รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-55-36-06

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งโคด้วยการใช้สารเคมีที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก

(Improvement of bovine cloning by treatment with histone deacetylase inhibitors)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-55-36-06

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งโคด้วยการใช้สารเคมีที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก

(Improvement of bovine cloning by treatment with histone deacetylase inhibitors)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

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

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

สิงหาคม 2558

บทคัดย่อ

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้เทคโนโลยีการโคลนนิ่งจะสามารถผลิตโคได้สำเร็จก็ตาม แต่การผลให้ได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพตลอดจนได้ลูกเกิดนั้นยังคงมีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลผลิตที่ได้มีอัตราที่ต่ำ ซึ่งปัจจัยหลักของเทคโนโลยีการโคลนนิ่งนั้นคือ การ reprogramming ที่ผิดปกติในตัวอ่อนโคลนนิ่ง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการปรับปรุงการ reprogram ของตัวอ่อนโคลนนิ่งด้วยการทดสอบ trichostatin A (TSA), suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA) และ Reversine ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวสามารถช่วยปรับปรุงการ reprogram ให้ดีขึ้นได้ ดังจะได้เห็นจากผลการทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 nM ของ TSA บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1 μM ของ SAHA บ่มกับตัวอ่อนเป็น เวลา 6 ชั่วโมง หรือใช้ความเข้มข้น 1 μM ของ Reversine บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ สามารถช่วยปรับปรุงตัวอ่อนโคโคลนนิ่งให้พัฒนาจนถึงระยะบลาสโตซีสได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่า SAHA และ Reversine ยังช่วยให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ pluripotency, epigenetic และ imprinted ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งใกล้เคียงกับตัวอ่อนที่ผลิตด้วยวิธีเด็กหลอดแก้ว ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีน ซึ่งพบว่าระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตน 4 ที่ตำแหน่ง 5 (H4K5) ในกลุ่ม SAHA และ Reversine เข้าสู่สภาวะปกติใกล้เคียงกับตัวอ่อนที่ผลิตด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดทดลอง ที่สำคัญในกลุ่ม Reversine สามารถผลิตลูกโคโคลนนิ่งได้สำเร็จ ซึ่งมีอัตราลูกเกิดสูงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้บ่มใน Reversine ที่ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา 11 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Nowadays, it has been shown that bovine cloned embryos can undergo full term development. However, the developmental competence of reconstructed embryos is still low. One of the major obstacles of somatic cell nuclear transfer (SCNT) is incompletion of epigenetic reprogramming. Interestingly, it has been reported that treating embryos with trichostatin A (TSA), suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA) and Reversine can improve the completion of epigenetic reprogramming and thereby allowing the increased cloning efficiency. Thus, our study was undertaken to improve the development of bovine SCNT embryos by treatment of embryos with TSA, SAHA, and Reversine to investigate the relationship between histone acetylation status of embryos and developmental competence of SCNT embryos. Treatment of SCNT embryos with either 25 nM TSA for 12 h, 1 μM SAHA for 6 h or 1 μM Reversine for 6h after fusion could significantly improve embryo development to blastocyst stage. Meanwhile, SAHA and Reversine treatment could improve pluripotency, epigenetic and imprinted genes similar to *in vitro* fertilization (IVF) embryos. Importantly, SAHA and Reversine treatment significantly increased the level of H4K5 acetylation. Especially, the embryos treated with Reversine could get 25% full term development which is higher than the non-treated group that had only 11%.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ…… ก
บทคัดย่อภาษาไทย…… ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… ค
สารบัญ…….. ง
สารบัญตาราง……. ฉ
สารบัญภาพ……. ช
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย…… 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……. 1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย……. 2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย…….. … 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ…….. 2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม……. 3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล…….. 6
3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล…… 6
3.2 การทดลองที่ 1 ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ Reversine, SAHA และ TSA เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโค…… 6
3.3 การทดลองที่ 2 ผลของ Reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่อระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีน ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง……. 9
3.4 การทดลองที่ 3 ผลของ Reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่ออัตราการตั้งท้องและลูกที่เกิดมาได้ หลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งให้โคตัวรับ…….. 11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์…….. 12
4.1 ผลการทดลอง…… 12
4.1.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลของการทดสอบด้วย TSA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส…….. 12
4.1.2 ผลการทดลองที่ 2 ผลของการทดสอบด้วย SAHA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส……. 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.3 ผลการทดลองที่ 3 ผลของการทดสอบด้วย Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส…….. 15
4.1.4 ผลการทดลองที่ 4 ผลของการเปรียบเทียบระหว่าง TSA, SAHA และ Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส…… 16
4.1.5 ผลการทดลองที่ 5 ผลของ TSA, SAHA และ Reversine ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ pluripotency, epigenetic และ imprinted…….. 17
4.1.6 ผลการทดลองที่ 6 ผลของ TSA, SAHA และ Reversine ต่อการแสดงออกของระดับของการเติมหมู่อะเซทิลของฮีสโตน (histone acetylation) ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง…… 18
4.2 ข้อวิจารณ์……... 18
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ…… 24
บรรณนุกรม…….. 25
ภาคผนวก ก……. 31
ประวัติผู้วิจัย…….. 32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR…….. 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

4.1 แสดงผลการทดสอบด้วย TSA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญ
ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง…….. 13
4.2 แสดงผลการทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญ
ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง……. 14
4.3 แสดงผลการทดสอบด้วย Reversine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญ
ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง……. 16
4.4 แสดงผลการทดสอบด้วย Reversine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญ
ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและจำนวนเซลล์ ICM และ TE…….. 17
4.5 การแสดงออกของยีน *Oct4, Hat1, Hdac1, Xist, Ndn* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ……. 18
4.6 การแสดงระดับของ Histone acetylation ของ H4K5 ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง
ที่ถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ที่ระยะ 1 เซลล์, 8 เซลล์ และบลาสโตซีส…….. 19
4.7 แสดงลูกโคโคลนนิ่งอายุ 9 เดือนหลังคลอดที่เกิดจากการใช้ Reversine ที่ความเข้มข้น
1 μM บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์…….. 23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หลังจากความสำเร็จในการโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจากเซลล์ร่างกายเป็นครั้งแรกในแกะ (Wilmut et al.,1997) เป็นต้นมา ได้มีรายงานความสำเร็จต่อเนื่องในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น หนูถีบจักร (Wakayama et al., 1998), โค (Kato et al., 1998), แพะ (Baguisi et al., 1999), สุกร (Onishi et al., 2000), หนูแรท (Hayes et al., 2001), แมว (Shin et al., 2002), กระต่าย (Chesné et al., 2002), ม้า (Galli et al., 2003), ล่อ (Woods et al., 2003), สุนัข (Lee et al., 2005), กระบือ (Lu et al., 2005), เฟเร็ท (Li et al., 2006) และอูฐ (Wani et al., 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดสำคัญของเทคโนโลยีการโคลนนิ่งได้แก่ ความสำเร็จในการผลิตลูกสัตว์ยังต่ำอยู่มาก และมีความผิดปกติของลูกสัตว์ที่เกิด เช่น ตัวมีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักตัวมากกว่าปกติ หรือเกิด large offspring syndrome (LOS) มีรกขนาดใหญ่ ระบบทางเดินหายใจล้มเหลว จากผลดังกล่าว จึงมีนักวิจัยหลายคณะพยายามทำให้ประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งสูงขึ้น แต่ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร อันเนื่องมาจาก donor cell หรือ donor nucleus เกิด epigenetic reprogramming ไม่สมบูรณ์ ในทางทฤษฎีการทำให้กระบวนการ reprogramming ของเซลล์ต้นแบบให้เกิดอย่างสมบูรณ์อาจจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ (Wilmut et al., 2002) จากรายงานที่มีก่อนหน้านี้พบว่าสารเคมีที่ยับยั้งเอ็นไซม์ที่ดึงหมู่อเซทิลออกจากฮีสโตน (histone deacetylase inhibitor) เช่น Reversine, Trichostatin A (TSA) และ suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งในตัวอ่อนในสัตว์หลายชนิด เช่น หนูถีบจักร (Kishigami et al., 2006; Rybouchkin et al., 2006; Ono et al., 2010, Costa-Borges et al., 2010), โค (Enright et al., 2003; Shi et al., 2003), สุกร (Zhang et al., 2007; Miyoshi et al., 2010) และกระต่าย (Shi et al., 2008) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำโคลนนิ่งในโค จึงควรศึกษาชนิดของสารเคมี ความเข้มข้น ระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเจริญจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อศึกษาผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

1.2.2. เพื่อทราบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ reversine, SAHA และ TSA

1.2.3. เพื่อศึกษาผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่ออัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

1.2.4. เพื่อศึกษาผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่อระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน อัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ โดยทำการโคลนนิ่งโดยใช้ไฟโบรบลาสใบหูโคเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ หลังจากการหลอมรวมเซลล์ บ่มตัวอ่อนในน้ำยาที่มี reversine, SAHA และ TSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ระยะเวลาต่างๆ โดยจะบันทึกอัตราการเจริญของตัวอ่อน และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (นับจำนวนเซลล์) จากนั้นทำการผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้ reversine, SAHA และ TSA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้เปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสสูงสุด จากนั้นนำตัวอ่อนที่ได้ไปทำการศึกษาระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีน หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับ บันทึกอัตราการตั้งท้องและการได้ลูกเกิด และนำลูกแท้ง หรือลูกที่เกิดมา ทำการศึกษาระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีน

1.4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

ความสำเร็จในการโคลนนิ่งขึ้นอยู่กับการ reprogramming ที่สมบูรณ์ของเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนตัวอ่อนและลูกอ่อนที่ปกติ การใช้ histone deacetylase inhibitor อาจช่วยให้เกิดกระบวนการ reprogramming ของเซลล์ต้นแบบให้เกิดอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อน การฝังตัวของตัวอ่อนหลังทำการย้ายฝากให้โคตัวรับ และลูกที่เกิดมาไม่มีความผิดปกติ

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง คือทราบชนิดของสารเคมี ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโค ได้อัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังจากย้ายฝากให้โคตัวรับ อีกทั้งยังทราบข้อมูล histone acetylation และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อนหลังจากการบ่มด้วยสารเคมี นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

1.6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ จะสามารถนำไปถ่ายทอดให้กับนักวิจัยในหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกระบือ เช่น กรมปศุสัตว์ นักวิชาการในมหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

