (Sigma, P-8811) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก (Zona-free blastocyst) มาบ่มใน 10% rabbit anti-bovine spleenocyte antibodies เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement (Sigma, S-1639), 10 µg/ml propidium iodide (Sigma, P-4170) และ 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) นาน 30 นาที แล้วจึงผนึกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol (Merck, 4094) ปิดทับด้วยแผ่น cover slip แล้วจึงนำไปส่องนับจำนวนเซลล์ TE (ติดสีแดง) และ ICM (ติดสีน้ำเงิน) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่มีแสงอุลตร้าไวโอเลต

3.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดแก้ว วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Sciences (SPSS®) โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

จากการทดลองเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนร่วมกับ EGF, cysteamine และเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนโค จากการทดลองพบว่า อัตราการปฏิสนธิ อัตรา poly sperm และ อัตรา normal fertilized ของไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนสูตรต่างๆไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มสูตรน้ำยาและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ((-)Cys; (-)EGF; 74.07%, 9.25%และ 64.81% ตามลำดับ) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการปฏิสนธิ

Treatments	No. oocytes examined	No. (%) Fertilized	No. (%) Poly sperm	No. (%) Normal fertilized
(-)Cys; (-)EGF	54	40	5	35
		(74.07)	(9.25)	(64.81)
(+)Cys	47	37	4	33
		(78.72)	(8.51)	(70.21)
(+)Cys; (+)COCs	46	36	4	32
		(78.26)	(8.69)	(69.56)
(+)EGF	44	27	1	26
		(61.36)	(2.27)	(59.09)
(+)EGF; (+)Cys	44	32	8	24
		(72.72)	(18.18)	(54.54)
(+)EGF; (+)COCs	53	37	10	27
		(69.81)	(18.86)	(50.94)
(+)EGF; (+)Cys; (+)COCs	41	30	7	23
		(73.17)	(17.07)	(56.09)

ทำการทดลอง 9 ครั้ง

EGF เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ (Gutierrez-Adan และคณะ, 2004) และการเจริญของไข่ (Coskun และคณะ, 1991) โดยกระตุ้น receptor บนเซลล์คิวมูลัส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(Lonergan และคณะ, 1996; Khamsi และ Armstrong, 1997) มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์คิวมูลัส (cumulus cell expansion) ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของไข่ (Park และคณะ, 1999) ส่วนการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่และตัวอ่อนจะช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญของไข่และตัวอ่อน รวมทั้งคุณภาพของตัวอ่อนสัตว์หลายชนิด เช่น โค (Lojkic และคณะ, 2012) และกระบือ (Ocampo และ Ocampo, 2015) นอกจากนั้นยังมีผลของประสิทธิภาพของการปฏิสนธิและการสร้าง pronucleus ระหว่างกระบวนการปฏิสนธิ

จากตารางที่ 2 ภายหลังเลี้ยงตัวอ่อนต่อในหลอดแก้ว พบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะคลีเวจ และ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ((-)Cys; (-)EGF; 59.81% และ 43.92% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาในกลุ่มน้ำยา (+)Cys (48.38%) และ (+)Cys; (+)COCs (47.82%) ให้ผลสูงกว่ากลุ่มสูตรน้ำยา (+)EGF(+)EGF; (+)Cys (+)EGF; (+)COCs (+)EGF; (+)Cys; (+)COCs และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในกลุ่มสูตรน้ำยา (+)Cys (36.55%) และ (+)Cys; (+)COCs (36.95%)ให้ผลสูงกว่ากลุ่มสูตรน้ำยา (+)EGF(+)EGF; (+)Cys (+)EGF; (+)COCs (+)EGF; (+)Cys; (+)COCs และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ผลของของสูตรน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อน และการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน

Treatments	No. IVC	No. (%) Cleaved	No. (%) 8-C	No. (%) Mor.	No. (%) Bl.
(-)Cys; (-)EGF	107	64 (59.81)	47 (43.92)	40[a] (37.38)	26[a] (24.29)
(+)Cys	93	59 (63.44)	49 (52.68)	45[b] (48.38)	34[b] (36.55)
(+)Cys; (+)COCs	92	59 (64.13)	50 (54.34)	44[b] (47.82)	34[b] (36.95)
(+)EGF	92	58 (63.04)	45 (48.91)	33[a] (35.86)	20[a] (21.73)
(+)EGF; (+)Cys	84	52 (61.90)	42 (50.00)	31[a] (36.90)	18[a] (21.42)
(+)EGF; (+)COCs	90	54 (60.00)	46 (51.11)	33[a] (36.66)	20[a] (22.22)
(+)EGF; (+)Cys; (+)COCs	94	57 (60.63)	48 (51.06)	34[a] (36.17)	20[a] (21.27)

