รหัสโครงการ SUT3-304-58-24-17

รายงานการวิจัย

วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาท (Protocol for neural induction of non-human primate rhesus monkey embryonic stem cells)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-58-24-17

รายงานการวิจัย

วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาท (Protocol for neural induction of non-human primate rhesus monkey embryonic stem cells)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558-2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัย ดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

หัวหน้าโครงการ

สิงหาคม 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่สามารถแยกได้จากตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีส เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้อย่างไม่จำกัด โดยที่เซลล์ยังคงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด สามารมารถเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดไว้ในสภาวะที่เหมาะสมและยังคงมีศักยภาพในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆที่ทำหน้าที่ได้ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเซลล์ประสาท เป็นต้น การวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นสิ่งที่สำคัญในการศึกษากลไกของเซลล์มาประยุกต์ใช้ในเวชศาสตร์ฟื้นฟู อย่างไรก็ตามก่อนนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปใช้ในเวชศาสตร์ฟื้นฟูมีความจำเป็นต้องศึกษาถึงความปลอดภัย มาตรฐานต่างๆ และผลการรักษาในสัตว์ทดลองก่อน นักวิจัยควรต้องศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับมนุษย์ก่อน การศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากลิงวอกลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับมนุษย์ถึง 90% และถูกใช้เป็นตัวแทนของมนุษย์ในการศึกษาโรคต่างๆมากมาย รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ผลิตจากตัวอ่อนที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่ (ICSI) ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท เริ่มจากนำเซลล์มาตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยการทำ immunocytochemistry ผลการตรวจพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะ ได้แก่ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4, TRA1-60 และ alkaline phosphatase จากผลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากการทำ ICSI มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกอย่างแท้จริง จากนั้นได้ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท แล้วตรวจสอบด้วยวิธี immunocytochemistry ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาท ได้แก่ Nestin, B III tubulin, MAP2 and GFAP จากผลการทดลองข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า วิธีการที่ใช้เหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาทมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบคุณสมบัติและความปลอดภัยในการปลูกถ่ายให้สัตว์ทดลอง ก่อนที่จะประยุกต์ใช้ในเวชศาสตร์ฟื้นฟู

Abstract

Embryonic stem cells (ES cells) are the cells derived from embryo at blastocyst stage, which are growing and developing into different cell types. ES cells are capable of replicating itself (Self-renewal) and still retain the property of ES cells. ES cells can be preserved under optimum conditions in the laboratory and also have the ability to turn into different type of cells, including muscle cells, cardiac muscle cells and nerve cells. ES cell research is an important tool in the study of the mechanism of the cell in regenerative medicine. However, before use ES cells for regenerative medicine, it required studies for safety, standard features and positive aspects of this type of stem cells in animal models. Researchers need to study ES cells from other animals that are similar to most human beings. ES cell of rhesus monkey is so interested in research. Since there is a close genetic relative to humans more than 90% and also using rhesus monkey as a model to study the disease in human beings including neurological disease.

The aim of this study was to induction of rhesus monkey ES cells derived from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryos into neuron cells. Starting from examining the properties of ES cells by immunocytochemistry. The results showed that rhesus monkey ES cells expressed specific protein markers that are indicative of true rhesus monkey ES cells including Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4 TRA1-60 and alkaline phosphatase. Then induction of rhesus monkey ES cells differentiated to be neuron cells which confirmed by immunocytochemistry. The results found that the entire cells expressed specific protein markers of the neuron cells including Nestin, B III tubulin, MAP2 and GFAP. From the results can be concluded that the induction protocol are efficient, however, need to do further studies to verify the property and safety of neuron cells transplantation to animal models in order to apply in regenerative medicine.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อ..... ข

สารบัญ..... ง

สารบัญภาพ..... จ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 1

ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 1

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย..... 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล..... 5

การทดลองที่ 1 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง..... 5

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก..... 5

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน..... 6

การทดลองที่ 4 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ประสาทผ่าน Embryoid bodies..... 6