ความสำเร็จในการโคลนนิ่งขึ้นอยู่กับการ reprogramming ที่สมบูรณ์ของเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนตัวอ่อนและลูกอ่อนที่ปกติ (Mastromonaco and King, 2007) จากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่ผิดปกติ การแสดงออกของยีนที่ผิดปกตินี้ทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนในระยะต่างๆ (Bourc'his et al., 2001; Daniels et al., 2001; Bureau et al., 2003) การ reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน(epigenetic remodeling) เช่น DNA methylation และ histone modification (acetylation และ methylation) (Li et al ., 2007; Vaissiere et al., 2008; Wu et al., 2007) กระบวนการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออกเป็นการเปลี่ยนแปลง คือ การเติมหมู่อะเซทิล หรือดึงหมู่อะเซทิลออกจากโปรตีนฮีสโตน ในการเติมหรือดึงนี้ทำหน้าที่โดยเอ็นไซม์คู่หนึ่งคือ histone acetyltransferases (HATs) โดยจะทำหน้าที่เติมหมู่อะเซทิลลงที่โปรตีนฮีสโตน (histone acetylation) ผลที่ได้จากการเติมอะเซทิลนี้เป็นการทำลายประจุบวกของโปรตีนฮีสโตน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างโปรตีนฮีสโตนที่จับกับ DNA ลดลง DNA จึงคลายเกลียวออกจากโปรตีนฮีสโตน และเกิดถอดรหัสพันธุกรรม (transcription)ได้ ในทำนองกลับกัน เอ็นไซม์อีกตัวหนึ่งคือ histone deacetyltransferases (HDACs) จะทำหน้าที่การดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออกส่งผลให้โปรตีนฮีสโตนแสดงประจุบวกแล้วเกิดพันธะกับ DNA ที่แสดงประจุลบ ดังนั้นสาย DNA จึงจับกับโปรตีนฮีสโตนแน่นแล้วเกิดเป็น heterochromatin ซึ่งเกิด transcription ไม่ได้ การควบคุมการแสดงออกของยีนสามารถทำได้โดยทำให้เกิดการเติมหมู่อะเซทิลหรือดึงหมู่อะเซทิลออกจากโปรตีนฮีสโตนบนสาย DNA ที่ตำแหน่งของยีนที่จะควบคุม การที่ DNA จะขดตัวม้วนแน่นเป็น heterochromatin หรือคลายตัวออกเป็น euchromatin นั้นขึ้นกับภาวะของโปรตีนฮีสโตนซึ่งในภาวะปกตินั้นโปรตีนฮีสโตนชอบที่จะจับกับสาย DNA แล้วขดตัวม้วนแน่นเข้าเป็น chromatid ในภาวะนี้ RNA polymerase ไม่สามารถเข้าจับสาย DNAได้ ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีน แต่ถ้าหากว่า histone acetyltransferase ทำงาน RNA polymerase สามารถเข้ามาจับกับสาย DNA ดังนั้นจึงเกิด transcription ขึ้นได้ ดังนั้นรูปแบบไม่เหมาะสมของกระบวนการ histone acetylation อาจส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่ง การใช้ histone deacetylase inhibitor จะไปยับยั้งการทำงานของ histone deacetyltransferases มีผลทำให้หมู่อะเซทิลไม่ถูกดึงออกจากโปรตีนฮีสโตน แรงดึงดูดระหว่างโปรตีนฮีสโตนกับ DNA ลดลง ทำให้สาย DNA จึงคลายเกลียว ส่งผลให้ RNA polymerase สามารถเข้ามาจับกับสาย DNA แล้วเกิด transcription ได้ (Hoshikawa et al., 1994; Taunton et al., 1996)

จากรายงานปี 2004 โดย Chen และคณะ ค้นพบว่า 2-(4-morpholinoanilino)-6-cyclohexylamino-purine analogue ที่ความเข้มข้น 1-10 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ myogenic progenitor กลับไปเป็นเซลล์ตั้งต้นที่มีคุณสมบัติเป็น multipotent mesenchymal progenitor และเมื่อนำเซลล์ต้นตอที่ได้ไปเลี้ยงด้วยน้ำยาที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) หรือ เซลล์ไขมัน (adipocytes) สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ทั้งสองได้ จากคุณสมบัติของสารตัวนี้ที่สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงแล้ว (adult cells) กลับมาเป็นเซลล์ตั้งต้นอีกครั้ง จึงเรียกสารเคมีตัวนี้ว่า reversine (Chen et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า reversine มีคุณสมบัติในการยับยั้ง NMMII และ MEK1 ทำให้เพิ่มการเติมหมู่ acetyl ให้กับโปรตีน histone3 (H3) เกิดเป็น hyperacetylation ของโปรตีนฮีสโตน3 (histone3) เหมือนกับ TSA จากคุณสมบัติของ reversine ที่สามารถ reprogram เซลล์ร่างกายไปเป็นเซลล์ต้นตอได้ จึงเชื่อว่าถ้านำ reversine มาทดสอบกับตัวอ่อนโคลนนิ่งน่าจะเพิ่มศักยภาพการ reprogramming ได้เป็นอย่างดี ซึ่งในปัจจุบันก็ได้มีการศึกษา reversine กับตัวอ่อนโคลนนิ่ง โดย Miyoshi และคณะ ปี 2010 ได้ทดสอบ reversine กับตัวอ่อนสุกรโคลนนิ่งที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0-10 μM และช่วงเวลาในการทดสอบแตกต่างกัน พบว่า reversine ที่ระดับความเข้มข้น 5 μM เวลา 12 ชั่วโมง สามารถได้จำนวนบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ รวมทั้งกลุ่มควบคุม

suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ vorinostat ซึ่งเป็น histone deacetylase (HDAC) inhibitor อีกตัวซึ่งเป็นสารยับยั้งเอ็นไซม์ HDACs ที่มีฤทธิ์แรง เช่นเดียวกับ TSA ที่สามารถยับยั้งการทำงาน class I และ II ของ HDAC (Marks et al, 2001; Marks and Dokmanovic, 2005) ด้วยคุณสมบัติของ vorinostat ที่คล้าย TSA น่าจะส่งผลต่อการเพิ่ม reprogramming ของ donor nucleus ได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานปี 2010 โดย Ono และคณะ ศึกษาเปรียบเทียบความจำเพาะของ HDACi แต่ละตัวเช่น vorinostat, oxamfatin, valproic acid (VPA) โดยรักษาตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งด้วยความเข้มข้นแตกต่างกัน ผลจากการทดสอบพบว่า ความเข้มข้น 1 μM vorinostat เวลา 96 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวน บลาสโตซีสสูงสุดถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 10, และ 100 μM vorinostat นอกจากนี้การรักษาตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งที่ระดับความเข้มข้น 0.1 μM และ 1 μM oxamfatin เวลา 96 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนบลาสโตซีสสูงถึง 66 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของ VPA ไม่สามารถเพิ่มจำนวนบลาสโตซีสได้ (Ono et al., 2010) และเมื่อนำตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งระยะ 2 เซลล์จากผลข้างต้น ย้ายฝากไปยังแม่ตัวรับที่ระดับความเข้มข้น 1 μM vorinostat สามารถเพิ่มจำนวนลูกหนูที่ปกติ 9.4 เปอร์เซ็นต์ และ 1 μM oxamfatin เพิ่มจำนวนลูกหนูที่ปกติ 7.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ 50 nM TSA (2.6 เปอร์เซ็นต์) ส่วนผลของ HDACis ทั้งสองตัวยังสามารถเพิ่มจำนวนของมวลเซลล์ชั้นใน (Inner Cell Mass, ICM) และลดการ apoptosis ของ ICM ในระยะบลาสโตซีส ขณะที่ VPA ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ในระยะบลาสโตซีสได้ (Ono et al., 2010) จากผลของ vorinostat ที่กล่าวข้างต้น น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพ reprogramming ของ donor nucleus ในการทำโคลนนิ่งโคได้เช่นกัน

จากรายงานที่มีก่อนหน้านี้พบว่าการใช้ TSA เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างมากในการใช้ในสัตว์หลายชนิดเช่น หนูถีบจักร (Kishigami et al., 2006; Rybouchkin et al., 2006), โค (Enright et al., 2003; Shi et al., 2003), สุกร (Zhang et al., 2007) และกระต่าย (Shi et al., 2008) นอกจากนี้ TSA ยังช่วยเพิ่มอัตราการคลอดของตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งอีกทั้งลูกที่เกิดมายังไม่พบความผิดปกติอีกด้วย (Kishigami et al., 2006) จากรายงานพบว่าระดับ acetylation ของ lysine ที่ตำแหน่งต่างๆบน histone H3 และ H4 ของตัวอ่อนโคลนนิ่งมีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากบ่มตัวอ่อนใน TSA (Iager et al., 2008; Li et al., 2008; Rybouchkin et al., 2006; Shi et al., 2008; Wang et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า TSA ช่วยลดระดับ DNA methylation และการแสดงออกของ DNA methyltransferases ในเซลล์ต้นแบบและตัวอ่อนโคลนนิ่งอีกด้วย

จากรายงานที่กล่าวมาข้างต้น การใช้สารเคมีเติมไปในกระบวนการทำโคลนนิ่งสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนและได้ลูกที่เกิดมาไม่มีความผิดปกติ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาชนิดของสารเคมี ความเข้มข้นที่ใช้ ระยะเวลาที่เหมาะสม ในการทำโคลนนิ่งโค ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาในเรื่องดังกล่าว เพื่อปรับปรุงให้การโคลนนิ่งโคมีประสิทธิสูงสุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง การวิเคราะห์ระดับของการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน โดยใช้ฟาร์มศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งให้แก่โคตัวรับ

3.2. การทดลองที่ 1 ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ Reversine, SAHA และ TSA เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโค

3.2.1 วิธีการเตรียมเซลล์ต้นแบบ

การเตรียมไฟโบรบลาสใบหูโค ทำโดยเก็บตัวอย่างใบหูโคเพศผู้ แล้วแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะเข้าห้องปฏิบัติการ ทำการโกนขนแล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อน นำชิ้นผิวหนังที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆแล้วมาวางในจานเลี้ยงเซลล์แล้วนำแผ่นกระจกสไลด์ปิดทับ จากนั้นเติมน้ำยา αMEM (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha modification, Sigma, USA, M-0644) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาจากชิ้นใบหูในวันที่ 4–5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ แล้วนำเซลล์ที่แพสเซจ 3 มาแช่แข็งในน้ำยา αMEM + 20% FBS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany, 116743) แล้วจึงเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนใช้จะนำเซลล์ที่แช่แข็งไว้ นำมาเลี้ยงในน้ำยา αMEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย Trypsin /EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว เฉพาะแพสเซจ ที่ 4 เท่านั้นที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ

3.2.2 วิธีการเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มขนาด 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากถุงรังไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น นำมาล้างในน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) + 0.1% polyvinyl pyrolidone (PVP, Sigma, P-0930) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย

TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1μg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (Parnpai และคณะ, 1999)

3.2.3 การกำจัดนิวเคลียสออกจากไข่

หลังจากเลี้ยงไข่นาน 21 ชั่วโมง นำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase (Sigma, S-3506) แล้วคัดเลือกไข่ระยะ metaphase II (MII, มี first polar body) เพื่อนำไปกำจัดนิวเคลียสออกโดยใช้ micromanipulator (Narishige, Japan, model M0188NE) ภายใต้กล้อง inverted microscope (Olympus, Japan, model IX71)โดยบ่มไข่ในน้ำยาที่มี 5 μg/ml cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) จากนั้นใช้ปิเปตแก้วปลายแหลมตัดเปลือกไข่บริเวณเหนือ first polar body จากนั้นใช้ปิเปตกดให้ first polar body และไซโตพลาสซึมที่อยู่ใต้ first polar body ออกมาประมาณ 10% ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 μg/ml Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอัลตราไวโอเลต

3.2.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-16 μm) เข้าไปในบริเวณ perivitteline space จากนั้นทำการเชื่อมเซลล์ทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยนำไข่ที่ฉีดเซลล์ต้นแบบแล้วครั้งละ 1 ใบ ไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmermann fusion medium (Zimmermann และ Vienken, 1982) เชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 Volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้ง ต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา TCM199 (Sigma, M5017)-HEPES (Sigma, H4034) + 10% FBS แล้วพักไว้ 1 ชั่วโมง จึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol (Carlo Erba, France, 414607) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 μg/ml cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ 10 μg/ml cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Muenthaisong และคณะ, 2007)

3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid with amino acids medium (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) ในสัดส่วน 20 ใบ ต่อน้ำยา 100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C

ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa ในสัดส่วน 10 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกการเจริญของตัวอ่อนทุกวัน

3.2.6 การทดสอบด้วย reversine, SAHA และ TSA

3.2.6.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ reversine, SAHA และ TSA

หลังจากการเชื่อมเซลล์ไข่และเซลล์ต้นแบบแล้ว ไข่จะถูกบ่มในน้ำยา TCM199-HEPES + 10% FBS ที่มี reversine, SAHA และ TSA ความเข้มข้นต่างๆ (Reversine ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 µM , SAHA ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 µM , TSA ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 nM) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่เติม reversine, SAHA และ TSA ความเข้มข้นต่างๆ จนครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี reversine, SAHA และ TSA ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น

3.2.6.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ reversine, SAHA และ TSA

