รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-60-24-17

รายงานการวิจัย

ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนโคโดยเครื่อง Piezo-driven และ Microblade ก่อนการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification ต่ออัตรารอดหลังการทำละลายและการเกิด apoptosis

Effect of bovine embryo biopsy with Piezo-driven and Microblade before freezing by vitrification technique on embryo survival rates after vitrified-warmed and the variation in apoptosis

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-60-24-17

รายงานการวิจัย

ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนโคโดยเครื่อง Piezo-driven และ Microblade ก่อนการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification ต่ออัตรารอดหลังการทำละลายและการเกิด apoptosis

Effect of bovine embryo biopsy with Piezo-driven and Microblade before freezing by vitrification technique on embryo survival rates after vitrified-warmed and the variation in apoptosis

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

นางสาวกาญจนา ปัญญาไว

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณเกษตรกร ผู้เลี้ยงโคนมจังหวัดสระบุรีและนครราชสีมาที่เข้าร่วมโครงการ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)
หัวหน้าโครงการ
ธันวาคม 2563

บทคัดย่อ

การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคเป็นสิ่งที่ทำเพื่อนำเซลล์ที่เก็บได้ไปตรวจเพศตัวอ่อน หรือนำไปทำ genomic sequencing ก่อนนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนต้องใช้วิธีที่ไม่ทำให้เซลล์ตัวอ่อนเสียหาย และสามารถนำไปแช่แข็งต่อได้ การทดลองเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคระยะ บลาสโตซีสต์ที่ผลิตในหลอดแก้วโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven พบว่าการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนที่ 5 และ 10% จากจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อน ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ แต่คุณภาพของตัวอ่อนก่อนการเก็บแยกเซลล์จะส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน โดยตัวอ่อนเกรด 1 ที่เก็บแยกเซลล์โดยใช้ทั้ง 2 วิธีออกไป 5 หรือ 10% มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ใกล้คียงกันและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เก็บแยกเซลล์ ในขณะที่ตัวอ่อนเกรด 2 ที่เก็บแยกเซลล์ด้วย Microblade ออกไป 10% จะส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ ในขณะที่การเก็บด้วย Piezo-driven ที่ตัดออก 5 และ 10% ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮช บลาสโตซีสต์ทั้งในกลุ่มตัวอ่อนเกรด 1 และ 2

ตัวอ่อนเกรด 1 ที่ไม่ผ่านการเก็บแยกเซลล์และนำไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw ให้อัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ดีกว่าเกรด 2 ส่วนตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็งเกรด 1 มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์สูงกว่าตัวอ่อนเกรด 2 เล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอ่อนเกรด 2 ที่แช่แข็งโดยใช้ Cryotop มีอัตราเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์สูงกว่าที่แช่แข็งโดยใช้ 0.25 ml straw แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนในการทดลองแรกโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven พบว่าการใช้ Piezo-driven ให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนดีกว่าการใช้ Microblade จึงใช้ Piezo-driven เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อน แล้วนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw แล้วศึกษาอัตราการเกิด apoptosis พบว่าตัวอ่อนกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเก็บเซลล์และไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 มีอัตราการเกิด apoptosis ต่ำที่สุด และไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 สำหรับกลุ่มไม่มีการเก็บเซลล์และแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ทั้งเกรด 1 และ 2 มีอัตราการเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกัน แต่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเก็บเซลล์และไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสูงกว่ากลุ่มที่เก็บแยกเซลล์ของตัวอ่อนที่ไม่แช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่เก็บและไม่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ตัวอ่อนเกรด 1 มีอัตราการเกิด apoptosis ต่ำกว่าตัวอ่อนเกรด 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่เก็บและไม่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและแช่แข็งโดยใช้ 0.25 ml straw มีอัตราการเกิด apoptosis สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองนี้สรุปได้ว่าการแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์โดยใช้ Piezo-driven ให้ผลดีกว่าการใช้ Microblade การแช่แข็งตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์ด้วยวิธี vitrification ทำให้เพิ่มอัตราการเกิด apoptosis

Abstract

Bovine embryo biopsy is needed to bring the embryonic cells to do sexing or genomic sequencing before transfer embryo to recipient. The non-invasive technique need to be carried out which will not harmful to embryos and can also be cryopreserved. In vitro produced bovine blastocysts were biopsied using Microblade and Piezo-driven techniques. A biopsied embryonic cell at 5 and 10% was not effect on the development to hatched blastocyst stage. However, the grades of embryos before biopsy effect the development of embryos. The grade 1 embryo biopsied with both techniques at 5 and 10% showed similar development to hatched blastocyst stage and was not different from the non-biopsy group. In the grade 2 embryos, biopsied with Microblade at 10% effect of embryo development, whereas biopsy with Piezo-driven at 5 and 10% showed no effect of embryo development.