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง..... 7

การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก..... 7

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เป็นเซลล์ประสาท..... 7

วิจารณ์ผลการทดลอง 8

บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล..... 10

ข้อเสนอแนะ..... 10

บรรณานุกรม..... 12

ภาคผนวก ก..... 15

ประวัติผู้วิจัย..... 15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์..... 7
ภาพที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาท..... 8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน คือเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส โดยนำ inner cell mass มาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนคือ มีความสามารถในการแบ่งตัวเองได้ (self-renewal) และมีศักยภาพที่จะกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจึงเป็นเครื่องมือวิจัยที่สำคัญในการนำมาศึกษากลไกการทำงานระหว่างเซลล์ และเวชศาสตร์ฟื้นฟูในทางการแพทย์ (regenerative medicine) อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ไปใช้ในทางคลินิกนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาความปลอดภัย วิธีมาตรฐาน และคุณสมบัติด้านบวกของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ในโมเดลสัตว์ทดลองเสียก่อน นักวิจัยจึงทำการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากสัตว์อื่นที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากที่สุด เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกจึงเป็นที่สนใจในการทำการศึกษาวิจัย เนื่องจากมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากกว่า 90% เมื่อเทียบกับมนุษย์ และยังมีการใช้ลิงวอกมาเป็นโมเดลในการศึกษาโรคต่างๆของมนุษย์อีกด้วย

การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนทำได้โดยการนำ inner cell mass ซึ่งอยู่ภายในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตได้จาก 2 วิธี คือ 1) การผลิตตัวอ่อนในห้องทดลอง (*in vitro*) เช่น การทำโคลนนิ่ง (cloning) การฉีดอสุจิเข้าไปในไข่ (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) การปฏิสนธิภายในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization; IVF) และวิธีพาธีโนเจเนซีส (parthenogenesis) และ 2) การผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย (*in vivo*) การศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาทนั้น ส่วนใหญ่มาจากตัวอ่อนที่ได้จากการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย และยังไม่มีรายงานปรากฏมากนักในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนในห้องทดลอง ดังนั้น งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาท

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากตัวอ่อนของลิงวอกที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ไปเป็นเซลล์ประสาท

1.2.2 เพื่อตรวจสอบคุณลักษณะในเซลล์ประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 เหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ไปเป็นเซลล์ประสาท

1.3.2 ทำการตรวจสอบคุณลักษณะในเซลล์ประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการ (ถ้ามี)

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI มีคุณสมบัติการแบ่งตัวเองได้ และยังสามารถเจริญเติบโตภายในสภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลานานและยังสามารถกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้ทั้ง เนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) เนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) และ เนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) ตามคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ หลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอก เซลล์ประสาทที่ได้มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาท และยังสามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเซลล์ประสาทภายในสมองอีกด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตรฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1 เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ทุกประการ

1.5.2 สามารถผลิตเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ได้

1.5.3 สามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง เสนอผลงานวิจัยในระดับนานาชาติได้อย่างน้อย 1 ครั้ง