จากข้อ 3.2.6.1 จะทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ reversine, SAHA และ TSA จากนั้นจะศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ หลังจากการเชื่อมเซลล์ไข่และเซลล์ต้นแบบแล้ว ไข่จะถูกบ่มในน้ำยา TCM199-HEPES + 10% FBS ที่มี reversine, SAHA และ TSA ความเข้มข้นที่เหมาะสม นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่เติม reversine, SAHA และ TSA ความเข้มข้นที่เหมาะสม จนครบ 6, 12, 18 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี reversine, SAHA และ TSA ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น

3.2.7 การผลิตตัวอ่อนโคโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ทำการผลิตตัวอ่อนโคโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้วเพื่อนำมาเป็นกลุ่มควบคุม วิธีการมีดังนี้ นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70 % ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วดูดน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด Conical ขนาด 15 ml ที่มีน้ำยา TALP ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปวางเอียง 45 องศา ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1 ml ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา TALP 5 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วยน้ำยา TALP ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัวต่อซีซี แล้วนำไปหยดลง

บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µl/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่ โดยนำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัสออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา TALP 2 ครั้ง จากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง จากนั้นนำไข่ไปล้างด้วยน้ำยา mSOFaa เพื่อให้อสุจิ และเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกให้มากที่สุด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa เหมือนตัวอ่อนที่ผลิตด้วยวิธีการโคลนนิ่ง ดังวิธีในข้อ 3.2.5

3.2.8 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวนเซลล์ Trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM)

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสคุณภาพดีในวันที่ 7 ของการเลี้ยง นำมาย้อมเพื่อนับจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) 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) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.3. การทดลองที่ 2 ผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่อระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีน ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ reversine, SAHA และ TSA เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงสุด ในการทดลองครั้งนี้จะทำการศึกษาผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่อระดับของ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน โดยจะทำการผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง ดังวิธีในหัวข้อ 3.2 โดยใช้ reversine, SAHA และ TSA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วนำตัวอ่อนมาทำการทดลองดังนี้

3.3.1 การวิเคราะห์ histone acethylation

เก็บตัวอ่อนโคที่ได้จากการโคลนนิ่งและการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว ระยะ 1 เซลล์, 2 เซลล์, 4 เซลล์, 8 เซลล์, มอรูลา และบลาสโตซีส โดยล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จากนั้นบ่มตัวอ่อนใน 4% paraformaldehyde นาน 30 นาที จากนั้นบ่มในน้ำยา PBS + 0.5% triton X-100 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นบ่มใน 2N HCl นาน

1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง แล้วบ่มในน้ำยา PBS + 10% goat serum (blocking solution) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้ายตัวอ่อนไปบ่มในน้ำยา blocking solution + primary antibody (Ac-H3K9, Ac-H3K14, Ac-H4K5) ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที แล้วจึงบ่มในน้ำยา PBS + 0.1% PVP + secondary antibody นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้โดนแสง) แล้วล้างตัวอ่อนด้วย PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที (ป้องกันไม่ให้โดนแสง) จากนั้นย้อมตัวอ่อนด้วย DAPI แล้ว mount ตัวอ่อนลง slide แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

เก็บตัวอ่อนโคที่ได้จากการโคลนนิ่งและการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว ระยะ 1 เซลล์, 2 เซลล์, 4 เซลล์, 8 เซลล์, มอรูลา และบลาสโตซีส มาทำการสกัด mRNA โดยใช้ Oligo (dT) 25 นิวคลีโอไทด์ที่ติดอยู่กับเม็ดแม่เหล็ก (Dynabeads mRNA purification kit, Dynal) แล้วนำ mRNAที่ได้มาทำการสังเคราะห์สายดีเอนเอคู่สม (cDNA) โดยบ่ม mRNA ที่สกัดได้ในอุณหภูมิ 55 °C นาน 1 ชั่วโมง ในสารละลายที่มี 1x first stand buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM of each dNTP, 40U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) และ 200U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen) นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ เช่น *Oct4*, *Ndn*, *Xist*, *Hat1*, *Hdac1* และ *Histone H2a.2* (ตารางที่ 3.1) ในเชิงปริมาณ โดยใช้ Bio-Rad's SSO Fast EvaGreen supermix, SYBR (Bio rad) ด้วยเครื่อง Chromo4 Four-Color Real-Time PCR Detection System (Bio rad)

ตารางที่ 3.1 ไพเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR

Genes	**Primer sequences 5'-3'**	**Accession number**	**References**
Oct4	F: 5'CCACCCTGCAGCAAATTAGC3' R:5'CCACACTCGGACCACGTCTT3'	NM_174580	Iager et al., 2008
Ndn	F:5'AACGTGCTGCGCATCTTG3' R:5'TCAGGTAGTTCTGCTGGACGAA3'	AY360449	Wee et al., 2006
Xist	F: 5'AATAATGCGACAGGCAAAGG3' R: 5'TCCCGCTCATTTTCCATTAG3'	AF104906	Wee et al., 2006
HDAC1	F:5'CCAAGTACCACAGTGATGACTACATT3' R:5'AGAACTCAAACAGGCCATCAAA3'	XM_01767	Mcgraw et al., 2003

HAT1	F:5'ACTACATTGCATCTCCTTCTGTTC3' R:5'TCTTCACTGAATCCTTGCATTAAC3'	NM_003642	Mcgraw et al., 2003
Histone H2A.2	F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	BF076713	Ross et al., 2010

3.4. การทดลองที่ 3 ผลของ reversine, SAHA และ TSA ที่มีต่ออัตราการตั้งท้องและลูกที่เกิดมาได้หลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งให้โคตัวรับ

3.4.1 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคตัวรับ การย้ายฝากตัวอ่อน และการตรวจการตั้งท้อง

โคนมลูกผสมที่มีอายุระหว่าง 2-3 ปี ในฟาร์มของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด จะได้รับการเหนี่ยวนำให้มีสภาพของระบบสืบพันธุ์ที่เหมาะสมด้วยฮอร์โมนเพื่อใช้เป็นแม่โคตัวรับ โดยทำการฉีด $PGF_{2\alpha}$ 375 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และตรวจการเป็นสัดหลังจากฉีดฮอร์โมน 48-72 ชั่วโมง การย้ายฝากตัวอ่อนทำได้โดยนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา mDPBS + 0.4 mg/ml BSA 3 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน 1-2 ใบ ในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ซีซี นำไปใส่ในปืนฉีดตัวอ่อน (IMV) ซึ่งสวมด้วย ET sheath และ sanitary sheath ตัวอ่อนจะได้รับการย้ายฝากเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์ของแม่โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-7.5 วัน ตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์ และสรรเพชญ (2530) ในการทดลองครั้งนี้ จะทำการฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสให้แก่แม่ตัวรับ จำนวน 3 ตัวอ่อนต่อ 1 แม่ตัวรับ ทั้งในกลุ่มของตัวอ่อนที่บ่มใน reversine, SAHA และ TSA ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้เปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสสูงสุด

แม่โคตัวรับจะได้รับการตรวจการตั้งท้อง ที่วันที่ 45 หลังจากย้ายฝากด้วยอัลตร้าซาวด์ และจะได้รับการล้วงตรวจทางทวารหนักอีกครั้งภายหลังการย้ายฝาก 60 วัน แม่โคที่ตั้งท้องจะได้รับการล้วงตรวจเพื่อยืนยันทุกเดือนจนกว่าจะครบกำหนดคลอด

3.5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย ANOVA โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis Systems (SAS Inst. INC., Cary, N.C., USA) วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน และจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนในแต่กลุ่มการทดลอง โดยเปลี่ยนรูปอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเป็น arcsine ก่อนทำการวิเคราะห์ ความแตกต่างทางสถิติเมื่อค่า P น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

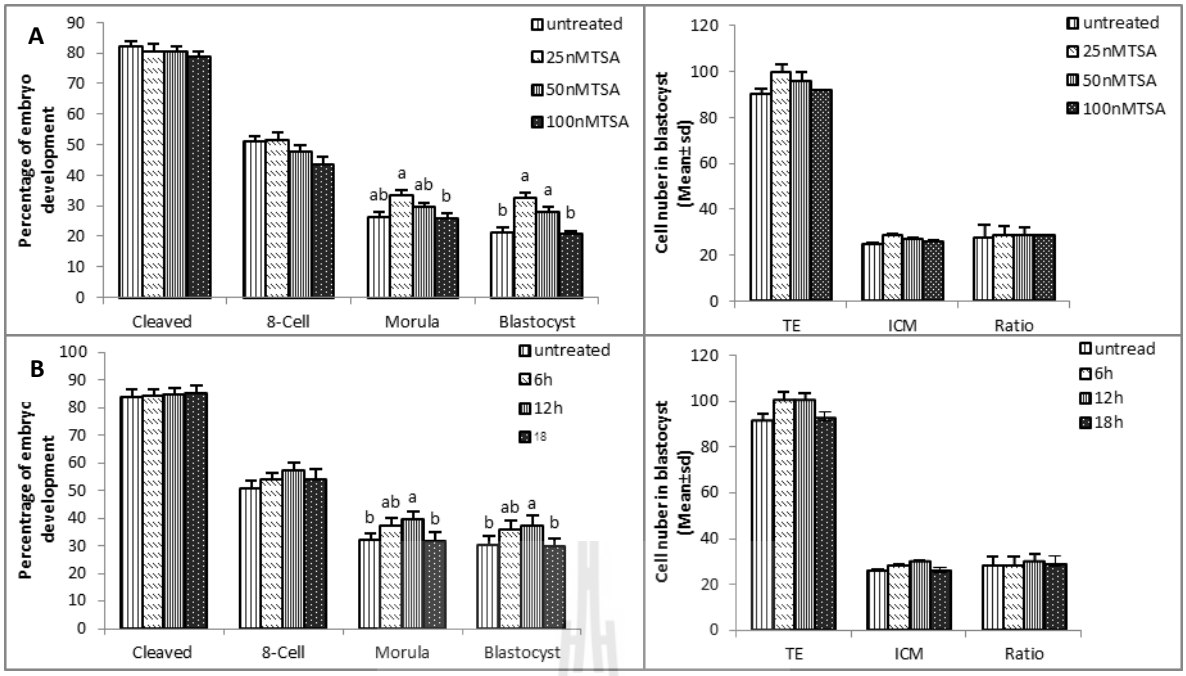
4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลของการทดสอบด้วย TSA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

จากการทดสอบตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วย TSA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส พบว่าแต่ละกลุ่มการทดสอบของ TSA ให้อัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติคือ 78.8-85.1 % แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 100 nM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ มีอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ (57/132, 43.2%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (62/122, 50.8%), 25 nM TSA (63/123, 51.2%) และ 50 nM TSA (60/126, 47.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งของกลุ่ม 25 nM TSA สามารถเพิ่มการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาร์ (41/123, 33.3%) และบลาสโตซีส (40/123, 32.5%) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1A) หลังจากที่ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสแล้ว ได้นำมาทำการนับจำนวนเซลล์ของ ICM และTE ดังแสดงผลในภาพ 4.1A ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า จำนวนเซลล์ของ ICM และ TE แต่ละกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทดสอบ TSA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ดังนั้นจึงได้นำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งทดสอบด้วยความเข้มข้น 25 nM ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงในภาพ 4.1B ผลการทดลองพบว่า อัตราการแบ่งเซลล์และการเจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในกลุ่มที่ทดสอบด้วย 25 nM ด้วยระยะเวลาต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่า ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากทดสอบด้วย TSA ที่ความเข้มข้น 25 nM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (47/126, 37.3%) และ 12 ชั่วโมง (49/124, 39.5%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะมอรูลาร์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (41/129, 31.8%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสของกลุ่ม 6 ชั่วโมง (38/129, 30.2%) และ 12 ชั่วโมง (36/121, 29.8%) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย (ภาพ 4.1B) และผลของการนับเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio พบว่า แต่ละกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 4.1B)

จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้ TSA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง คือ ความเข้มข้นที่ 25 nM ทดสอบเป็นเวลา 6-12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้เป็นอย่างดี