ทำการทดลอง 9 ครั้ง

[a, b] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากผลการเลี้ยงไข่อ่อนโคในน้ำยาทั้ง 7 สูตร พบว่ากลุ่มไข่ที่เลี้ยงสูตรน้ำยาเลี้ยงที่เติม cysteamine ((+) Cys) และสูตรน้ำยาที่เติม cysteamine และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ((+)Cys; (+)COCs) ให้ผลอัตราตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีสที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มสูตรน้ำยาสูตรอื่นซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ de Matos และคณะ (2002) ที่ว่าการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกโคช่วยเพิ่มอัตราการการพัฒนาของตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในโค เช่นเดียวกับการศึกษาของ Anand และคณะ (2008) ในการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกและน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนกระบือพบว่า ช่วยเพิ่มอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในกระบือ

นอกจากการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกในกระบวนการ IVM จะช่วยส่งเสริมการเจริญของตัวอ่อนแล้วนั้น (de Matose และคณะ, 1996; 2002; Ali และคณะ 2003; Karadjole และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ de Matos and Furnus (2000) ยังพบว่า การเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione ในเซลล์ไข่ระหว่างกระบวนการ IVM และยังคงอยู่ภายหลังกระบวนการ IVF ซึ่ง glutathione เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันความเสียหายของเซลล์ไข่และตัวอ่อนจากสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) (Li และคณะ 1993) ความสามารถในการสังเคราะห์ glutathione ของเซลล์จะขึ้นอยู่กับระดับ cysteine ในน้ำยาเลี้ยง (Furnus and De Matos, 1999) โดย cysteamine จะมีบทบาทในการเปลี่ยน cystine ไปเป็น cysteine ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์ glutathione ในเซลล์ไข่ (Issels และคณะ, 1988) นอกจากนั้น การเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione ยังช่วยลดการหยุดพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะ 8 เซลล์ ถึง 16 เซลล์ (development block at 8- to 6-cell stage embryos) ทำให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้เพิ่มขึ้น (Lee และคณะ, 2000) ซึ่งจากข้อมูลการศึกษาข้างต้นสามารถนำมาอธิบายผลของการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่มีผลต่ออัตราการพัฒนาตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่เพิ่มขึ้นในการทดลองนี้ได้

ส่วนการเลี้ยงไข่อ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนที่มีการเติม cysteamine ร่วมกับ EGF ((+)EGF; (+)Cys) และเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ((+)EGF; (+)Cys; (+)COCs) แม้จะมีการเติม cysteamine ในน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนแต่กลับไม่มีผลส่งเสริมต่ออัตราการพัฒนาตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส อย่างเช่นสูตรน้ำยาอื่นที่มีการเติม cysteamine จากการศึกษาของ El-Naby และคณะ (2016) โดยการเลี้ยงไข่อ่อนกระบือในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine ขนาด 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ EGF ขนาด 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าให้ผลการพัฒนาตัวอ่อนสูงกว่ากลุ่มน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine และ EGF อย่างเดียว แต่การศึกษาของ Singhal และคณะ (2009) โดยได้ทดลองเลี้ยงไข่อ่อนกระบือในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine 50 ไมโครกรัม ร่วมกับ EFG 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร กลับไม่มีผลส่งเสริมการพัฒนาของตัวอ่อนแต่อย่างได ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นเป็นได้ว่าความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของ cysteamine และ EGF ที่เติมในน้ำยาเลี้ยงอาจให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน

4.1.2 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส

จากการทดลองเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วในสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ คลีเวจ และ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มสูตรน้ำยาและระบบการเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (mSOFaa (5% O_2 8 วัน); 76.67% และ 65.55% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาในกลุ่มน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa+CCs(56.66%) และ CR1aa-SOFaa+CCs(57.77%) ให้ผลสูงกว่ากลุ่มน้ำยาอื่น (mSOFaa+CCs, CR1aa, CR1aa+CCs และ (mSOFaa)-(CR1aa+CCs)) และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในกลุ่มสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa+CCs (45.55%) และ CR1aa-SOFaa+CCs (44.44%) ให้ผลสูงกว่ากลุ่มสูตรน้ำยาอื่น (mSOFaa+CCs, CR1aa, CR1aa+CCs และ (mSOFaa)-(CR1aa+CCs)) และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) และจำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งในกลุ่มสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยง รวมทั้งกลุ่มควบคุม(ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วถึงระยะบลาสโตซีส