1.5.4 เป็นการพัฒนาบุคลากรของชาติโดยคาดว่าจะสามารถพัฒนาบัณฑิตปริญญาโทได้ 1 คน

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

นำเสนอผลงานวิจัยและจัดการประชุมเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย โดยจัดที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีอีกทั้งร่วมกับคณะแพทยศาสตร์และโรงพยาบาลที่สนใจเพื่อนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในการผลิตเซลล์ประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกจากวิธีที่ผลิตตัวอ่อนในห้องทดลอง เพื่อใช้เป็นโมเดลต้นแบบในการศึกษากลไกของโรคในมนุษย์ และสร้างนวัตกรรมการรักษาโรคต่างๆที่เกิดกับมนุษย์ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic stem cells; ES cells) เป็นเซลล์ที่ได้มาจากตัวอ่อนระยะเริ่มต้นซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ภายในตัวอ่อนกำลังเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ในระยะนี้จะมีความสามารถในการจำลองตัวเอง (self-renewal) และมีศักยภาพที่จะกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆทั้ง 3 ชั้น เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถคงสภาพเดิมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในห้องทดลองได้นานหลายปี และยังคงความสามารถในการกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ประสาท และเซลล์เม็ดเลือด (Thomson และคณะ, 1998; Amit และคณะ, 2000) เป็นต้น การค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนครั้งแรกในหนูเมื่อ 30 ปีก่อน (Evans และ Kaufman, 1981; Martin, 1981) นำมาซึ่งความสำเร็จในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ตระกูลไพรเมท (Thomson และคณะ, 1995) และในมนุษย์ในปี 1998 (Thomson และคณะ, 1998) งานวิจัยของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้นถอดรูปแบบมาจากงานวิจัยบุกเบิกที่ทำการทดลองกับหนู แต่ผลการศึกษาวิจัยในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้นสนับสนุนการนำเซลล์ประเภทนี้มาประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งรวมไปถึงการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ให้กลายไปเป็นเซลล์ประเภทต่างๆ ประกอบไปด้วย เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์หลอดเลือด เซลล์เม็ดเลือด เซลล์ตับอ่อน เซลล์ตับ และเซลล์รก (Keller, 2005) นอกจากนั้น ยังมีการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ภายใต้สภาวะต่างๆ และผลิตวิธีที่เปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์เหล่านี้อีกด้วย (Eiges และคณะ., 2001; Zwaka และ Thomson, 2003) แม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์จะเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพในเวชกรรมฟื้นฟูทางการแพทย์ การศึกษารูปแบบในสัตว์ทดลองนั้นยังมีความจำเป็น เพื่อเป็นโมเดลการทดลองความปลอดภัย และตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนี้ เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกในมนุษย์ได้ ลิงวอก (rhesus macaque, *Macaca mulatta*) จึงถูกนำมาใช้เป็นโมเดลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ของมนุษย์ เพราะลิงวอกนั้นมันพันธุกรรมที่เหมือนกับมนุษย์มากกว่า 90% และยังสามารถนำมาใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษากลไกของโรคต่างๆที่เกิดในมนุษย์ได้อีกด้วย (Porrino และคณะ, 1987; Cornblath และคณะ, 1989; Rokkas และคณะ, 1993; Baskin และคณะ, 1998) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์และลิงวอกมีคุณสมบัติที่เหมือนกันทั้งรูปร่าง การแสดงของโปรตีนบนผิวเซลล์ และศักยภาพการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (Pau และ Wolf, 2004) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกอาจจะเป็นเครื่องมือสำคัญในการเป็นโมเดลต้นแบบของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปใช้ในทางการแพทย์ของมนุษย์ (Thomson และคณะ, 1995; Kuo และคณะ, 2003; Mitalipov และคณะ, 2006; Byrne และคณะ, 2007; Navara และคณะ, 2007; Rajesh และคณะ, 2007; Dighe และคณะ, 2008; Wianny และคณะ, 2008; Laowtammathron และคณะ, 2010) ซึ่งปัจจุบันพบรายงานการนำลิงวอกมาใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษากลไลของโรค Krabbe โรคพาร์คินสัน โรคเบาหวาน และโรคไขสันหลังบาดเจ็บ (Porrino และคณะ, 1987; Cornblath และคณะ, 1989; Rokkas และคณะ, 1993; Baskin และคณะ, 1998) ดังนั้น การนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากลิงวอกมาทำการปลูกถ่ายในลิงวอกโมเดลโรคต่างๆนี้ สามารถนำมาประเมินการใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ในการปลูกถ่ายได้เซลล์ไลน์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนั้นสามารถผลิตได้จากตัวอ่อน

ในห้องทดอง และตัวอ่อนในที่พัฒนาจากร่างกาย (Pau และ Wolf, 2004) ปัจจุบันมีการผลิตเซลล์ไลน์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกมาประมาณ 26 ไลน์ (Byrne และคณะ, 2006) ซึ่งแบ่งตามวิธีการผลิตจากตัวอ่อนในห้องทดลองได้ประมาณ 18 ไลน์ (ORMES) ผลิตโดย Oregon National Primate Research Center (Byrne และคณะ, 2006) และจำนวนไลน์ (R series) ที่เหลือผลิตจากตัวอ่อนที่พัฒนาในร่างกาย โดย Dr. James Thomson Wisconsin National Primate Research Center การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาทส่วนใหญ่จะศึกษาในเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนที่พัฒนาภายในร่างกาย (Thomson และคณะ, 1998; Kuo และคณะ, 2003; Salli และคณะ, 2004; Wolf และคณะ, 2004) งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาศักยภาพการกลายไปเป็นเซลล์ประสาทของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI รวมไปถึงประสิทธิภาพของวิธีการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ประสาทของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

การทดลองนี้ ทำ ณ ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดลองที่ 1 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง

นำหนูเม้าส์ที่ท้องมาแล้ว 13 วัน มาฆ่าด้วยวิธีเมตตาฆาต จากนั้นทำการเปิดช่องท้องเพื่อนำตัวอ่อนหนูออกมา ทำการตัดส่วนหัวและส่วนอวัยวะภายในช่องท้องของตัวอ่อนหนูออกแล้ว จากนั้นล้างเลือดออกด้วย PBS นำส่วนเนื้อเยื่อที่เหลือมาย่อยให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยน้ำยา Trypsin/EDTA ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin/EDTA ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงขนาด 75 ตารางเซนติเมตรในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน จนเซลล์เจริญเต็มภาชนะเพาะเลี้ยงแล้วจึง passage เซลล์ ทำการเลี้ยงจนได้ passage ที่ 4 (P4) แล้วจึง inactivate ด้วย 5 µg/ml mitomycin C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการ passage ไปเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงขนาด 3.5 ตารางเซนติเมตร เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงเพื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนต่อไป

3.3 การทดลองที่ 2 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

ในการวิจัยนี้จะใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ที่นำมาจาก Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, Georgia, USA ตามข้อตกลงร่วมกัน การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดมีวิธีคร่าวๆ ดังนี้ นำตัวอ่อนลิงวอกที่ระยะบลาสโตซีสมาล้างด้วยน้ำยา TALP-HEPES แล้วนำไปทำการแยกเอาเฉพาะ inner cell mass (ICM) ภายใต้กล้อง inverted โดยใช้เข็ม holding ยึดตัวอ่อนไว้ทั้งสองด้าน โดยให้ ICM อยู่ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา จากนั้นทำการตัดแยก ICM ออกจากเซลล์ trophectoderm (TE) โดยใช้ XYClone laser ที่ 100% power, 150 pulses/sec, 200 pulse width (µs) และ 10 sec duration จากนั้นนำ ICM ที่ได้ไปล้างในน้ำยาเลี้ยง embryonic stem cell (ES) ซึ่งประกอบไปด้วย DMEM ที่เติม 20 % knockout serum replacement, 20 ng/ml bFGF, 2mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin แล้วนำไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 10 ถึง 14 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาครึ่งหนึ่งทุกวัน ซึ่งจะพบเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเจริญออกมาจากก้อน ICM หลังจากนั้นให้ทำการ passage เซลล์โดยใช้เข็มแก้วทำเป็นตะขอขนาดเล็กตัดส่วนเซลล์ที่เจริญออกมาจากก้อน ICM แล้วนำไปเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงเซลล์อันใหม่ เมื่อเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีขนาด 400-500 µm ให้ทำการ passage จนถึง passage ที่ 5 แล้วทำการแช่

แข็งด้วยน้ำยาที่มี 10% dimethylsulfoxide (DMSO) จากนั้นขนส่งมายังประเทศไทยโดยใส่ในถังไนโตรเจนเหลว

3.4 การทดลองที่ 3 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในระยะ P5 จะถูกเก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ตรวจสอบว่าเซลล์นั้นมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunocytochemistry โดยตัวอย่างเซลล์จะถูก fixed ด้วย 4% paraformaldehyde ใน PBS นาน 4 นาที และล้างอีกครั้งด้วย 0.1M PBS จากนั้นป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะของ antibody ด้วย blocking solution ก่อนแล้วจึงใส่ primary antibody ได้แก่ Oct-4, Nanog, Sox-2, SSEA-1, 3, 4, TRA1-60 และ TRA1-81 หลังจากนั้นล้างด้วย PBS และใส่ secondary antibody จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ้นต์

3.5 การทดลองที่ 4 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ประสาทผ่าน embryoid bodies

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาทมีวิธีการคือ นำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่เลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงย้ายไปเลี้ยงในน้ำยา ES ที่ไม่มี FGF-2 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด non-attachable ขนาด 3.5 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5-7 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาครึ่งหนึ่งทุกๆ สองวัน จะพบเซลล์เจริญไปเป็น embryoid bodies นำ embryoid bodies ไปเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย gelatin ในน้ำยา N1 (KO-DMEM เติมด้วย minimum essential amino acid, 200 mM of L-glutamine, N2 supplement) เป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงต่อด้วยน้ำยา N2 (น้ำยา N1 เติมด้วย 20 ng/mL bFGF) เป็นเวลา 14 วันและน้ำยา N3 (KO-DMEM เติมด้วย 1% FBS และ B27 supplement 14 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ สองวัน จะพบเซลล์เจริญออกมาจากก้อน embryoid bodies ซึ่งคล้ายกับเซลล์ประสาท ในระยะนี้จะทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติด้วย วิธี Immunocytochemistry และใช้ primary antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาท คือ Nestin, βIII tubulin, GFAP และ MAP2