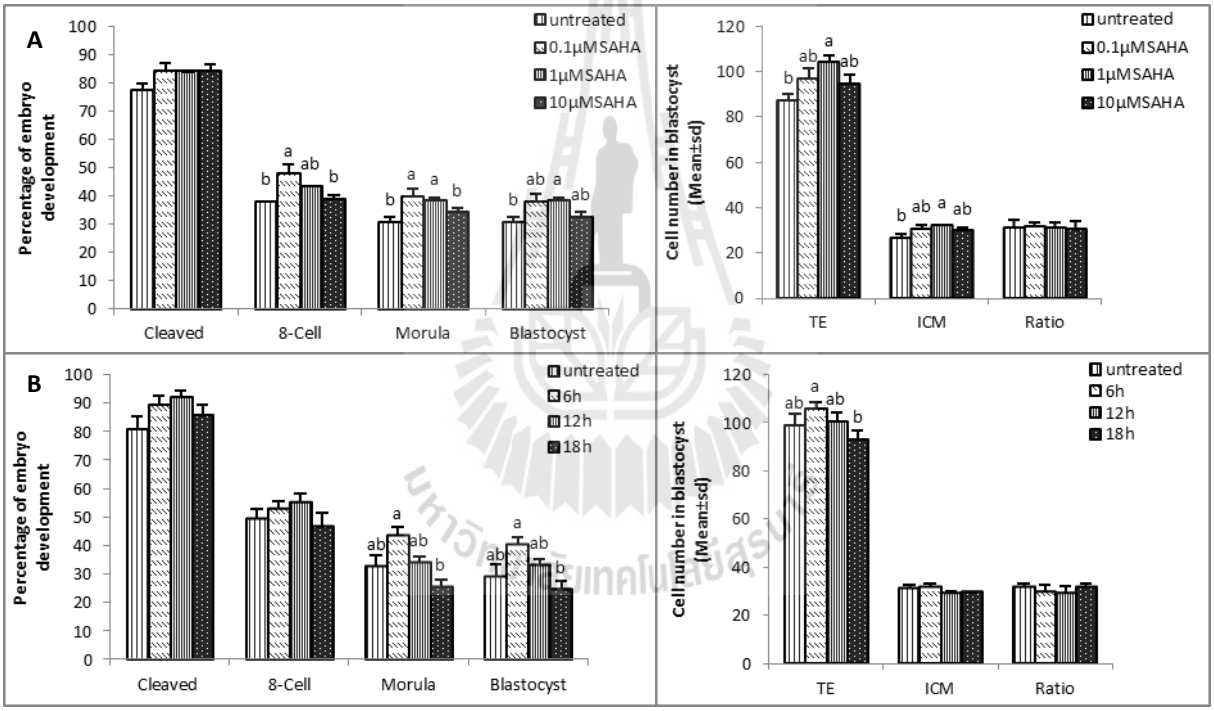


ภาพที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบด้วย TSA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (A) ผลของ TSA ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, (B) ผลของ TSA ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio: ^{a,b} บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ P<0.05

4.1.2 ผลการทดลองที่ 2 ผลของการทดสอบด้วย SAHA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

เพื่อศึกษาผลของการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากถูกทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1,10 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.2A ผลการศึกษาพบว่า แต่ละกลุ่มการทดสอบของ SAHA ให้อัตราการแบ่งตัวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1 μM (57/119, 47.9%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (47/124, 37.9%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 0.1 μM (47/119, 39.5%) และ 1 μM (45/118, 38.1%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาร์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (38/124, 30.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และที่สำคัญอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสของกลุ่มความเข้มข้น 1 μM (45/118, 38.1%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (38/124, 30.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากนั้นเพื่อศึกษาคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ได้มีการนับจำนวนเซลล์ของ ICM และ TE ร่วมถึง TE/ICM ratio ของแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า จำนวนเซลล์ ICM,TE และ TE/ICM ratio ของแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 4.2A)

หลังจากที่ทราบความเข้มข้นของการทดสอบด้วย SAHA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแล้ว เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทดสอบด้วย SAHA ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง จึงทดสอบด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1 μM แล้วบ่มด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.2B พบว่า แต่ละกลุ่มการทดสอบ ให้อัตราการแบ่งตัวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่ากลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 1 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะมอรูลาร์ (54/136, 43.5%) และบลาสโต-ซีส (50/136, 40.3%) สูงกว่ากลุ่มควบคุมและที่สำคัญยังพบว่าจำนวนเซลล์ของ TE ยังมีจำนวนที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพ 4.2B) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ระยะบลาสโตซีสของโคโคลนนิ่งได้ดี

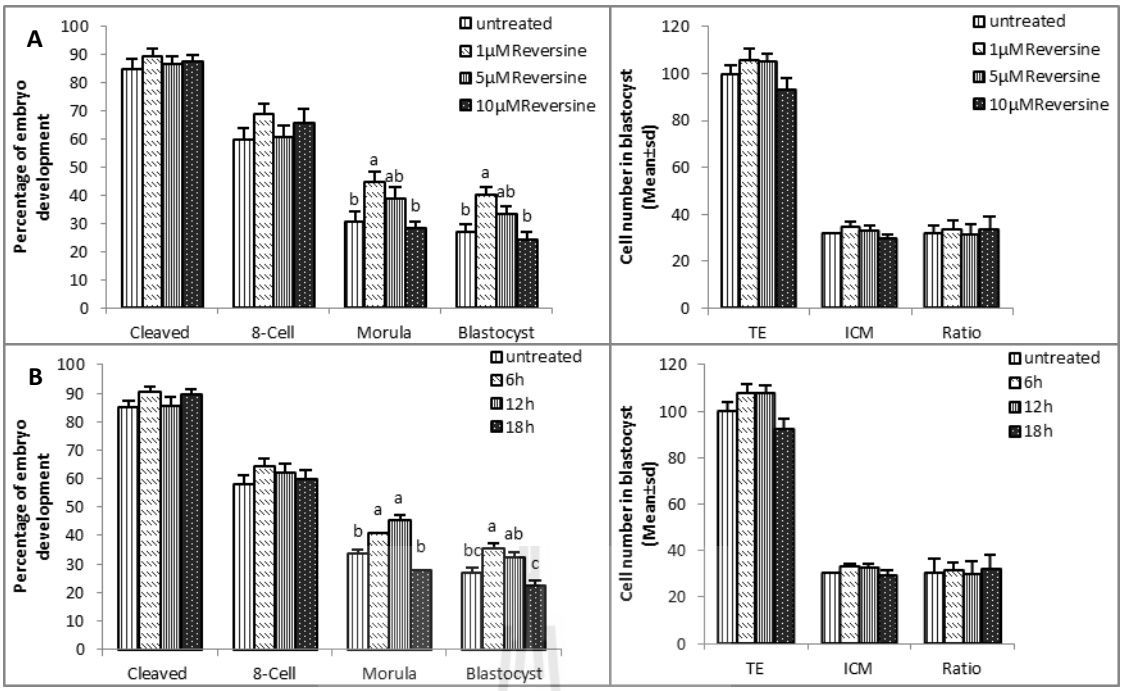


ภาพที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (A) ผลของ SAHA ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, (B) ผลของ SAHA ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, ^{a,b}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.1.3 ผลการทดลองที่ 3 ผลของการทดสอบด้วย Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Reversine โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 1, 5, 10 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ดังแสดงผลในภาพ 4.3A พบว่า แต่ละกลุ่มการทดสอบของ Reversine ให้อัตราการแบ่งตัวและเจริญเข้าสู่ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะพบว่า กลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของ Reversine ที่ความเข้มข้น 1 μM (48/107, 44.9%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะมอรูล่าร์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (33/107, 30.8%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่สำคัญกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 1 μM (43/107, 40.2%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุม (29/107, 27.1%) อย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการศึกษาคุณภาพของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยการนับจำนวนเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio พบว่าจำนวนเซลล์ของ TE, ICM และ TE/ICM ratio ของแต่ละกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

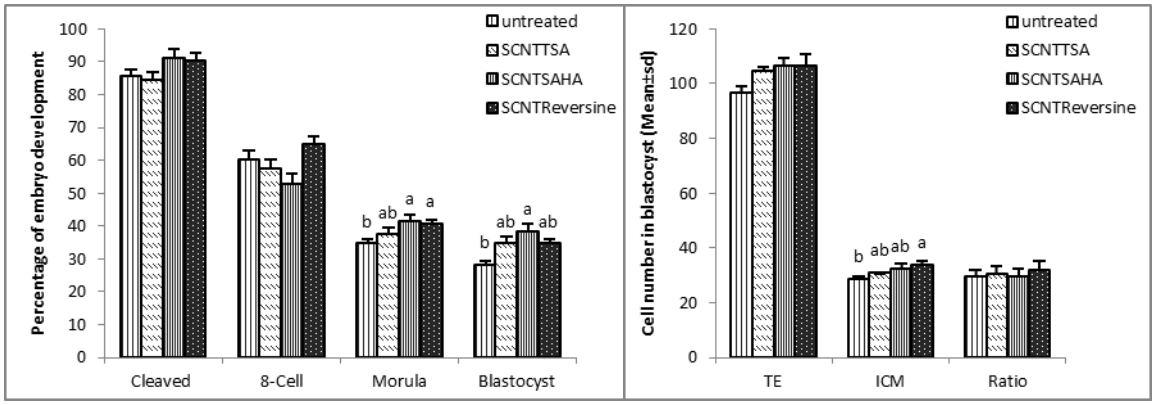
หลังจากที่ทราบความเข้มข้นของการทดสอบด้วย Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแล้ว ดังนั้นเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทดสอบด้วย Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ตัวอ่อนจะถูกทดสอบด้วยความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 1 μM ของ Reversine แล้วบ่มด้วยระยะเวลาที่ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.3B พบว่า แต่ละกลุ่มการทดสอบของ Reversine ให้อัตราการแบ่งตัวและเจริญเข้าสู่ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะพบว่า กลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 1 μM บ่มด้วยระยะเวลา 6 ชั่วโมง (51/124, 41.1%) และ 12 ชั่วโมง (51/126, 45.5%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะมอรูลาร์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (41/122, 30.8%) และ 18 ชั่วโมง (35/125, 28.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ กลุ่มความเข้มข้น 1 μM บ่มด้วยระยะเวลา 6 ชั่วโมง (44/124, 35.5%) สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเข้าสู้ระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุม (33/122, 27.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าจำนวนเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio ของแต่ละกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจำสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้น1 μM ของ Reverrsine บ่มด้วยระยะเวลา 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ดีที่สุด



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบด้วย Reversine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (A) ผลของ Reversine ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, (B) ผลของ Reversine ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, ^{a,b} บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.1.4 ผลการทดลองที่ 4 ผลของการเปรียบเทียบระหว่าง TSA, SAHA และ Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

หลังจากทราบความเข้มข้นความเหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ของสารแต่ละตัวแล้ว ดังนั้นการทดลองนี้ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่าง TSA, SAHA และ Reversine โดยใช้ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองข้างต้นเพื่อศึกษาผลของสาร TSA, SAHA และ Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ดังแสดงผลในภาพ 4.4 ซึ่งพบว่า สารแต่ละตัวให้อัตราการแบ่งตัวและเจริญเข้าสู่ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม พบว่า อัตราการเจริญเข้าสู่ระยะมอรูลาร์ของ Reversine (46/113, 40.7%), TSA (41/110, 37.3%) และ SAHA (51/123, 41.5%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (38/110, 34.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการเจริญเข้าสู่บลาสโตซีสของ Reversine (39/113, 34.5%), TSA (38/110, 37.3%) และ SAHA (47/123, 38.2%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (31/110, 28.2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการใช้ TSA, SAHA และ Reversine สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบด้วย Reversine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, [a,b] บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ P<0.05