Non-biopsy grade 1 embryo and then vitrified by Cryotop and 0.25 ml straw showed higher development than those grade 2 embryos. The grade 1 non-vitrified embryos showed little development to hatched blastocysts than those grade 2 but not significant different. In grade 2 embryos that had been vitrified by Cryotop showed development to hatched blastocyst stage higher than 0.25 ml group, but not significant different,

The previous experiment showed that biopsied by Piezo-driven gave better embryo development. The Piezo-driven was selected to biopsied blastocysts and then vitrified by Cryotop and 0.25 ml straw then examined apoptosis. The non-biopsied and non-vitrified embryos in both grade 1 and 2 showed lowest apoptosis and no different with biopsied and non-vitrified group. The apoptosis of non-biopsied and vitrified by Cryotop showed no different in both grade 1 and 2, but significant higher than those in non-biopsied and non-vitrified embryos in both grade 1 and 2. In the non-biopsied and vitrified by Cryotop of grade 1 embryos showed significant lower apoptosis than that grade 2. The non-biopsied and biopsied group those vitrified by 0.25 ml straw showed highest apoptosis and significant higher than that in other groups. In summary, this study can be concluded that biopsy bovine blastocysts by Piezo-driven gave better embryo development than Microblade. Vitrification of bovine blastocysts caused increasing apoptosis rate.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	5
3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล	5
3.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	5
3.3 การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย	5
3.4 การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคโดย Microbalde	6
3.5 การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคโดยเครื่อง Piezo-driven-driven	6
3.6 การแช่แข็งและการทำละลายตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop	7
3.7 การแช่แข็งและการทำละลายตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ 0.25 ml straw	7
3.8 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis	8
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	8
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	9
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	13
5.1 สรุปผลการวิจัย	13
5.2 ข้อเสนอแนะ	13
บรรณานุกรม	14
ประวัติผู้วิจัย	17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ 11

ตารางที่ 2 ผลของการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ 11

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ apoptosis โดยวิธี TUNEL ในตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Piezo-driven driven และแช่แข็ง 12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Piezo-driven และ Microblade เมื่อนำมาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop หรือ 0.25 ml straw ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ หรือมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนเป็นเทคนิคที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อคัดเพศในโคก่อนระยะการฝังตัวของตัวอ่อน แต่พบว่ายังหาเทคนิคที่มีความเหมาะสมทำให้ตัวอ่อนหลังการเก็บแยกเซลล์มีความเสียหายน้อยที่สุด รวมถึงเพิ่มความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงาน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงประยุกต์ใช้เครื่อง Piezo-driven ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด เพื่อเปรียบเทียบกับการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนด้วยการใช้ Microblade ซึ่งเป็นวิธีการเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อน เนื่องจากมีความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงาน แต่พบว่าสร้างความเสียหายของเซลล์หลังขั้นตอนการตัดมากกว่าวิธีการอื่นๆ ซึ่งจะทำให้ได้วิธีการที่เหมาะสมต่อการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อน เพื่อคัดเพศในโคก่อนระยะการฝังตัวของตัวอ่อน และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการย้ายฝากตัวอ่อนคัดเพศในโคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคด้วยเครื่อง Piezo-driven และ Microblade ต่ออัตราเจริญของตัวอ่อน

1.2.3 เพื่อศึกษาอัตราการเกิด apoptosis ในเซลล์ตัวอ่อนที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์ด้วยวิธีการที่เหมาะสม และแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop หรือ 0.25 ml straw