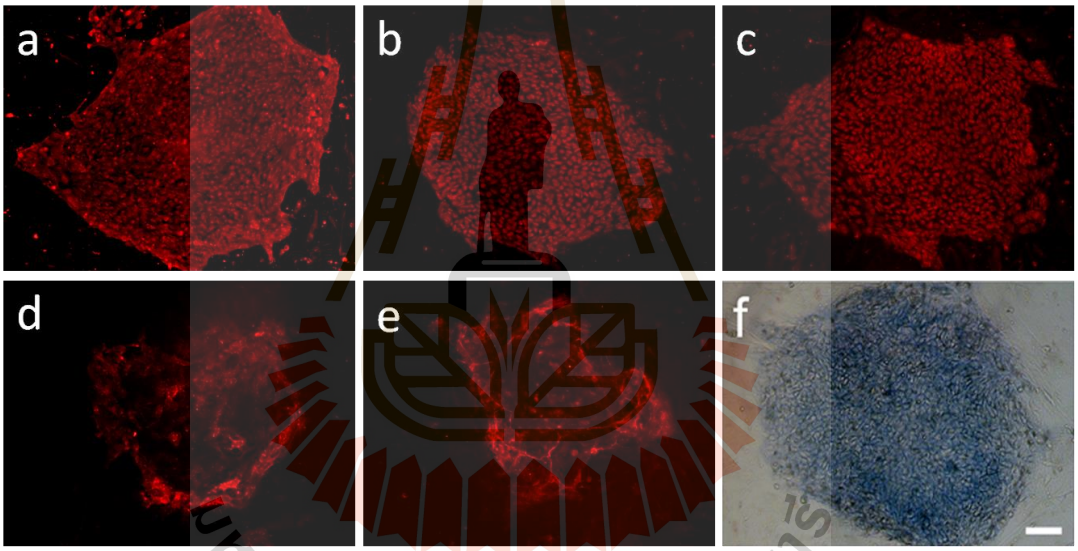
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกในระยะ P5 จะถูกเก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ตรวจสอบว่าเซลล์นั้นมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยดูการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunocytochemistry จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกมีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ได้แก่ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4, TRA1-60 และการสร้างเอนไซม์ Alkaline Phosphatase แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ SSEA-3 (ภาพที่ 4.1)

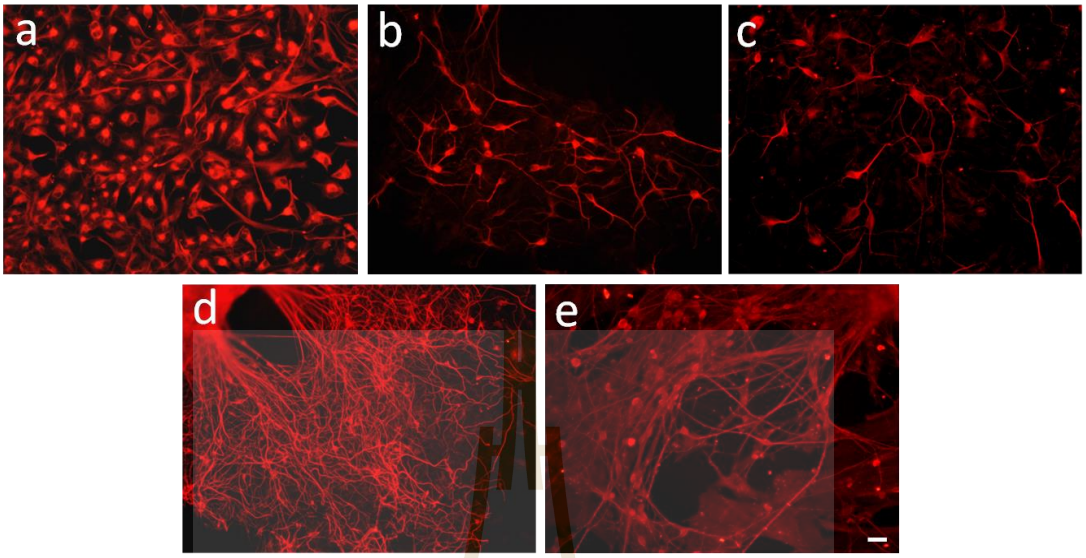


ภาพที่ 1 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ได้แก่ Nanog (a), Oct4 (b), SOX-2 (c), SSEA-4 (d), TRA-1-60 (e) ด้วยวิธี immunocytochemistry ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก และการสร้างเอนไซม์ alkaline phosphatase (f)