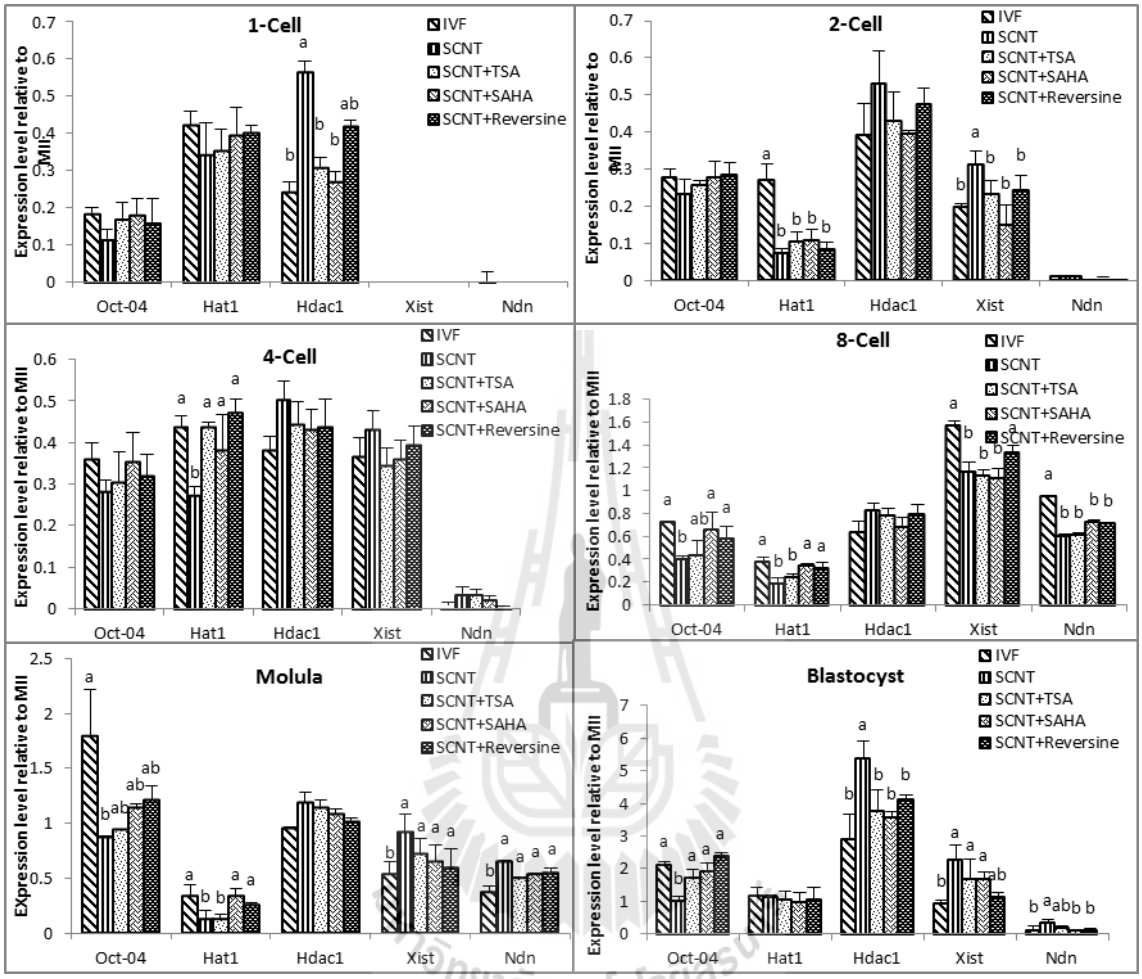
4.1.5 ผลการทดลองที่ 5 ผลของ TSA, SAHA และ Reversine ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ pluripotency, epigenetic และ imprinted

หลังจากนั้นก็ได้ทำการศึกษาผลของ TSA, SAHA และ Reversine ต่อการแสดงออกของยีน *Oct4, Hat1, Hdac1, Xist, Ndn* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ ดังแสดงในภาพ 4.5 ซึ่งพบว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระยะ 1 เซลล์ จนถึง 4 เซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* ในระยะ 8 เซลล์ของกลุ่ม TSA, SAHA, และ Reversine สูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ไม่ได้ถูกทดสอบ (untreated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และแสดงออกของยีน *Oct 4* ใกล้เคียงกับกลุ่ม IVF โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะมอรูลาร์และบลาสโตซีส พบว่าการแสดงออกของยีน *Oct4* ในกลุ่ม TSA, SAHA, และ Reversine สูงกว่ากลุ่ม untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของยีน *Hat1* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine เริ่มแสดงออกจากระยะ 2 เซลล์ตลอดจนถึงระยะมอรูลาร์ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม untreated อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในทางตรงกันข้าม การแสดงออกของยีน *Hdac1* ของกลุ่มตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ในระยะ 1 เซลล์ต่ำกว่ากลุ่มตัวอ่อน IVF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) นอกจากนี้ การแสดงออกของยีน *Hdac1* ในกลุ่มตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ได้แสดงออกปกติซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่ม IVF

การแสดงออกยีน *Xist* และ *Ndn* ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในแต่ละกลุ่มการทดลองจากระยะ 1 เซลล์จนถึงระยะบลาสโตซีส พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองได้มีแสดงออกของยีน *Xist* และ *Ndn* เริ่มที่ระยะ 2 เซลล์จนถึงระยะบลาสโตซีสและที่สำคัญในระยะ 8 เซลล์ของกลุ่มตัวอ่อนที่ถูกทดสอบด้วย Reversine พบว่ามีการแสดงออกของยีน *Xist* และ *Ndn* ใกล้เคียงกับกลุ่ม IVF เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ แต่ในระยะบลาสโตซีสของกลุ่มตัวอ่อนที่ถูกทดสอบด้วย SAHA และ Reversine มีการแสดงออกของยีน *Ndn* ใกล้เคียงกับกลุ่ม

IVF ดังนั้นการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าไม่ว่าจะใช้ SAHA หรือแม้กระทั้ง Reversine ก็สามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง pluripotency, epigenetic และ imprinted ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ใกล้เคียงกับกลุ่ม IVF

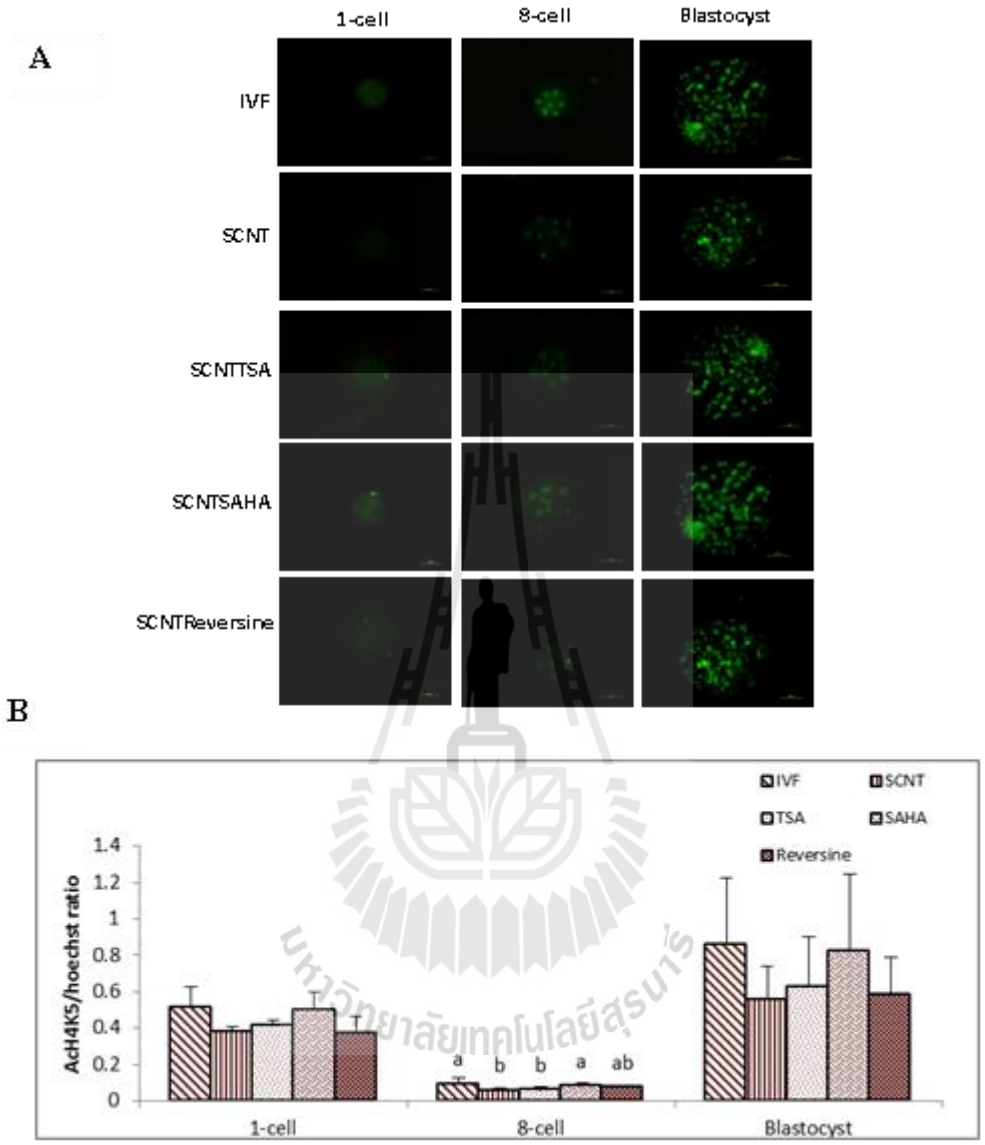


ภาพที่ 4.5 การแสดงออกของยีน *Oct4, Hat1, Hdac1, Xist, Ndn* ในตัวอ่อนระยะต่างๆ, [a,b]บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ P<0.05

4.1.6 ผลการทดลองที่ 6 ผลของ TSA, SAHA และ Reversine ต่อการแสดงออกของระดับของการเติมหมู่อะเซทิลของฮีสโตน (histone acetylation) ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

เพื่อหาระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 ในตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำทดสอบด้วยวิธี immunostaining ดังแสดงผลในภาพ 4.6 ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม TSA, SAHA, และ Reversine ที่ระยะ 1 เซลล์ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ได้แสดงระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่าที่ระยะ 8 เซลล์ของกลุ่ม SAHA และ Reversine แสดงระดับ

ของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การทดสอบตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วย SAHA หรือ Reversine สามารถเพิ่มระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 ได้ดีเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ



ภาพที่ 4.6 การแสดงระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine ที่ระยะ 1 เซลล์, 8 เซลล์ และบลาสโตซีส A) ภาพของการแสดงออกระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 (แสดงสีเขียว) ด้วยวิธี immunostaining ของตัวอ่อน IVF, โคโคลนนิ่ง, โคโคลนนิ่งที่บ่มด้วย 25 nM TSA (SCNTTSA), โคโคลนนิ่งที่บ่มด้วย 1 μM SAHA (SCNTSAHA),และโคโคลนนิ่งที่บ่มด้วย 1 μM Reversine (SCNTReversine) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ B) อัตราของระดับ AcH4K5/Hoechst signal ของตัวอ่อน IVF, SCNT, SCNTTSA, SCNTSAHA, และ SCNTReversine [a,b]บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ P<0.05