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการผลิตตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์ในหลอดแก้ว แล้วนำมาเก็บแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Piezo-driven โดยการเปรียบเทียบกับการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคด้วย Microblade แล้วนำมาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop หรือ 0.25 ml straw เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อน รวมถึงการทำ TUNEL assay เพื่อตรวจสอบเซลล์ apoptotic ที่เกิดขึ้นในกลุ่มการทดลองต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบประสิทธิภาพการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนด้วยเครื่อง Piezo-driven เมื่อเทียบกับ Microblade รวมถึงอัตรารอดชีวิตและความเสียหายของเซลล์ตัวอ่อนที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์ด้วยเครื่อง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อคัดเพศในโคก่อนระยะการฝังตัวของตัวอ่อน ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตตัวอ่อนแยกเพศ เนื่องจากการใช้อสุจิแยกเพศเพื่อผลิตตัวอ่อนแยกเพศนั้นจำนวนตัวอ่อนที่เจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อสุจิที่ไม่ผ่านการแยกเพศ (Lu และคณะ, 1999) ในปัจจุบันได้มีรายงานวิธีการต่างๆ ในการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนเพื่อการตรวจเพศในโค ได้แก่ 1) needle technique ซึ่งกระทำโดยการใช้ปิเปตจับยึด (Holding pipette) ยึดตัวอ่อนไว้ แล้วสอดปิเปตตัด (cutting pipette) ผ่านโซนาเพลลูซิดาเข้าไปยัง perivitelline space ของตัวอ่อน แล้วแทงปิเปตตัดทะลุออกจากโซนาเพลลูซิดา จากนั้นจึงใช้ปิเปตจับยึดมาถูกับปิเปตตัดเพื่อให้โซนาเพลลูซิดาฉีกขาด แล้วจึงใช้ปิเปตสำหรับ biopsy ดูดเซลล์ของตัวอ่อนออกมา (Thibier และ Nibart, 1995; Cenariu และคณะ, 2012) 2) aspiration technique ทำโดยใช้ปิเปตจับยึดเพื่อยึดตัวอ่อนไว้ จากนั้นจึงใช้ปิเปตสำหรับ biopsy แทงทะลุผ่านโซนาเพลลูซิดาแล้วจึงทำการดูดเซลล์ของตัวอ่อนออกมา (Thibier และ Nibart, 1995; Vajta และคณะ, 1997) และ 3) Microblade technique เป็นการใช้ใบมีดขนาดเล็กกดลงผ่านโซนาเพลลูซิดาและไซโตพลาสซึมของตัวอ่อน เพื่อตัดแบ่งบางส่วนของตัวอ่อนออก (Leoni และคณะ, 2000; Thibier และ Nibart, 1995) การใช้เทคนิคที่ 1 และ 2 เก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนจะต้องทำโดยใช้เครื่อง micromanipulator แต่สำหรับเทคนิคที่ 3 พบรายงานว่าสามารถทำโดยการใช้ (Hasler, 2001) หรือไม่ใช้ (Bredbacka และคณะ, 1995) เครื่อง micromanipulator ได้เช่นกัน ซึ่ง Bredbacka และคณะ (1995) พบว่าการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดย Microblade และไม่ใช้เครื่อง micromanipulator ส่งผลให้ตัวอ่อนสูญเสียเซลล์บริเวณรอยตัดเนื่องจากการเสื่อมสลายของเซลล์ตัวอ่อนประมาณ 15-30% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ตัดโดยใช้เครื่อง micromanipulator ซึ่งเสียหายน้อยกว่า

จากการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนทั้ง 3 วิธีการดังกล่าวข้างต้น พบว่าการตัดแยกเซลล์ด้วย Microblade โดยใช้เครื่อง micromanipulator นั้นเป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บเซลล์เพื่อการตรวจเพศตัวอ่อนร่วมกับการย้ายฝากตัวอ่อนในโคอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงานเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ (Ogata และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตาม Cenariu และคณะ (2012) รายงานว่าอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในกลุ่มที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดย Microblade ต่ำกว่ากลุ่มที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดย needle และ aspiration อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Thibier และ Nibart (1995) ที่พบว่ากลุ่มของตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์โดย Microblade เมื่อนำไปแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับนั้น อัตราการตั้งท้องจะต่ำกว่ากลุ่มของตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์โดยวิธี aspiration (55% และ 28%, ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มของตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์โดยวิธี aspiration มีอัตราการตั้งท้องไม่ต่างจากกลุ่มของตัวอ่อนที่ไม่เก็บแยกเซลล์

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดย Microblade แม้จะให้ความสะดวกรวดเร็วต่อการปฏิบัติงาน เหมาะแก่การประยุกต์ใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อนในภาคสนาม แต่ทำให้เซลล์ตัวอ่อนเสียหายหลังการเก็บแยกเซลล์และส่งผลต่อเนื่องไปยังอัตรารอดหลังการแช่แข็ง และอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากให้แก่ตัวรับ ดังนั้นจึงควรหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนที่สร้างความเสียหายแก่เซลล์น้อยลงและมีความสะดวกรวดเร็วต่อการปฏิบัติงาน เช่น การใช้เครื่อง Piezo-driven ซึ่งจะมีเครื่องกำเนิดแรงชนิดควงสว่านและเหมือนค้อนตอกไปพร้อมๆกันที่ชั้นโซนาเพลลูซิดา ผ่านปิเปต biopsy สำหรับเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อน ซึ่งทำให้การการเจาะผ่านโซนาเพลลูซิดาและเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วยปิเปต biopsy ทำได้นุ่มนวลไม่ทำให้เซลล์เสียหายมากและสะดวกรวดเร็วขึ้น (Wang และ Ang, 2014) นอกจากนี้ยังไม่พบรายงานการใช้เครื่อง Piezo-driven ในการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนในโค

การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ทำให้ตัวอ่อนโคมีอัตรารอดหลังการละลายสูงกว่าการแช่แข็งด้วยวิธี slow freezing (Lopatárová และคณะ, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ซึ่งพบว่ามีความทนทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนที่ผลิตได้จากการปฏิสนธิในร่างกายสัตว์ (Enright และคณะ, 2000) และการแช่แข็งแบบ vitrification โดยใช้ Cryotop ซึ่งเป็นอุปกรณ์แช่แข็งที่มีประสิทธิภาพสูง เพราะมีอัตราการลดอุณหภูมิอยู่ที่ 20,000 °C/นาที ส่งผลทำให้ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่แข็ง ตัวอ่อนจึงมีอัตรารอดหลังการทำละลายสูง (Kuwayama และคณะ, 2005a) แต่อย่างไรก็ตามการแช่แข็งโดย Cryotop นั้นตัวอ่อนจะมีโอกาสสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อปนเปื้อน เนื่องจากพบรายงานว่าไวรัส และแบคทีเรียหลายชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้ในไนโตรเจนเหลว (Bielanski และคณะ, 2003; Bielanski, 2005) ดังนั้นหากมีตัวอย่างที่ติดเชื้ออยู่ในถังไนโตรเจนเหลว แล้วทำการแช่แข็งตัวอ่อนโดยการใช้อุปกรณ์ที่ตัวอ่อนมีโอกาสสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง อาจทำให้เกิดการติดเชื้อปนเปื้อนได้ในระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษาตัวอ่อน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจะนำวิธีการแช่แข็งโดยใช้ 0.25 ml straw ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ตัวอ่อนไม่สัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการย้ายฝากตัวอ่อนโคในภาคสนาม และผู้วิจัยได้คิดค้นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการแช่แข็ง (เลขที่อนุสิทธิบัตร 9367) มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยใช้ Cryotop ซึ่งการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งแบบ sanitary vitrification ต่อไป

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะศึกษาผลของการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนด้วยเครื่อง Piezo-driven แล้วนำตัวอ่อนไปทำการแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยการใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอ่อนที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์โดย Microblade นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเกิด apoptosis ของตัวอ่อนในแต่ละกลุ่มจะถูกนำมาเปรียบเทียบ เพื่อศึกษาความเสียหายของเซลล์ที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนและการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

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

3.3 การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (in vitro embryo production, IVP)

3.3.1 การเลี้ยงไข่ให้สุกภายนอกร่างกาย (in vitro maturation, IVM)

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่อุณหภูมิห้องขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่ออกจากถุงไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปมาเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 50 IU/ml hCG (Chlorulon®, Intervet International GmBH, Unterschleissheim, Germany), 0.02 AU/mL FSH (Antrin®, Kyoritsu Seiyaku, Japan) และ 1 µg/ml 17β-estradiol นำไข่ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (Parnpai et al., 1999)

3.3.2 การเตรียมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells)

เก็บท่อนำไข่จากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4 °C ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำการตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วย 70 % Ethanol 2 ครั้ง เก็บรวบรวมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ โดยใช้ปากคีบขูดเซลล์จากภายในท่อนำไข่ออกมา ล้างด้วยน้ำยา modified Dulbecco Phosphate Buffer Saline (mDPBS) 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ใช่เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ออก จากนั้นล้างในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS 2 ครั้ง ทำการเพาะเลี้ยงโดยย้ายใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm ในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil เพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เพื่อเตรียมไว้ co-culture กับตัวอ่อน (Parnpai และคณะ, 1999)

3.3.3 การเตรียมอสุจิเพื่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70% ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วดูด

น้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด Conical ขนาด 15 ml ที่มีน้ำยา TALP ปริมาตร 2.0 ml แล้วนำไปวางเอียง 45 องศา ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1.5 ml ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา TALP 5 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วยน้ำยา TALP ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัวต่อซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µl/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

3.3.4 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (in vitro fertilization, IVF)

นำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัสออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา TALP 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3 แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง

3.3.5 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย (in vitro embryo culture, IVC)

เมื่อครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิไปล้างด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (mSOFaa : synthetic oviduct fluid) ให้อสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่เกาะรอบ ๆ ไข่ออกให้มากที่สุด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่ ปิดคลุมด้วย mineral oil ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ (Parnpai และคณะ, 1999)