4.1.2 ผลการทดลองการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เป็นเซลล์ประสาท

การศึกษาความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก โดยจะศึกษาการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก โดยดูการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทในแต่ละระยะของการ differentiation ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี immunocytochemistry จากผลการทดลอง พบว่า ที่ระยะสิ้นสุดของระยะ N2 พบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาท Nestin ซึ่งจะพบได้ใน neural progenitor cells และ matured neuron จะพบได้หลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์ประสาทในระยะ N3 โดยพบการ

แสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาท ได้แก่ B III tubulin, MAP2 และ GFAP (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทได้แก่ Nestin (a), MAP2 (b), GFAP (c), B III tubulin (d), และ ChAT (e). ด้วยวิธี immunocytochemistry ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เป็นเซลล์ที่ได้มาจากตัวอ่อนระยะเริ่มต้นซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ภายในตัวอ่อนกำลังเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ในระยะนี้จะมีความสามารถในการจำลองตัวเอง และมีศักยภาพที่จะกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ประสาท และเซลล์เม็ดเลือด (Thomson และคณะ, 1998; Amit และคณะ, 2000) เป็นต้น เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเครื่องมือวิจัยที่สำคัญในการนำมาศึกษากลไกการทำงานระหว่างเซลล์ และเวชศาสตร์ฟื้นฟูในทางการแพทย์ แม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์จะเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพในเวชกรรมฟื้นฟูทางการแพทย์ การศึกษารูปแบบในสัตว์ทดลองนั้นยังมีความจำเป็น เพื่อเป็นโมเดลการทดลองความปลอดภัย และตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนี้เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกในมนุษย์ได้ ลิงวอก จึงถูกนำมาใช้เป็นโมเดลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ของมนุษย์ เพราะลิงวอกนั้นมีพันธุกรรมที่เหมือนกับมนุษย์มากกว่า 90% และยังสามารถนำมาใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษากลไกของโรคต่างๆที่เกิดในมนุษย์ได้อีกด้วย (Porrino และคณะ, 1987; Cornblath และคณะ, 1989; Rokkas และคณะ, 1993; Baskin และคณะ, 1998) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์และลิงวอกมีคุณสมบัติที่เหมือนกันทั้งรูปร่าง การแสดงของโปรตีนบนผิวเซลล์ และศักยภาพการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (Pau และ Wolf, 2004) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกอาจจะเป็นเครื่องมือสำคัญในการเป็นโมเดลต้นแบบของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปใช้ในทางการแพทย์ของมนุษย์ (Thomson และคณะ, 1995; Kuo และคณะ, 2003; Mitalipov และคณะ, 2006; Byrne และคณะ, 2007; Navara และคณะ, 2007; Rajesh และคณะ,

2007; Dighe และคณะ, 2008; Wianny และคณะ, 2008; Laowtammathron และคณะ, 2010) การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ไปเป็นเซลล์ประสาท เมื่อนำมาตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ได้แก่ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4 TRA1-60 และการสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase สำหรับการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI นี้ สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทได้ ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ประสาท ได้แก่ Nestin, B III tubulin, MAP2 และ GFAP