4.2 ข้อวิจารณ์

จากการศึกษาผลของ TSA, SAHA, และ Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง การแสดงออกของยีน *Oct4, Hat1, Hdac1, Xist*, *Ndn* และระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนของ H4K5 ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อสรุปว่า การทดสอบด้วย TSA ที่ความเข้มข้น 25 nM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้เป็นอย่างดี ถึงแม้ว่าจำนวนเซลล์ ICM และ TE ของแต่ละความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ก็ชี้ให้เห็นว่า ถ้าใช้ TSA ที่ความเข้มข้นสูงคือ 100 nM เป็นเวลานานเกิน 12 ชั่วโมง ก็จะส่งผลเสียต่อการพัฒนาของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ ดังนั้นเราจึงสรุปว่า ควรใช้ TSA ที่ความเข้มต่ำจึงจะส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Akaki และคณะ (2011) ซึ่งพบว่าการใช้ TSA ที่ความเข้มข้น 5nM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา 20 ชั่วโมงหลังกระตุ้นไข่ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้บางรายงานชี้ให้เห็นว่าถ้าใช้ TSA ที่ความเข้มข้น 50 nM แต่บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลาเพียง 10 ชั่วโมง ก็สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้เช่นกัน (Srirattana และ คณะ, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้ TSA ที่ความเข้มข้น 50 nM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา 14 ชั่วโมง (Sawai และคณะ, 2012) หรือ 20 ชั่วโมง (Lee และคณะ, 2011) ก็สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางตรงข้ามก็มีบางรายงานที่ชี้ให้เห็นว่า การใช้ TSA ที่ความเข้มข้น50 nM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา 13 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ไม่สามารถเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสหรือแม้กระทั้งการฝั่งตัวของตัวอ่อนได้ (Sangalli และคณะ, 2012) ถึงแม้ในปัจจุบันยังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะในการใช้ TSA กับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเพื่อปรับปรุงการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้นั้น แต่ด้วยข้อมูลในปัจจุบันก็สามารถสรุปได้ว่า การใช้ TSA ที่ความเข้มข้นสูงหรือแม้กระทั้งบ่มเป็นเวลานานเกินไป จะทำให้ส่งผลเสียต่อการเจริญของตัวอ่อน ดังจะเห็นได้บางรายงานที่ให้ข้อสรุปว่า การใช้ TSA ที่ความเข้มข้น 500 nM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือ 13 ชั่วโมง ส่งผลต่อการลดอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ (Ding และคณะ, 2008; Iager และคณะ, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Oh และคณะ (2012) พบว่า การใช้ TSA ที่ความเข้มข้น 100 nM บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้การเจริญของตัวอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การใช้ TSA นั้นสามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ แต่จะต้องใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 nM จึงจะส่งผลดีต่อตัวอ่อน

ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า การใช้ SAHA สามารถเพิ่มระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนและปรับปรุงการ reprogramming ในร่างกายไปเป็นเซลล์ตั้งต้นได้ (Huangfu และคณะ, 2008) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า SAHA น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการโคลนนิ่งได้ ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่า การใช้ SAHA ที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา

6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้ SAHA ที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มกับตัวอ่อนหนูโคลนนิ่ง เป็นเวลา 1.6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์และสามารถช่วยให้เพิ่มอัตราการตั้งท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Ono และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า SAHA สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งของโคได้ดี

Chen และคณะ (2004) ได้มีการศึกษาถึงการใช้สารบางตัวทดสอบกับเซลล์ร่างกาย พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นเซลล์ตั้งต้น (progenitor) ได้ จึงตั้งชื่อสารตัวนี้ว่า Reversine ซึ่งก่อนหน้านี้มีบางรายงานว่า Reversine กระตุ้นให้เซลล์ myogenic lineage-committed C2C12 เปลี่ยนไปเป็นเซลล์ progenitor ได้ (Chen และคณะ, 2004) นอกจากนี้ Reversine สามารถกระตุ้นให้เกิดการเติมหมู่อะเซทิลของฮีสโตนโปรตีนได้ โดยการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ MEK signaling (Kim และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า Reversine น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการ reprogramming ของการโคลนนิ่งได้ การศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ Reversine ที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ดี และที่สำคัญหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของวันที่ 7 (จำนวน 2 ใบต่อตัวรับ) ไปยังแม่โคตัวรับทั้งสิ้น 4 ตัว ผลปรากฏว่า สามารถเพิ่มอัตราการตั้งท้องได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (แม่ตัวรับตั้งท้อง 3 ตัว จากทั้งหมด 4 ตัว) และได้ลูกเกิดจำนวน 1 ตัว สุขภาพแข็งแรง (ภาพที่ 4.7) ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ก็สอดคล้องกับ Miyoshi และคณะ (2010) ที่พบว่า การใช้ Reversine สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนของหมูจิ๋ว (miniature pig) โคลนนิ่งได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถช่วยให้ได้ลูกโคลนนิ่งที่ปกติอีกด้วย

การศึกษาในครั้งนี้มีการศึกษาแสดงออกของยีน *Oct*4, *Hdac1*, *Hat1*, *Xist*, *Ndn* จากตัวอ่อนระยะต่างๆของโคโคลนนิ่ง กล่าวคือ การแสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนนั้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงการพัฒนาการของตัวอ่อน เพราะว่ามีบางรายงานการแสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ำกว่ากลุ่มของตัวอ่อน IVF นั้นสอดคล้องกับการเจริญผิดปกติของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วย (Boiani และคณะ, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีหลายรายงานชี้ให้เห็นว่า ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งมีการแสดงออกของยีน *Oct4* และ *Nanong* ผิดปกติเมื่อเทียบกับตัวอ่อน IVF (Aston และคณะ, 2010; Bayhan และคณะ, 2007;Oh และคณะ, 2012) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่า การทดสอบด้วย TSA, SAHA, และ Reversine กับตัวอ่อนโคโคลนนิ่งนั้นสามารถปรับปรุงการแสดงออกของยีน *Oct4* ได้อย่างปกติในระยะ 8 เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซีสเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้ TSA ในตัวอ่อนหนูโคลนนิ่ง พบว่า TSA สามารถช่วยปรับปรุงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง Pluripotency ได้ดี (Wang และคณะ, 2007) แม้กระทั้งในตัวอ่อนหมูโคลนนิ่งก็สามารถช่วยปรับปรุงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง Pluripotency และ imprinted ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ (Cervera และคณะ, 2009) นอกจากนี้ก็มีรายงานว่า การใช้ TSA กับตัวอ่อนหมูโคลนนิ่งก็ช่วยการแสดงออกของยีน *Oct4* ในระยะมอรูลาร์ได้ (Ji และคณะ, 2013)

ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า การใช้ Reversine กับตัวอ่อน miniature pig โคลนนิ่งสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ *Oct3/4* จากตัวอ่อนระยะแรกและสูงสุดในระยะมอรูลาร์จนถึงบลาสโตซีส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* ในกลุ่มตัวอ่อนที่ถูกทดสอบด้วย Reversine มีการแสดงออกที่ปกติใกล้เคียงกับตัวอ่อน IVF (Miyoshi และคณะ, 2010)

กระบวนเปลี่ยนแปลงของโครมาตินมีความสำคัญมากในตัวอ่อนโคลนนิ่ง เนื่องช่วยให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า reprograming เพราะทำให้เซลล์กลับมาอยู่ในสถานะที่ยังไม่มีหน้าที่เฉพาะหรือเป็นเซลล์ตั้งต้นอีกครั้ง ซึ่งหนึ่งในกระบวนการที่ทำให้เกิดการคลายตัวของโครมาตินคือ การเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการดังกล่าวจะถูกควบคุมโดยการแสดงออกของยีน *Hat1* เพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน histone acetyltransferase 1 ใช้สำหรับการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีนนั้น ส่งผลให้ โครมาตินก็เกิดการคล้ายตัวเพื่อรอกระบวน transcription ต่อไป ในทางตรงกันข้าม หมู่อะเซทิลจะถูกดึงออกจากโปรตีนฮีสโตนด้วยเอ็นไซม์ Histone deacetylase 1 ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *Hdac1* (McGraw และคณะ, 2003) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ยีน *Hat1* มีการแสดงออกต่ำกว่าปกติในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ 8 เซลล์จนถึงบลาสโตซีสเมื่อเทียบกับตัวอ่อน IVF ซึ่งในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของยีน *Hdac1* ก็แสดงออกสูงกว่าปกติเมื่อเทียบกับตัวอ่อน IVF (Lee และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2011; Oh และคณะ, 2012) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ถึงความผิดปกติในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่า การใช้ SAHA และ Reversine สามารถช่วยปรับปรุงยีน *Hat1* และ *Hdac1* ให้มีการแสดงออกที่ปกติในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ระยะ 2 เซลล์จนถึงมอรูลาร์ได้ การทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับ Lee และคณะ (2011) ซึ่งรายงานว่า การปรับปรุงกระบวนการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินด้วยสาร epigenetic modifier ทำให้ยีน *Hdac1* มีการแสดงออกที่ลดลงใกล้เคียงกับตัวอ่อน IVF อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าสารดังกล่าวก็ไม่ได้ส่งผลในการช่วยปรับปรุงการแสดงออกของยีน *Hat1* ให้ปกติได้ในตัวอ่อนโคลนนิ่ง การศึกษาของครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ SAHA หรือ Reversine นั้นก็สามารถปรับปรุงการแสดงออกของยีน *Hat1* และ *Hdac1* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ปกติเมื่อเทียบกับตัวอ่อนปกติและสอดคล้องกับการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่ง ถึงแม้กลไกการทำงานของสารดังกล่าวจะแตกต่างกันก็ตาม

ที่สำคัญการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ imprinted ของตัวอ่อนโคลนนิ่งผิดปกตินั้น เป็นตัวบ่งชี้ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ด้วย ดังจะเห็นได้จากรายงานของ Inoue และคณะ (2010) พบว่า การ knock down ของยีน *Xist* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหรือแม้กระทั้งในหนูนั้นสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่งได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับรายงานของ Matoba และคณะ (2011) ซึ่งชี้ว่าหลังจาก Knock down ของยีน *Xist* ในตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งทำให้เพิ่มอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่งและเพิ่มอัตราการเกิด ดังนั้นการแสดงออกของยีน *Xist* ที่เพิ่มขึ้นในตัวอ่อนโคลนนิ่งน่าจะช่วยในการพัฒนาการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งได้ ตลอดจนการศึกษาของ Wee และคณะ (2006) ได้แสดงให้เห็นว่า ยีน *Ndn* และ *Xist* ในตัวอ่อนโคลนนิ่งการแสดงออกผิดปกติเมื่อเทียบกับตัวอ่อน IVF การศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการทดสอบการแสดงออกของยีน *Xist* และ *Ndn* ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจาก

ใช้ TSA, SAHA, และ Reversine ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *Xist* และ *Ndn* ซึ่งพบว่า TSA ไม่ได้มีส่วนในการปรับปรุงการแสดงออกของยีน *Xist* และ *Ndn* แต่หลังจากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งถูกทดสอบ SAHA และ Reversine นั้นพบว่าการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้มีความปกติซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอ่อน IVF

เพื่อให้สอดคล้องกับผลของการแสดงออกของยีนที่กล่าวข้างต้นซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีน ในการศึกษานี้ได้มีการศึกษาระดับการเติมหมู่อะเซทิลของโปรตีนฮีสโตน H4K5 ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง เนื่องจากก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ระดับของการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคลนนิ่งมีระดับต่ำที่ระยะ 8 เซลล์ (Wee และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังรายงานว่า TSA ไม่ได้ช่วยการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในครั้งว่า TSA ไม่สามารถปรับปรุงการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานว่า TSA ช่วยปรับปรุงการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (Iager และคณะ, 2008) หรือแม้แต่รายงานของ Lee และคณะ (2011) ก็แสดงให้เห็นว่า TSA ช่วยการการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคลนนิ่งในช่วง 30 นาทีแรกของการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ SAHA และ Reversine มีส่วนช่วยในการปรับปรุงการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคลนนิ่งในตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ได้ จึงให้ข้อสรุปว่า SAHA และ Reversine สามารถปรับปรุงการการเติมหมู่อะเซทิลของ H4K5 ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง

ภาพที่ 4.7 แสดงลูกโคโคลนนิ่งอายุ 9 เดือนหลังคลอดที่เกิดจากการใช้ Reversine ที่ความเข้มข้น 1 µM บ่มกับตัวอ่อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า สามารถใช้ TSA, SAHA และ Reversine เพื่อเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ แต่จะให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นทั้งทางด้านการแสดงออกของยีนและกระบวนการ reprogramming นั้นจะต้องเลือกที่จะใช้ SAHA หรือ Reversine เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถปรับปรุงได้ทั้งทางด้านการเติมหมู่อะเซทิลและการแสดงออกของยีน ตลอดจนการพัฒนาของตัวอ่อนก็เป็นไปด้วยดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ Reversine นั้นมีการเพิ่มอัตราการตั้งท้องตลอดจนกระทั้งคลอดได้เปอร์เซ็นต์ที่สูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาองค์ความรู้ในด้านการพัฒนาประสิทธิภาพการโคลนนิ่งได้เป็นอย่างดีและเป็นรายงานแรกที่มีการเปรียบเทียบการใช้สาร TSA, SAHA และ Reversine ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้สารเคมีที่เกี่ยวของการกระบวนการ reprogramming ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารกลุ่มที่ยับยั้งการเติมหมู่อะเซทิลหรือแม้กระทั้งสารที่ทำหน้าที่ dedifferentiation เช่น Reversine ก็มีส่วนช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการโคลนนิ่งได้เช่นกัน

5.2.2 สำหรับการทดลองในอนาคต ก่อนทำการทดลองใช้สารกับตัวอ่อนโคลนนิ่งแต่ละครั้งนั้นจำเป็นอย่างยิ่งในการทดสอบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม

5.2.3 ควรมีการศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งจากการใช้ TSA และ SAHA เพื่อทำการเปรียบเทียบ

บรรณานุกรม

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

Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S., Takahashi S. (2011). Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 57:120–126.