3.4 การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคโดย Microbalde

นำตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์มาล้างในน้ำยา mDPBS (Ca^{2+}, Mg^{2+} free) ที่มี 10% FBS จากนั้นจึงย้ายตัวอ่อนไปไว้หยดน้ำยาชนิดเดียวกันนี้ แล้วทำการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนด้วย Microblade (Bio-cut blade, Feather Safety Razor, Osaka, Japan) ซึ่งเป็นใบมีดขนาดเล็กปลายใบมีดมีขนาด 0.1 มม. มีแกนสำหรับต่อกับเครื่อง micromanipulator นิยมใช้ในการตัดเก็บตัวอ่อนโค ภายใต้กล้อง Inverted microscope (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) โดยใช้เครื่อง micromanipulator (M0188NE, Narishige, Tokyo, Japan) โดยจะตัดเซลล์เฉพาะส่วนของ Trophectoderm ประมาณ 5-10% ของพื้นที่ตัวอ่อนทั้งหมด หลังการตัดเซลล์จะนำตัวอ่อนส่วนที่เหลือไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa นาน 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญจนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

3.5 การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคโดยเครื่อง Piezo-driven

นำตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์มาล้างในน้ำยา mDPBS (Ca^{2+}, Mg^{2+} free) ที่มี 10% FBS จากนั้นจึงย้ายตัวอ่อนไปไว้ในหยดน้ำยาชนิดเดียวกัน แล้วจึงทำการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนภายใต้กล้อง Inverted microscope โดยใช้เครื่อง Piezo-driven (CT150, Prime Tech, Japan) โดยทำการเจาะเปิดโซนาเพลลูซิ

ดาด้วยปิเปต biopsy แล้วใช้ปิเปตอันเดียวกันตัดเซลล์เฉพาะส่วนของ Trophectoderm ประมาณ 5-10% ของพื้นที่ตัวอ่อนทั้งหมด หลังการตัดเซลล์จะนำตัวอ่อนส่วนที่เหลือไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa นาน 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญจนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

3.6 การแช่แข็งและการทำละลายตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

ใช้วิธีการเก็บแยกเซลล์ที่ให้ผลการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ที่ดีที่สุดระหว่าง Microblade หรือ Piezo-driven (จากการทดลองในข้อ 3.4 และ 3.5) มาทำการทดลอง แล้วนำตัวอ่อนไปแช่ในน้ำยา equilibration ที่ประกอบด้วย mDPBS + 20% FBS + 7.5% EG + 7.5% DMSO นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปแช่ในน้ำยา vitrification solution ที่ประกอบด้วย mDPBS + 20% FBS + 16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5 M sucrose ที่อุณหภูมิ 23-24 °C (Inaba และคณะ, 2011) แล้วนำตัวอ่อนไปวางไว้บริเวณปลายของ Cryotop แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที โดยระยะเวลาที่ตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification จนถึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวจะต้องไม่เกิน 30 วินาที ส่วนการทำละลายตัวอ่อนทำได้โดยนำ Cryotop จากถังไนโตรเจนเหลวจุ่มในน้ำยา warming ที่ประกอบด้วย TCM199 + 20% FBS + 0.1 mM beta mercaptoethanol เพื่อเจือจางสารแช่แข็ง แล้วนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญจนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

3.7 การแช่แข็งและการทำละลายตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ 0.25 ml straw

ใช้วิธีการเก็บแยกเซลล์ที่ให้ผลการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ที่ดีที่สุดระหว่าง Microblade หรือ Piezo-driven (จากการทดลองในข้อ 3.4 และ 3.5) มาทำการทดลอง แล้วนำตัวอ่อนไปแช่ในน้ำยา equilibration และ vitrification เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.6 แล้วทำการบรรจุตัวอ่อนจำนวน 1 ใบลงใน 0.25 ml straw ในการบรรจุจะมีการใส่น้ำยา dilution ที่ประกอบด้วย mDPBS + 20% FBS ลงไปก่อน 7.5 cm จากนั้นกั้นด้วยอากาศและใส่ตัวอ่อนที่มีน้ำยา vitrification solution 1 µl ลงไปและกั้นด้วยอากาศ หนีบปิดปลายหลอดด้วยความร้อน แล้วจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว โดยระยะเวลาที่ตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification จนถึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวจะต้องไม่เกิน 30 วินาทีเช่นเดียวกับการแช่แข็งโดย Cryotop ส่วนขั้นตอนการทำละลายทำโดยนำหลอด 0.25 ml straw ออกจากถังไนโตรเจนเหลวแล้วถือค้างในอากาศนาน 10 วินาที และจุ่มลงในน้ำอุ่น 35 °C เป็นเวลา 10 วินาที เช็ดภายนอกหลอดด้วย 70% แอลกอฮอล์ จากนั้นทำการสลัดหลอด 3 ถึง 5 ครั้ง ให้สารละลายทั้ง 2 ผสมเข้าด้วยกัน แล้วจึงตัดปลายหลอดด้านที่หนีบปิดด้วยความร้อนออกด้วยกรรไกรที่ฆ่าเชื้อมาแล้ว แล้วนำลวดสแตนเลสดันตัวอ่อนออกจาก straw โดยดันจากด้านที่เป็น Plug หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปไว้ใน warming ที่ประกอบด้วย TCM199 + 20% FBS + 0.1 mM beta mercaptoethanol เพื่อเจือจางสารแช่แข็ง แล้วนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญจนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ (Punyawai, 2015)