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI ไปเป็นเซลล์ประสาท โดยมีการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์หลังการเหนี่ยวนำด้วยวิธี Immunocytochemistry ซึ่งพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI เมื่อนำมาตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ได้แก่ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4 TRA1-60 และการสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase สำหรับการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากตัวอ่อนที่ผลิตในห้องทดลองด้วยการทำ ICSI พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกนี้ สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทได้ ซึ่งพบเซลล์เจริญออกมาจากก้อน embryoid bodies ที่มีลักษณะคล้ายลักษณะเฉพาะของเซลล์ประสาท โดยมีแขนงยื่นออกจากตัวเซลล์ ที่เรียกว่าแอกซอน (Axon) และ เดนไดรต์ (Dendrite) โดยแอกซอน จะมีลักษณะเป็นแขนงยาวยื่นออกจากเซลล์เพียงเส้นเดียว อาจมีการแตกแขนงระหว่างสายหรือที่ปลายสายของแอกซอน ทำหน้าที่นำสัญญาณประสาทจากตัวเซลล์เดินทางไปยังเซลล์เป้าหมาย และ เดนไดรต์เป็นแขนงสั้นๆ ยื่นออกจากตัวเซลล์ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวเซลล์ประสาทเพื่อทำหน้าที่รับสัญญาณจากเซลล์อื่นๆ ผ่านทางไซแนปส์ (Synapse) และนำสัญญาณเข้าสู่ตัวเซลล์ผ่านไปยัง axon hillock และชักนำให้เกิด action potential ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ประสาทได้แก่ Nestin (สำหรับติดตาม neural progenitor cells), B III tubulin (สำหรับติดตาม matured neuron), MAP2 (สำหรับติดตาม microtubule associated protein-2 ของเซลล์ประสาท), ChAT (สำหรับติดตาม acetylcholine (ACh) จากกระบวนการ neurotransmitter) และนอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ astrocytes หรือ glia cell ด้วย GFAP มาร์กเกอร์อีกด้วย

การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงที่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนหนูเม้าส์ (mouse embryonic fibroblast, MEF) จะถูก inactivate ด้วย 5 μg/ml mitomycin C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเนิดตัวอ่อนลิงวอก แล้วเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ประสาท ผู้วิจัยมีความมั่นใจว่าเซลล์ประสาทที่ได้ มาจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก เพราะการ inactivate เซลล์พี่เลี้ยงด้วย mitomycin C จะทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้อีกจึงไม่สามารถเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดใดๆได้อีก การใช้ MEF เป็นเซลล์พี่เลี้ยงเป็นวิธีมาตรฐานสากลในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ และลิงวอก เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

5.2 ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้ได้มีการควบคุมการทดลองเซลล์ต้นกำเนิดลิงวอกอยู่ที่ Passage 5 เพื่อให้เป็นมาตรฐานการทดลองที่เท่ากัน โดยจากการรายงานการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิด embryonic stem cells ทั้งของมนุษย์ (Xie และ

คณะ, 2011) หนูเมาส์ (Tamm และคณะ, 2013) และลิงวอก (Pau และ Wolf, 2004) ที่มีความสามารถในการจำลองตัวเอง (self-renewal) และแบ่งตัวแบบไม่มีที่สิ้นสุด ถึงแม้จะมีการเพิ่มจำนวนจนถึง Passage 10-15 ก็ยังคงคุณสมบัติของ embryonic stem cells อยู่ นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิด embryonic stem cells ของมนุษย์ที่ Passage สูงถึง Passage 128 มาใช้ในการทดลองและยังคงคุณสมบัติ self-renewal ไว้อยู่เมื่อเปรียบเทียบกับ Passage 38 แล้วให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน (Xie และคณะ, 2011)

และควรมีการทำการทดลองต่อโดยตรวจสอบคุณสมบัติและความปลอดภัยในการปลูกถ่ายให้สัตว์ทดลองก่อนที่จะประยุกต์ใช้ในเวชศาสตร์ฟื้นฟูในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Dev. Biol**. 227: 271-278.

Baskin G.B., Ratterree M., Davison B.B., Falkenstein K.P., Clarke M.R., England J.D., Vanier M.T., Luzi P., Rafi M.A., Wenger D.A. (1998). Genetic galactocerebrosidase deficiency (globoid cell leukodystrophy, Krabbe disease) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Lab. Anim. Sci.** 48: 476–482.

Byrne J.A., Mitalipov S.M., Clepper L., Wolf D.P. (2006). Transcriptional profiling of rhesus monkey embryonic stem cells. **Biol. Reprod**. 75: 908–915.

Byrne, J. A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature** 450: 497-502.

Cornblath D.R., Dellon A.L., MacKinnon S.E. (1989). Spontaneous diabetes mellitus in a rhesus monkey: neurophysiological studies. **Muscle Nerve.** 12: 233–235.

Dighe, V., Clepper, L., Pedersen, D., Byrne, J., Ferguson, B., Gokhale, S., Penedo, M.C.T., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2008). Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes. **Stem Cells** 26: 756-766.

Eiges, R., Schuldiner, M., Drukker, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2001). Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a maker for undifferentiated cells. **Curr. Biol.** 11: 514-518.

Evans, M. J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature** 292: 154-156.

Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. **Genes Dev.** 19: 1129-1155.

Kuo, H. C., Pau, K.Y.F., Yeoman, R.R., Mitalipov, S.M., Okano, H., and Wolf, D.P. (2003). Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. **Biol. Reprod.** 68: 1727-1735.

Laowtammathron, C., Cheng, E.C.H, 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 Biol**. 11.

Martin G. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 7634-7638.

Mitalipov, S. M., Kuo, H.C., Byrne, J., Clepper, L., Meisner, L., Johnson, J., Zeier, R., and Wolf, D.P. (2006). Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. **Stem Cells** 24: 2177-2186.

Navara, C. S., Mich-Basso, J.D., Redinger, C.J., Ben-Yehudah, A., Jacoby, E., Kovkarova-Naumovski, E., Sukhwani, M., Orwig, K., Kaminski, N., Castro, C.A., Simerky, C.R., and Schatten, G. (2007). Pedigreed primate embryonic stem cells express homogeneous familial gene profiles. **Stem Cells** 25: 2695-2704.

Pau K.Y., Wolf D.P. (2004). Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells. **Reprod. Biol. Endocrinol**. 2:41.

Porrino L.J., Burns R.S., Crane A.M., Palombo E., Kopin I.J., Sokoloff L. (1987) Changes in local cerebral glucose utilization associated with Parkinson's syndrome induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the primate. **Life Sci**. 40: 1657–1664. [PubMed: 3494179]

Rajesh, D., Chinnasamy, N., Mitalipov, S.M., Wolf, D.P., Slukvin, I., Thomson, J.A., and Shaaban, A.F. (2007). Differential requirements for hematopoietic commitment between human and rhesus embryonic stem cells. **Stem Cells** 25: 490-499.

Rokkas C.K., Sundaresan S., Shuman T.A., Palazzo R.S., Nitta T., Despotis G.J., Burns T.C., Wareing T.H., Kouchoukos N.T. (1993). Profound systemic hypothermia protects the spinal cord in a primate model of spinal cord ischemia. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg**. 106:1024–1035.

Salli U., Reddy A.P., Salli N., Lu N.Z., Kuo H.C., Pau F.K., Wolf D.P., Bethea C.L. (2004) Serotonin neurons derived from rhesus monkey embryonic stem cells: similarities to CNS serotonin neurons. **Exp. Neurol.** 188:351–364.

Tamm, C., Pijuan, G. S., Annerén, C. (2013). A Comparative Study of Protocols for Mouse Embryonic Stem Cell Culturing. **PLoS ONE** 8(12): e81156.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Heabn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA 92: 7844-7848.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science** 282: 1145-1147.

Wianny, F., Bernat, A., Huissoud, C., Marcy, G., Markossian, S., Cortay, V., Giroud, P., Leviel, V.,

Kennedy, H., Savatier, P., and Dehay, C. (2008). Derivation and cloning of a novel rhesus embryonic stem cell line stably expressing tau-green fluorescent protein. **Stem Cells** 26: 1444-1453.

Wolf D.P., Kuo H.C., Pau K.Y., Lester L. (2004). Progress with nonhuman primate embryonic stem cell. **Biol. Reprod.** 71:1766–1771.

Xie, X., Hiona, A., Lee, A. S., Cao, F., Huang, M., Li, Z., Cherry, A., Pei, X., & Wu, J. C. (2011). Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging. **Stem Cells Dev.** 20(1): 127–138.

Zwaka, T. P., and Thomson, J.A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol.** 21: 319-321.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

ประวัติ รศ.ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr .Rangsun Parnpai

2. **เกิด**วันที่ 7 มีนาคม 2502

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน รอง**ศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 30000 นครราชสีมา.เมือง จ.สุรนารี อ.มหาวิทยาลัย ต.ถ 111

โทร .044-224234 โทรสาร .044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต นครราชสีมา.เมือง จ.สุรนารี อ.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 25 ปีที่จบ41
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. การเขียนตำราหนังสือ-

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน*กรุงเทพฯ ,โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ., 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* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกรุงเทพฯ ,, หน้า 273-288.

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

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 3145 3 3Stem 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

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 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 โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ 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 ชั่วโมงหลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

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

11.2รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถา . อายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง“Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการ

ประชุมประจำปีของสมาคมปี 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. 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 ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลด“ เลข ”อุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว .ย.พ 28 อนุมัติวันที่ 9367 ทะเบียน2557