Aston, K.I., Li, G.P., Hicks, B.A., Sessions, B.R., Davis, A.P., Rickords, L.F., Stevens, J.R., and White, K.L. (2010). Abnormal levels of transcript abundance of developmentally important genes in various stages of preimplantation bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 12:23-32.

Beyhan, Z., Forsberg, E.J., Eilertsen, K.J., Kent-First, M., and First, N.L.(2007). Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Mol. Reprod. Dev.* 74:18–27.

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overström, E.W. and Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17:456-461.

Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H.R., and McLaughlin, K.J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16:1209–1219.

Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J.P. and Viegas-Péquignot, E. (2001). Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11:1542–1546.

Bureau, W.S., Bordignon, V., Léveillée, C., Smith, L.C. and King, W.A. (2003). Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells. *Cloning Stem Cells*. 5:123–132.

Cervera, R.P., Martı´-Gutie´rrez, N., Escorihuela, E., Moreno, R., and Stojkovic, M. (2009). Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology* . 72:1097–1110.

Chen, S., Zhang, Q., Wu, X., Schultz, P.G. and Ding, S. (2004). Dedifferentiation of lineage- committed cells by a small molecule. *J. Am. Chem. Soc.* 126:410–411

Chen, S., Zhang, Q., Wu, X., Schultz, P.G. and Ding, S. (2004). Dedifferentiation of lineage- committed cells by a small molecule. J. *Am. Chem. Soc.* 126:410–411.

Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. and Renard, J.P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20:366-369.

Costa-Borges, N., Santaló, J. and Ibáñez E. (2010). Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the in vitro development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram.* 12:437-446.

Daniels, R., Hall, V.J., French, A.J., Korfiatis, N.A. and Trounson, A. O. (2001). Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol. Reprod. Dev.* 60:281-288.

Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., Wang, Y., Guo, Z. and Zhang Y. (2008). Increased pre-implnttiondevelopment of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*. 70:622-630.

Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X. and Tian, X.C. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69:896-901.

Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. and Lazzari, G. (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature.* 424:635.

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.

Hayes, E., Galea, S., Verkuylen, A., Pera, M., Morrison, J., Lacham-Kaplan, O. and Trounson, A. (2001). Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. *Physiol. Genomics* 5:193-204.

Huangfu, D., Maehr. R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26:795–797.

Hoshikawa, Y., Kwon, H.J. and Yoshida, M. (1994). Trichostatin A induces morphological changes and gesolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp. Cell. Res.* 214:189-197.

Iager, A.E., Ragina, N.P., Ross, P.J., Beyhan, Z., Cunniff, K., Rodriguez, R.M. and Cibelli, J.B. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells*. 10:371-379.

Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., Sawai, K., Otte, A.P., Tian, X.C., Yang, X., Ishino, F., Abe, K., and Ogura, A. (2010). Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science.* 330:496–499.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. (1990). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science***.** 282:2095-2098.

Kim, M. K., Jang, G., Oh, H.J, Yuda, F., Kim, H.J, Hwang, W.S., Hossein, M.S., Kim, J.J., Shin, N.S., Kang, S.K. and Lee, B.C. (2007). Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells, 9*:130–137.

Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein, M. S., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G. and Hwang, W. S. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 436:641.

Lee, M.J., Kim, S.W., Lee, H.G., Im, G.S., Yang, B.C., Kim, N.H. and Kim, D.H. (2011). Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.*57:34–42.

Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128:707–719.

Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., Xue, Q., Bolund, L., Yang, H., Maddox-Hyttel, P. and Vajta, G. (2008). High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*. 70:800-808.

Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X., Wisely, S.M., Zhou, Q., Renard, J.P., Leno, G.H. and Engelhardt, J.F. (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.* 293:439-448.

Lu, F., Shi, D., Wei, J., Yang, S. and Wei, Y. (2005). Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology*. 64:1309-1319.

Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N.V., Wakayama, S., Bui, H.T. and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:183-189.

Marks, P.A., Richon, V.M. and Breslow, R. (2001). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr. Opin. Oncol.* 3:477-83.

Marks, P.A. and Dokmanovic, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 14:1497– 1511.

Mastromonaco, G.F. and King, W.A. (2007). Cloning in companion animal, non- domestic and endangered species: can the technology become a practical reality? *Reprod. Fertil. Dev.* 19:748-761.

Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., Ishino, F., and Ogura, A. (2011).RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *PNAS.* 108**:** 20621–20626.

McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L. and Sirard, M.A. (2003). Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 68:383--389.

Miyoshi, K., Mori H., Mizobe, Y., Himaki, T., Yoshida, M. and Sato, M. (2010). Beneficial effects of reversine on in *vitro* development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryo. *J. Reprod. Dev.* 56:291-296.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., Parnpai, R. and Hochi, S. (2007). Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology***.** 67:893-900.

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.

Oh, H.J., Lee, T.H., Lee, J.H., and Lee, B.C. (2012). Trichostatin a improves preimplantation development of bovine cloned embryos and alters expression of epigenetic and pluripotency genes in cloned blastocysts. *J. Vet. Med. Sci.*74(11):1409-15.

Ono, T., Li, C., Mizutani, E., Terashita, Y., Yamagata, K. and Wakayama, T. (2010). Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biol. Reprod.* DOI:10.1095/biolreprod.110.085282

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.

Rybouchkin, A., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74:1083-1089.

Sangalli, J.R., De Bem, T.H., Perecin, F., Chiaratti, M.R., Oliveira, L.D., de Araújo, R.R., Valim Pimentel, J.R., Smith, L.C., and Meirelles, F.V. (2012). Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell. Reprogram.* 14**,:**235–247.

Sawai, K., Fujii, T., Hirayama, H., Hashizume, T., and Minamihashi, A. (2012). Epigenetic status and full-term development of bovine cloned embryos treated with trichostatin A. *J. Reprod. Dev.* 58**:**302–309.

Shi, L.H., Ai, J.S., Ouyang, Y.C., Huang, J.C., Lei, Z.L., Wang, Q., Yin, S., Han, Z.M., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. (2008). Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J. Anim. Sci.* 86:1106-1113.

Shi, L.H., Miao, Y.L., Ouyang, Y.C., Huang, J.C., Lei, Z.L., Yang, J.W., Han, Z.M., Song, X.F., Sun, Q. Y. and Chen, D.Y. (2008). Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. *Dev. Dyn.* 237: 640-648.

Shi, W., Zakhartchenko, V. and Wolf, E. (2003). Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation.* 71:91-113.

Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415:859.

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

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.

Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science.* 272:408-411.

Vaissiere, T., Sawan, C. and Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res*. 659:40–48.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R. and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 394:369-374.

Wang, F., Kou, Z., Zhang, Y. and Gao, S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 77:1007–1016.

Wang, Y.S., Xiong, X.R., An, Z.X., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S., and Zhang, Y. (2011).Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2/-deoxycytidine andtrichostatin A. *Theriogenology*. 75:819–825.

Wee, G., Koo, B.D., Song, B.S., Kim, J.S., Kang, M.J., Moon, S.J., Kang, Y.K., Lee, K.K. and Han, Y.M. (2006). Inheritable Histone H4 Acetylation of Somatic Chromatins in Cloned Embryos.*J Biol Chem*. 281:6048–6057.

Wani, N.A., Wernery, U., Hassan, F.A., Wernery, R. and Skidmore, J.A. (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 82:373-379.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385:810-813.

Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P.A., Dinnyes, A., King, T.J., Paterson, L. A., Wells, D.N. and Young, L. E. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 419:583-586.

Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N. and Pate, B. J. (2003). A mule cloned from fetal cell by nuclear transfer. *Science.* 301:1063.

Wu, J., Wang, S.H., Potter, D., Liu, J.C., Smith, L.T., Wu, Y.Z., Huang, T.H. and Plass, C. (2007). Diverse histone modifications on histone 3 lysine 9 and their relation to DNA methylation in specifying gene silencing. *BMC. Genomics*. 8:131.

Zhang, Y., Li, J., Villemoes, K., Pedersen, A.M., Purup, S. and Vajta, G. (2007). An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*. 9:357-363.

Zimmermann, U. and Vienken, J. (1982). Electric field-induced cell to-cell fusion. *J. Membr. Biol.* 67:165–182.

ภาคผนวก ก

ส่วนหนึ่งของการทดลอง ได้นำไปเสนอผลงานระดับนานาชาติดังนี้

Poster presentation

Yoisungnern, T., Srirattana, K., Punyawai, K., Aree-uea,A., phongnimit, T., kim J.H. and parnpai, R. 2011. The effects of reversine treatment on developmental potential of bovine cloned embryos. *Proceeding of the 8th Annual conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society*, 25-30 October 2011, Guiin City, Guangxi, China.

Yoisungnern, T., Srirattana, K., Punyawai, K., Putkhao, K., Aree-uea,A., kim J.H. and parnpai, R. 2012. Effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) treatment on the development of cloned bovine embryos. *Proceeding of* the 105th Meeting of the Society for Reproduction and Development, 5-8 September, 2012, University of Tsukuba, Japan

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. 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 3000

โทร. 081-4706393

4. ประวัติการศึกษา

4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council

สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

5. ประวัติการทำงาน:

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

- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

6.4 Embryonic stem cells

6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัย

7.1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.** 2009. 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.*** DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01636.x

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.

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.

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.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Lorthongpanich, C., Heraud, P. and **Parnpai.** R. 2009. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. ***J. Mol. Struct.*** 933:104-111.

Suteevun-Phermthai, T., Curchoe, C.L., Evans, A.C., Boland, E., Rizos, D., Fair, T., Duffy, P., Sung, L.Y., Du, F., Chaubal, S., Xu, J., Wechayant, T., Yang, X., Lonergan, P., **Parnpai, R.**, and Tian, X. 2009. Allelic switching of the imprinted *IGF2R* gene in cloned bovine fetuses and calves. ***Anim. Reprod. Science.*** 116:19-27.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Development of single blastomere derived mouse embryos, outgrowths and embryonic stem cells. ***Reproduction*** 135:805-813.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres ***Cloning Stem Cells***. 10:503-512.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A.W.S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development of interspecies cloned monkey embryo reconstructed with bovine enucleated oocyte. ***J. Reprod. Dev.*** 54:306-313.

Parnpai, R. 2007. Production of cloned embryos in buffalo. ***Ital. J. Anim. Sci.*** 6. Suppl. 2: 102-106.

Chan, A.W.S., Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitche, K. and **Parnpai, R.** 2007. Competence of early embryonic blastomeres for establishment of embryonic stem cell line. ***Ferti. Steril.*** 88:S396-S396.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., **Parnpai, R.** and Hochi, S. 2007. Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. ***Theriogenology.*** 67:893-900.

Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2006. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***Theriogenology.*** 65:1704-1715.

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.