Treatments	No. IVC	No. (%) Cleaved	No. (%) 8-C	No. (%) Mor.	No. (%) Bl.
mSOFaa (5% O_2 8 วัน)	90	69 (76.67)	59 (65.55)	35[a] (38.88)	29[a] (32.22)
mSOFaa + CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน)	90	75 (83.33)	64 (71.11)	51[b] (56.66)	41[b] (45.55)
CR1aa (5% $O_2$8วัน)	90	68 (75.55)	60 (66.66)	37[a] (41.11)	30[a] (33.33)
CR1aa + CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน)	90	67 (74.44)	61 (67.77)	38[a] (42.22)	32[a] (35.55)
(mSOFaa) - (CR1aa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)	90	68 (75.55)	61 (67.77)	38[a] (42.22)	31[a] (34.44)
(CR1aa) - (SOFaa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)	90	76 (84.44)	65 (72.22)	52[b] (57.77)	40[b] (44.44)

ทำการทดลอง 9 ครั้ง

[a, b] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 ผลของสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ต่อจำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีส

Treatments	จำนวน BL	TE cells	ICM cells	Total cells
mSOFaa (5% O_2 8 วัน)	20	138.5±48.6	23.0±18.3	161.5±36.9
mSOFaa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน)	20	129.3±26.8	25.6±10.0	154.9±36.8
CR1aa (5% $O_2$8วัน)	20	117.0±49.2	26.5±13.5	143.5±62.7
CR1aa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน)	20	151.3±21.1	30.2±10.8	181.5±31.9
(mSOFaa)-(CR1aa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)	20	121.0±33.2	27.5±13.4	148.5±46.6
(CR1aa)-(SOFaa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)	20	149.0±51.3	49.6±12.7	198.6±64.0

BL = Blastocyst, TE = Trophoectoderm, ICM= Inner cell mass

ช่วงเวลาสำคัญของการเจริญของตัวอ่อนเกิดขึ้นตั้งแต่ภายหลังการปฏิสนธิจนเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส (Kharche และคณะ, 2011) ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาได้ดีเพียงใดส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยของความเหมาะสมของส่วนประกอบของน้ำยาและระบบการเลี้ยงตัวอ่อนซึ่งในกระบวนการเลี้ยงตัวอ่อนโคมีรายงานใช้น้ำเลี้ยงตัวอ่อนหลายชนิด เช่น mSOFaa และ CR1aa ที่มีการใช้ทั่วไปในเลี้ยงตัวอ่อนทั้งในในโค (Rosenkransและคณะ, 1993) กระบือ (Kumar และคณะ, 2007) และแกะ (Wang และคณะ, 1998) น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบสารเคมีสำคัญพื้นฐานที่คล้ายกัน แตกต่างอาจจะแตกต่างกันบ้างในสารที่อาจเติมเข้าไปในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิด เช่น กรดอะมิโน fetal bovine serum และ bovine serum albumin

ผลการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาและระบบการเลี้ยงทั้ง 6 แบบ พบว่ากลุ่มตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน (mSOFaa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน) และกลุ่มตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยา CR1aa + 5% FBS เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในน้ำยาmSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน ((mSOFaa)-(CR1aa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)) ให้ผลการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มน้ำยาและระบบการเลี้ยงอื่น

นอกจากนั้นยังพบว่า ถึงแม้การเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa และ CR1aa ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส (mSOFaa (5% O_2 8 วัน) และ CR1aa (5% $O_2$8วัน)) ในระบบการเลี้ยงแบบเดียวกันจะให้ผลของอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีสที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อมีการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์คิวมูลัสในน้ำยาเลี้ยงทั้งสองชนิดกลับพบว่า กลุ่มน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa ที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว

(mSOFaa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน)) ให้ผลของอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีสที่สูงกว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยา CR1aa ที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวในระบบการเลี้ยงแบบเดียวกัน (CR1aa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน))