3.8. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis

ใช้วิธีการเก็บแยกเซลล์ที่ให้ผลการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ที่ดีที่สุดระหว่าง Microblade หรือ Piezo-driven (จากการทดลองในข้อ 3.4 และ 3.5) มาทำการทดลอง แล้วนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw แล้วนำมาทำละลายและเลี้ยงอีก 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis ด้วย terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (Roche, USA) ตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยใช้กลุ่มตัวอ่อนสดที่ไม่ผ่านการเก็บแยกเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนำตัวอ่อนไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศฟลูออเรสเซ้นท์ เซลลที่ติดสีน้ำเงินคือเซลล์ทั้งหมดในตัวอ่อน และเซลล์ที่ติดสีเขียวแสดงถึงเซลล์ที่เกิด apoptosis อัตราการเกิด apoptosis คิดจากจำนวนเซลล์ที่ติดสีเขียวหารด้วยจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Chen และคณะ, 2018)

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนหลังการตัดแบ่งเซลล์โดยใช้ Microblade และ Piezo-driven และอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งและเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ 48 ชั่วโมง และอัตราการเกิด apoptosis โดยการทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) (Steel and Torrie, 1985) โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

จากตารางที่ 1 การทดลองเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven พบว่า การเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนที่ 5 และ 10% เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อน ไม่ส่งผลต่ออัตรารอด ซึ่งวัดจากการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ แต่คุณภาพของตัวอ่อนก่อนการเก็บแยกเซลล์จะส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ โดยตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีมาก (เกรด 1) เมื่อนำมาทำการเก็บแยกเซลล์โดยใช้ Microblade และ Piezo-driven-driven ออกไป 5 หรือ 10% ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เก็บแยกเซลล์ ในขณะที่ตัวอ่อนที่คุณภาพดี (เกรด 2) เมื่อนำมาเก็บแยกเซลล์ด้วย Microblade พบว่าเมื่อตัดเซลล์ออกไปที่ 10% ทำให้การเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ต่ำลง แต่การตัดด้วย Piezo-driven ที่ตัดออก 5 และ 10% ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ทั้งในกลุ่มตัวอ่อนเกรด 1 และ 2 ซึ่งแสดงว่าการตัดด้วย Piezo-driven มีผลกระทบต่อความเสียหายของตัวอ่อนต่ำกว่าการตัดด้วย Microblade สอดคล้องกับรายงานของ Hasler และคณะ (2001) ที่พบว่าเมื่อนำตัวอ่อนคุณภาพดีมาทำการ biopsy อัตรารอดหลังการทำ biopsy และอัตราการฝากติดจะน้อยกว่ากลุ่มของตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Sousa และคณะ (2017) รายงานว่าการตัดเก็บตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์ที่ได้จากการปฏิสนธิในตัวสัตว์และในหลอดแก้ว โดยใช้ Microblade ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตหลังตัด และความสามารถในการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าคุณภาพของตัวอ่อนทีจะนำมาทำการเก็บแยกเซลล์ และวิธีการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนส่งผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังการตัด

4.1.2 ผลของการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

จากตารางที่ 2 ผลการนำตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการเก็บแยกเซลล์ไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw พบว่าตัวอ่อนเกรด 1 ให้อัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ดีกว่าเกรด 2 ในทุกกลุ่มการทดลองแช่แข็ง ส่วนตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็งเกรด 1 มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์สูงกว่าตัวอ่อนเกรด 2 เล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอ่อนเกรด 2 ที่แช่แข็งโดยใช้ Cryotop มีอัตราเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์สูงกว่าที่แช่แข็งโดยใช้ 0.25 ml straw แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ Cryotop เป็นอุปกรณ์ในการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification มีรายงานอัตรารอดหลังการทำละลายดีมากในสัตว์หลายประเภท (Kuwayama และคณะ, 2005b) ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้ของ Inaba และคณะ (2011) ซึ่งทำการแช่แข็งตัวอ่อนโคใน 0.25 ml straw โดยนำตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา

vitrification แบบ 3 ขั้นตอน โดยมีอัตรารอดหลังการทำละลายที่ดีขึ้นจากการใช้น้ำยาแช่แข็งสูตรเดิม อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่เจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนกลุ่มแช่แข็งจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุม หรือกลุ่มของตัวอ่อนสดที่ไม่ทำการแช่แข็ง ส่วนผลของการวิจัยนี้การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ให้อัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนหลังทำละลายดีกว่าการใช้ 0.25 ml straw เล็กน้อย

4.1.3 ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนด้วย Piezo-driven แล้วนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ Piezo-driven ต่ออัตราการเกิด apoptosis

จากตารางที่ 3 ผลการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนในการทดลองแรกโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven พบว่าการใช้ Piezo-driven ให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์ดีกว่าการใช้ Microblade จึงใช้ Piezo-driven เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อน แล้วนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw แล้วศึกษาอัตราการเกิด apoptosis พบว่าตัวอ่อนกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเก็บเซลล์และไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 มีอัตราการเกิด apoptosis ต่ำที่สุด และไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 สำหรับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเก็บเซลล์และแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ทั้งเกรด 1 และ 2 มีอัตราการเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกัน แต่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเก็บเซลล์และไม่มีการแช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสูงกว่ากลุ่มที่เก็บแยกเซลล์ของตัวอ่อนที่ไม่แช่แข็งทั้งเกรด 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่เก็บและไม่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ตัวอ่อนเกรด 1 มีอัตราการเกิด apoptosis ต่ำกว่าตัวอ่อนเกรด 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่เก็บและไม่เก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนและแช่แข็งโดยใช้ 0.25 ml straw มีอัตราการเกิด apoptosis สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ DNA แตกหักมีสาเหตุมาจากการเกิด apoptosis ทำให้สามารถใช้เป็นดัชนีบอกคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ได้ดี (Byrne และคณะ, 1999) ดังนั้นจึงสามารถใช้อัตราการเกิด apoptosis เพื่อดูผลจากการแช่แข็งตัวอ่อนได้ Park และคณะ (2006) รายงานว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคด้วยวิธี vitrification จะเพิ่มอัตราการแตกหักของ DNA นอกจากนี้ Wu และคณะ (2016), Chen และคณะ (2018) และ Inaba และคณะ (2016) พบว่าตัวอ่อนสุกรและโคที่มีคุณภาพต่ำจะมีการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นหลังการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 ผลของการเก็บแยกเซลล์ตัวอ่อนโดยใช้ Microblade และ Piezo-driven ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

วิธีเก็บเซลล์ตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อน	เกรดตัวอ่อน	% เซลล์ตัดออก	จำนวนตัวอ่อน (%) เจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์
Control	20	1	-	18 (90.00) [a]
	20	2	-	16 (80.00) [b]
Microblade	20	1	5	18 (90.00) [a]
	20	2	5	17 (85.00) [a]
	20	1	10	18 (90.00) [a]
	20	2	10	14 (70.00) [c]
Piezo-driven	20	1	5	18 (90.00) [a]
	20	2	5	17 (85.00) [ab]
	20	1	10	18 (90.00) [a]
	20	2	10	17 (85.00) [ab]

ทำการทดลอง 8 ซ้ำ

[a,b,c] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Chi-square)

ตารางที่ 2 ผลของการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop และ 0.25 ml straw ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์

ชนิดการแช่แข็ง	เกรดตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อน	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสต์
Fresh control	1	20	18 (90.0) [a]
	2	20	16 (80.0) [ab]
Cryotop	1	20	17 (85.0) [a]
	2	20	14 (70.0) [bc]
0.25 ml straw	1	20	16 (80.0) [ab]
	2	20	13 (65.0) [c]

ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

[a,b,c] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Chi-square)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ apoptosis โดยวิธี TUNEL ในตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Piezo-driven driven และแช่แข็ง