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

7.2 นำเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Takeda, K., Nagai T. and **Parnpai, R.** 2009. Somatic cell nuclear transfer in swamp buffalo. *Proceeding of Buffalo Propagation Conference, 17 December, 2009, Tainan, Taiwan, RPC.*

Srirattana, K., Takeda, K., Matsukawa, K., Tasai, M., Akagi, S., Nirasawa, K., Nagai, T., Y., Kanai, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2009. Quantitative analysis of mitochondrial DNA in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) interspecies cloned embryos. *Proceeding of the 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society conference, 16-20 November, 2009, Siem Reap City, Cambodia.* P.57.

Parnpai, R. 2009. Progress of inter-species somatic cell nuclear transfer in bovidae and felidae family. Proceeding The 7th Asian Symposium on Animal Biotechnology. Chungbuk National University, Korea, 19 June, 2009.

Suksawaeng, S. Danna, Y. and **Parnpai, R.** 2009. Heart chicken may able to maintain and induce mice embryonic stem cells to form hepatic plate-like structure. Proceeding of the 4th World Congress on Regenerative Medicine, 12-14 March 2009, Bangkok, Thailand. p.174.

Srirattana K., Laowtammathron C., Devahudi R., Imsoonthornruksa S., Sangmalee A., Tunwattana W., Lorthongpanich C., Sripunya N., Keawmungkun K., Phewsoi W., Ketudat-Cairns M., and **Parnpai R.** 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of inter-species cloned gaur (*Bos gaurus*) embryos. Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 126.

Liang Y. Y., Ye D. N., Laowtammathron C., Phermthai T., and **Parnpai R.** 2009. *In vitro* production of swamp buffalo embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments. Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 230.

Imsoonthornruksa, S**.,** Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression profile of Oct4 in pre-implantation embryo of cloned endangered felid species. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 89.

Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Effect of activation treatments on development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 137.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Niches, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2007. Embryonic stem cell establishment from mouse single blastomere. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 112.

Parnpai, R. 2007. The progress of interspecies SCNT: Bovidae and felidae cases. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 46.

Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Birth of cloned goat : a preliminary study for conservation of endangered mountain goat. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 80.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Telomerase activity of in inter-species somatic cell nuclear transfer gaur embryos. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 130.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 141.

Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S**.,** Sripunya, N., Laowtammathron, C., Kumpong, O., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression and distribution of Oct-4 in interspecies-cloned long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos. Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 149.

Parnpai, R., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Muenthaisong, S., and Ketudat Cairns, M. 2006. Recent status of somatic cell nuclear transfer for conservation of endangered species. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 44-47.

Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Development of interspecies cloned long tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos after reconstructed with bovine enucleated oocytes and culturing in different condition. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 125-126.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Tangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos taurus*) embryos. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 134-135.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Tanwatana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Differentiation of marbled cat (*Pardofelis marmorata*) nuclei after reconstructed with enucleated domestic cat and bovine oocytes. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 140.

Parnpai, R., Muenthaisong, S., Suteevun, T., Na-Chiangmai, A., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Sanghuayphrai, N. and Ketudat Cairns, M. 2006. Production of swamp buffalo emryos: Comparison of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer techniques. *Proceeding of the 5th Asian Buffalo* Congress, Naning, China, 18-22 April, 2006, p. 616-620.

Curchoe, C., Suteevun, T., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Analysis of the expression pattern of the imprinted *IGF2R* gene in cloned cattle. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p* 159.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron C., Monson R.L., M. Wiltbank., Sangsitavong S., **Rarnpai R.** and Rutledge, J.J. 2005. Kinetic changes of *in vitro* produced bovine sexed pre-implantation embryos. 2005. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology*, Bangkok, Thailand, 3-4 November, 2005, p.157.

Sang-ngam, C., Imsoonthornruksa S., Tangthai C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathron C., Lorthongpanich, C., Ketudart-cairn, M. and **Parnpai, R.** 2005. Interspecies nuclear transfer using female and male gaur *(Bos gaurus)* skin fibroblasts reconstructed with enucleated bovine oocytes. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p 170.*

Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Expression of chromatin remodeling genes in cloned and IVF swamp buffalo embryos. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p* 97-99.

Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai. R.** 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, Imsoonthornsuksa, S., Tangthai, C., Sang-ngam, C., Hochi, S., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2005. Developmental potential of parthenogenetic activation of swamp buffalo embryos between fresh and vitrified oocytes. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 93-97.

Parnpai, R. 2005. Somatic cell nuclear transfer of cattle and buffalo in Thailand. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 4-16.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 174.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai. R.** 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned

bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference.* Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T.,Wongviriya, W, Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. Cloning of leopard cat embryos using enucleated domestic cat oocytes as recipient cytoplast. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference.* Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April 2004. p. 61.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod .Fert. Dev.* 16: 149.

Parnpai, R., Laowtammathron, C., Terao,T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., and Hochi, S. 2004. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Portland, USA, 10-14 January, 2004, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 180-181.

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Somwan, S., Muankatoke, P., Patitung, S. and **Parnpai, R.** 2003. Production of dairy and beef cattle by cloning technology. *Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar and Symposium.* Mie University, Mie, Japan, 21 October 2003. p. 389-393.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi S. and **Parnpai. R.** 2003. Effect of Ficoll in vitrification solution on the post-warmed development of vitrified cloned bovine hatching blastocysts. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends.* Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 48-51.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Terao, T. Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2003. Developmental potential of cloned swamp buffalo embryo reconstructed with vitrified matured oocytes. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present*

status and future trends. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 43-47.

Parnpai, R. 2003. Mammalian somatic cell cloning status in Thailand. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present Status and Future Trends.* Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003, p. 18-26.

Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Auckland, New Zealand, 11-15 January, 2003, Published in *Theriogenology* 59: 279.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Foz Do Iguassu, Brazil, 12-15 January, 2002,, Published in *Theriogenology* 57: 443.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Omaha, USA, 13-16 January, 2001, Published in *Theriogenology* 55: 284.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle epithelial cells. *Buffalo J.* 15 (3): 371-384.

7.3 ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2546. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *Lab.Today.* 2: 33-37.

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. อดีต ปัจจุบัน และ อนาคตของการย้ายฝากตัวอ่อน. *เวชสารสัตวแพทย์* 16: 258-269.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. การย้ายฝากตัวอ่อน (E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์. 2545. แนวทางการโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย*. 10: 82-85.

7.4 นำเสนอในการประชุมระดับชาติ

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กาญจนา ปัญญาไว ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2553. ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กภายนอกร่างกายในกระบือปลัก: การศึกษาเบื้องต้น. *การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 ประจำปี 2553 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. หน้า 309-313.

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กาญจนา ปัญญาไว วันวิสาข์ ผิวสร้อย กนกวรรณ ศรีรัตนา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2553. อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้วของไข่อ่อนโค หลังจากแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Solid Surface Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 103-108.

วันวิสาข์ ผิวสร้อย กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กาญจนา ปัญญาไว และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2553. อัตราการเจริญของตัวอ่อนช้างที่ได้จากการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 238-245.

หยวนหยวน เหลียง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2553. อัตราการอยู่รอดของไข่สุกกระบือปลักที่ผ่านการ vitrification ด้วยวิธี Microdrop และ Cryotop และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าในไซโต พลาสซึม. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 95-102.

กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี วันชัย ตันวัฒนะ วชิรวิทย์ สมสา มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2552. ผลของ Trichostatin A ต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 2 สาขาสัตว์*. กรุงเทพฯ, หน้า 10-16.

ชุติ เหล่าธรรมธร กนกวรรณ ศรีรัตนา อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2552. ลูกโคโคลนนิ่งเกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification แบบหยด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 2 สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 99-105.

หยวนหยวน เหลียง อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ดานา เย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2552. ผลของการใช้สารเคมีกระตุ้นการแบ่งตัวต่อการพัฒนาของตัวอ่อนกระบือภายหลังการ ICSI. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์.* กรุงเทพฯ, หน้า 78-86.

อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2552. ผลของเซลล์ต้นแบบ ต่อประสิทธิภาพ และคุณภาพของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 87-94.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา ชุติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ nuclear reprogramming ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์โคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย*. มหาสารคาม, หน้า 292-297.

กาญจนา ธรรมนู วราภรณ์ ตัณฑนุช จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การศึกษาตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของหนูเม้าส์ด้วยวิธี synchrotron infrared microspectroscopic mappings และ focal plane array imaging. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.* มหาสารคาม, หน้า 131.

สุรชัย รัตนสุข **รังสรรค์ พาลพ่าย** และ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์. 2551. การเปรียบเทียบไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของโค. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.* มหาสารคาม, หน้า 184.

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย อนวัช แสงมาลี ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี รุ่ง

จันตาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 25-30.

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา ชุติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ วันชัย ตันวัฒนะ ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การผลิตกระทิงโคลนนิ่งโดยเทคนิคการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 78-84.

วันวิสาข์ ผิวสร้อย นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 19-24.

อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 85-90.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย ชุติ เหล่าธรรมธร วันชัย ตันวัฒนะ วชิรวิทย์ สมสาวิชิต กองคำ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551 การแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอ่อนโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 344-348.

ชุติ เหล่าธรรมธร กนกวรรณ ศรีรัตนา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีอิ๊กซี่. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 349-352.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ แชงชัว หยาง คาโรลิน่า เพียโทรสกา-นิชชี่ แอนโทนี่ ชาง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2551. การทดสอบสารเคมีที่มีผลต่ออัตราความสำเร็จของการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ตัวอ่อนก่อนระยะฝังตัว. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 340-343.

อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งแพะและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์เลียงผา. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 332-335.

กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา วันชัย ตันวัฒนะ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์เทโลเมอเรสในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 336-339.

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2550. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและอัตราการพัฒนาในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนมโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 245-250**.**

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา อนวัช แสงมาลี รุ่ง จันตาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2550. อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มันแช่แข็งแบบย้ายฝากโดยตรง หรือการล้างตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอนก่อนนำไปย้ายฝาก. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ , หน้า 260-265

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา กนกวรรณ ศรีรัตนา ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2549. การผลิตตัวอ่อนแยกเพศโคที่ปฏิสนธิในหลอดแก้ว. *การประชุมสัมมนาปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47.* น่าน, หน้า 7.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ชุติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2549. อิทธิพลของขนาดการฟักออกจาก

เปลือก ต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากแช่แข็งแบบ vitrification ของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง. *การประชุมสัมมนาปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47.* น่าน, หน้า 59.

กนกวรรณ ศรีรัตนา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ชมพูนุท แตงไทย ชุติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2549. ผลของเซลล์ต้นแบบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่ง. *การประชุมสัมมนาปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47.* น่าน, หน้า 47-48.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพาณิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ธวัชชัย เวชยันต์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2548. การเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือปลัก Parthenogenetic activation จากโอโอไซท์สดและโอโอไซท์แช่แข็งโดยวิธี Vitrification. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านการพัฒนากลุ่มงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา, ประจำปี 2548.* หน้า 37-39.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2548. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 59-66.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม วันชัย ตันวัฒนะ สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2548. การเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งโดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 73-77.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2547. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนควายโคลนนิ่ง

หลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 83-87.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ วัชระ วงศ์วิริยะ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตวแพทย์.* กรุงเทพฯ, หน้า 351-355.

ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

รังสรรค์ พาลพ่าย ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *บทคัดย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่อง กลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547.* หน้า 29.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2547. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *บทคัดย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่องกลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547.* หน้า 26.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง วัชระ วงษ์วิริยะ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2546. การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว (*Felis bengalensis*) ข้ามชนิดโดยใช้ไข่แมวบ้าน (*Felis*

catus) เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน*. พิษณุโลก, หน้า 112-115.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2546. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมว โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์* กรุงเทพฯ, หน้า 84-88.

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2546. การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี 2546.* หน้า 54-55.

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.

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. รางวัลที่ได้รับ

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

9.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

9.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

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

9.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

9.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

9.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

10. การจดสิทธิบัตร

10.1 รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช "อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์" ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน เมษายน 2550

10.2 รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ "เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง" ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547