และอีกข้อสังเกตหนึ่งในงานทดลองนี้ พบว่าในกลุ่มระบบการเลี้ยงที่มีการคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน (mSOFaa+CCs (5% O_2 2 วัน+5% CO_2 6 วัน) และ (CR1aa)-(SOFaa+CCs) (5% O_2 2 วัน; CO_2 6 วัน)) ให้ผลของการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่สูงกว่าการเลี้ยงตัวอ่อนแบบยาวในน้ำยาชนิดเดียวหรือการเลี้ยงที่ไม่ได้มีการเปลี่ยนน้ำยาเมื่อตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์

ซึ่งการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง เช่น เซลล์เยื่อบุท่อรังไข่และเซลล์คิวมูลัส (Cognie และคณะ, 2003) มีจุดประสงค์เพื่อเลียนแบบกระบวนการเจริญของตัวอ่อนในร่างกายสัตว์ ซึ่งเซลล์เหล่านั้นมีความสำคัญในการผลิตสารจำพวก growth factor (Orsi และ Reischl, 2007) และการที่มีเซลล์คิวมูลัสยังช่วยเพิ่มระดับ pyruvate และ lactate ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของตัวอ่อน (Edwards และคณะ, 1997; Kumar และคณะ, 2007) จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในระยะแรกจะเลี้ยงในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนต่ำ ระดับออซิเจนในระบบเลี้ยงมีผลอย่างมากต่อการเจริญของตัวอ่อน โดยปกติแล้วการเจริญของตัวอ่อนในระยะแรกจะเกิดขึ้นที่ท่อนำไข่ (oviduct lumen) (Betteridge, 1995) ซึ่งมีระดับออกซิเจนที่ต่ำกว่าบรรยากาศภายนอกร่างกาย (Bishop, 1956; Maas และคณะ, 1976) และยังมีรายงานการใช้ออกซิเจนในระดับต่ำ (5% O_2) ในระบบการเลี้ยงตัวอ่อนโคให้ผลของอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ดีกว่าการใช้ออกซิเจนที่ความเข้มข้นสูง (19% O_2) (Liu และ Foote, 1995)

แต่ในระบบการเลี้ยงที่มีย้ายตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเลี้ยงในสภาวะที่ระดับออกซิเจนสูงขึ้น (5% CO_2 ในอากาศ) การเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง เช่น เซลล์คิวมูลัสจะช่วยลดผลกระทบต่อตัวอ่อนของระดับความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำยาได้ (Volkel และ Hu, 1992; Goto และคณะ, 1994)

ดังนั้นในการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในน้ำยา mSOFaa หรือ CR1aa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งให้ผลของเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงสุด

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การเลี้ยงไข่อ่อนในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่มีการเติม EGF, cysteamine และเลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

5.1.2 การเลี้ยงไข่อ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine และมีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลส่งเสริมการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสภายหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

5.1.3 การเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในน้ำยา mSOFaa หรือ CR1aa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ในอากาศ เป็นเวลา 6 วัน ซึ่งให้ผลของเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงสุด

5.1.4 การเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa หรือ CR1aa ที่มีและไม่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว และระบบการเลี้ยงตัวอ่อนในแบบต่างๆ มีผลต่อคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์คิวมูลัส ไข่และตัวอ่อนที่มีความเกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์ของ EGF และ cysteamine เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนผลการทดลองที่เกิดขึ้น

5.2.2 ควรมีการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสาร EGF และ cysteamine ที่ใช้เติมในน้ำยาเลี้ยงในหลายความเข้มข้น หรือทำการศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นที่ให้ผลดีที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Ali, A. A., Bilodeau, J. F., and Sirard, M. A. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. ***Theriogenology.*** 59: 939-949.

Anand, T., Kumar, D., Chauhan, M. S., Manik, R. S., and Palta, P. (2008). Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** 20: 253-257.

Betteridge, K. J. (1995). Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. ***Theriogenology***. 44: 1061-1098.

Bishop, D. W. (1956). Oxygen concentration in the rabbit genital tract. **In:** ***Proc 3rd Int Congress of Animal Reprod.*** Cambridge. P. 53-58.

Brachet, A. 1912. Development in vitro de blastodermeset de jeunes embryos de Mammifires. ***C. R. Acad. Sci.*** 155: 1191-1193.

Carolan, C., Lonergant, P., Van Lanendonckt, A., and Merrnillod, P. (1995). Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation, Fertilization and culture in vitro. ***Theriogenology.*** 43: 1115-1128.

Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., and Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. ***Theriogenology.*** 59: 171-188.

Coskun, S., Sanbuissho, A., Lin, Y. C., and Rikihisa, Y. (1991). Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). ***Theriogenology.*** 36: 485-494.

de Matos, D. G., Furnus, C. C., Moses, D. F., Martinez, A. G., and Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. ***Mol. Reprod. Dev.*** 45: 451-457.

de Matos, D. G., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., and Pasqualini, R. S. (2002). Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. ***Mol. Reprod. Dev.*** 62: 203-209.

de Matos, D.G., Furnus, C.C., (2000). The importance of having high glutathione level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β-mercaptoethanol, cysteine and cystine. ***Theriogenology.*** 53: 761-771.

Dode, M.A.N., 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 *Bosindicus*oocytes. ***Anim. Reprod. Sci.*** 69: 15-23.

Edwards, L. J., Batt, P. A., Gandolfi, F., and Gardner, D. K. (1997). Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. ***Mol. Reprod. Dev.*** 46: 146-154

El-Naby, A. S. A., Mahmoud, K. G. M., Scholkamy, T. H., Ahmed, Y. F., Sosa, G. A. M., and Abouel-Roos, M. E. A. (2016). Influence of Epidermal Growth Factor with Cysteamine on in-Vitro Buffalo Embryo Development. ***Egypt. J. Vet. Sci.*** 47: 27- 39

Fukui, Y. and Ono, H. (1988). *In vitro* development to blastocysts of in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of development of bovine oocytes. ***J. Reprod. Fertil***. 86: 501-506.

Furnus, C. C., and De Matos, D. G. (1999). The availability of cysteine in culture medium appears to be the limiting factor for glutathione synthesis in mammalian oocytes: ***Theryogenology***. 51: 373

Gardner, D. K. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. ***Cell. Biol. Int.*** 18: 1663-1179.

Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A. and Batt, P. A. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. ***Biol. Reprod.*** 50: 390-400.

Goto, K., Iwai, N., Ide, K., Takuma, Y., and Nakanishi, Y. (1994). Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. ***J. Reprod. Fertil.*** 100: 239-243.

Gutiérrez-Adam, N. A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P. N., Pintado, B., Fuente, J. D. L., and Lonergan, P. (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. ***Mol. Reprod. Dev.*** 68: 441-448.

Inaba, Y., Aikawa, Y., Hirai, T., Hashiyada, Y., Yamanouchi, T., Misumi, K., Ohtake, M., Somfai, T., Kobayashi, S., Saito, N., Matoba, S., Konishi, K., and Imai, K. (2011). In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 437-443.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Issels, R. D., Nagele, A., Eckert, K. G., and Wllmanns, W. (1988). Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. ***Bioch. Pharm***. 37: 881-888.

Karadjole, M., Getz, I., Samardžija, M., Matković, M., Makek, Z., Karadjole, T. and Vince, S. (2006). Influence of cysteamine supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes on developmental rate and embryo quality. ***Slovenian Veterinary Research***. 43: 48.

Khamsi, F. and Armstrong, D.T. (1997) Interactions between follicle stimulating hormone and growth factors in regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in bovine granulosa cells. ***Biol. Reprod***. 57: 684–688.

Kharche, S. D., Goel, P., Kumar Jha, B., Goel, A. K., and Jindal, S. K. (2011). Factors influencing in-vitro embryo production efficiency of caprine oocytes: A review. ***Indian J. Animal Sci***. 81: 344.

Kobayashi, K., Yamashita, S., and Hoshi, H., (1994). Influence of EGF and TGF-α on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. ***J. Reprod. Fertil.*** 100: 439-446.

Kumar, D., Palta, P., Manic, R. S., Singla, S. K., and Chauhan, M. S. (2007). Effect of culture media and serum supplementation on the development of in vitro fertilized buffalo embryos. ***Indian J. Anim. Sci***. 77: 697–701.

Lee, C. S., Koo, D. B., Fang, N., Lee, Y., Shin, S. T., Park, C. S., and Lee, K. K. (2000). Potent and stage specific action of glutathione on the development of goat early embryos in vitro. ***Mol. Reprod. Dev.*** 57: 48-54.

Li, J., Foote, R. H., and Simkin, M. (1993). Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. ***Biol. Reprod.*** 49: 33-37.

Liu, Z., and Foote, R. H. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent 02. ***Biol. Reprod.*** 53: 786-790.

Lojkic, M., Getz, I., Samardzija, M., Matkovic, M.,Bacic, G., Karadjole, T., Macesic, N., Folnozic, I., and Spoljaric, B. (2012) Effect of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. ***Acta Vet. Brno.*** 81: 229–234.

Lonergan, P., Carolan, C., Van-Langendonckt, A., Donnay, I.,Khatir, H., and Mermillod, P. (1996) Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. ***Biol. Reprod.*** 54: 1420-1429.

Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M., and McGovern, H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. ***Vet. Rec***. 121: 259-260.

Maas, D. H., Storey, B. T., and Mastroianni, L. (1976). Oxygen Tension in the Oviduct of the Rhesus Monkey (MacacaMulatta. ***Fertil. Steril.*** 27: 1312-1317.

Merton, J.S., Knijn, H.M., Flapper, H., Dotinga, F., Roelen, B.A.J., Vos, P.L.A.M., and Mullaart, E., (2013). Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rates, and calf characteristics. ***Theriogenology***. 80: 365-371.

Nedambale, T.L., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J.R., Tian, X.C., and Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved byslow freezing or vitrification. ***Theriogenology***. 62: 437-449

Ocampo, L.C., and Ocampo, M.B. (2015) Improved developmental competence of swamp buffalo oocytes matured in the presence of cysteamine. ***J. Agric. Technol***. **11**: 31-40.

Orsi, N. M., and Reischl, J. B. (2007). Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. ***Theriogenology.*** 67: 441–58.

Park, K.W., Choi, S.H., Song, X.X., Funahashi, H., and Niwa, K. (1999) Production of plasminogen activators (PAS) in bovine cumulus oocyte complexes during maturation in vitro: Effect of epidermal growth factor on production of PAS in oocytes and cumulus cells. ***Biol. Reprod.*** 61: 298–304.

Parnpai, R., Tasripoo, K., and Kamonpatana, M. (1999). Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblast: Comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle epithelial cells. ***Buffalo. J.*** 15: 371–384.

Rosenkrans Jr, C. F., Zeng, G. Q., McNamara, G. T., Schoff, P. K., and First, N. L. (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. ***Biol. Reprod.*** 49: 459-462.

Saito, N. (1994). Manual of Embryo Transfer & *In Vitro* Fertilization in Cattle. ***National Livestock Breeding Center***. Japan: MAFF.

Shea, B. F., Church, R. B., and Tervit, R. (1974). In vitro culture and transfer of bovine ova. ***Seventh Ann. Meet. of Soc. for the study of Reprod.***, Ottawa (Abstr. 147).

Singhal, S., Prasad, S., Singh, B., Prasad, J. K., and Gupta, H. P. (2009). Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. ***Anim. Reprod. Sci***. 113: 44-50.

Sripanya, 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: 176-781.

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

Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., and Okano, A., (1993). Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine. ***Biol. Reprod***. 49: 228-232.

Takahashi, Y. and First, N. L. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryo: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. ***Theriogenology.*** 37: 963-978.

Tervit, H. R., Whittingham, D. G. and Rowson, L. E. A. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. ***J. Reprod. Fertil***. 30: 492.

Thompson, J. G., Partridge, R. J., Houghton, F. D., Cox, C. I., and Lees, H. J. (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. ***J. Reprod. Fertill.*** 106: 299-306.

Voelkel, S. A., and Hu, Y. X. (1992). Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. ***Theriogenology***. 37: 1117-1131.

Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R., Evans, R. C., and Bunch, T. D. (1998). A protocol for in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes. ***Small Ruminant Research.*** 29: 83-88.

Wang, W.H., and Niwa, K., (1995). Effect of epidermal growth factor and gonadotropins on cumulus expension and nuclear maturation of pig oocytes in serum-free medium. ***Assited. Repord. Thchnol/Androl***. 7: 41-55.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เกิดวันที่ 7 มีนาคม 2502

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 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 อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร 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

2018

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.

2014

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.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24.

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.

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.

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.*, Chan, A.W.S.*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis*** 2: 1000116.

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.

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.

2013

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.

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.

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.

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.

2012

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 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.*, 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.

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

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.

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** http://dx.doi.org/10.1016/j. smallrumres.2012.10.011

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.

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.

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.

2011

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.

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

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.

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.

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. 3

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.

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.

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.

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. 2010

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.

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.

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.

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., 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.

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. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

11.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.4. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

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

11.6. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.7. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.8. ศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

12. การจดสิทธิบัตร

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน 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