วิธีเก็บเซลล์ตัวอ่อน	เกรดตัวอ่อน	วิธีการแช่แข็ง	จำนวนตัวอ่อน	TUNEL positive rate
ไม่เก็บ (Control)	1	Fresh control	20	85/2,102 (4.0%)[a]
		Cryotop	20	158/2,009 (7.8%)[b]
		Straw	20	195/2,143 (9.0%)[c]
	2	Fresh control	20	81/2,012 (4.0%)[a]
		Cryotop	20	162/1,997 (8.1%)[b]
		Straw	20	189/1,928 (9.8%)[c]
Piezo-driven-	1	Fresh control	20	87/1,840 (4.7%)[a]
		Cryotop	20	148/1,802 (8.2%)[b]
		Straw	20	187/1,854 (10.0%)[c]
	2	Fresh control	20	91/1,852 (4.9%)[a]
		Cryotop	20	182/1,891 (9.7%)[c]
		Straw	20	198/1,813 (10.9%)[c]

ทำการทดลอง 8 ซ้ำ

[a,b,c] ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (Chi-square)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่เก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์โดยใช้ Piezo-driven และให้ผลดีกว่าการเก็บแยกเซลล์จากตัวอ่อนโดยใช้ Microblade

5.1.2 การแช่แข็งตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์ด้วยวิธี vitrification ทำให้เพิ่มอัตราการเกิด apoptosis

5.1.3 การแช่แข็งตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสต์ด้วยวิธี vitrification โดยใช้ 0.25 ml straw มีอัตราการเกิด apoptosis สูงสุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรนำตัวอ่อนที่ผ่านการเก็บแยกเซลล์แล้วแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ เพื่อทดสอบอัตราการตั้งท้องและการคลอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P.C.K. and Devenish, J. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. ***Cryobiology*** 46: 146–152.

Bielanski, A. 2005. Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapor phase of liquid nitrogen in dry shippers. ***Cryobiology*** 50: 206–210.

Bredbacka, P. 1995. Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. ***Theriogenology*** 44: 159-166.

Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., and Leese, H.J. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. ***J. Reprod. Fertil.*** 117: 97-105.

Cenariu, M., Emoke, P. and Loan, G. 2012. The influence of biopsy method on the survival rates of sexed and cryopreserved bovine embryos. ***Afr. J. Biotechnol.*** 11: 4459-4462.

Chen, Y.N., Dai, J.J., Wu, C.F., Zhang, S.S., Ling-Wei Sun, L.W. and Zhang, D.F. 2018. Apoptosis and developmental capacity of vitrified parthenogenetic pig blastocysts. ***Anim. Reprod. Sci.*** 198: 137-144.

Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward. F.A., Yang, X. and Boland, M.P. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes in vitro versus *in vivo*: implications for early embryo development and quality. ***Theriogenology*** 54: 659-673.

Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. ***Theriogenology*** 56: 1401-1415.

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

Inaba, Y., Miyashita, S., Somfai, T., Geshi, M., Matoba, S., Dochi, O. and Nagai, T. 2016. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. Cryobiology. 72: 86-92.

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S. and Kato, O. 2005a. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. ***Reprod. Biomed. Online***. 11: 608–614.

Kuwayama, M., G. Vajta, O. Kato and S.P. Leibo. 2005b. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. ***Reprod. Biomed.*** 11: 300-308.

Leoni, G., Ledda, S., Bogliolo, L. and Naitana, S. 2000. Novel approach to cell sampling from preimplantation bovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. ***J. Reprod. Fert.*** 119: 309-314.

Lopatárová, M., Cech, S., Havlicek, V. and Holy, L. 2002: Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. ***Acta Vet. Brno.*** 71: 93–99.

Lu, K.H., Cran, D.G. and Seidel, Jr. G.E. 1999. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. ***Theriogenology*** 52: 1393-1405.

Ogata, Y., Hidaka, T., Matzushige, T. and Maeda, T. 2015. Comparison of Two Biopsy Methods in Bovine Embryos. ***J. Adv. Biol. Biotechonol.*** 2: 16-23.

Park, S.Y., Kim, E.Y., Cui, X.S., Tae, J.C., Lee, W.D., Kim, N.H., Park, S.P. and Lim, J.H. 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. ***Zygote.*** 14: 125-131.

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.

Punyawai, Kanchana. 2015. Improvement of vitrification technique for one step dilution of vitrified biopsied bovine IVF-derived embryos. ***PhD. Thesis, Suranaree University of Technology.*** 97 p.

Sousa, R.V.d., Silva Cardoso, C.R.D., Butzke, G., Nunes Dode, M.A., Rumpf, R., and Franco, M.M. 2017. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. ***Theriogenology*** 90: 25-31.

Thibier M and Nibart, M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. ***Theriogenology*** 43: 71-80.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. 1997. Comparsion of two methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryo. ***Theriogenology*** 47: 501-509.

Wang, Z.N. and Ang, W.T. 2014. Application of lateral oscillating piezo-driven micropipette in embryo biopsy for pre-implantation genetic diagnosis. ***Control Automation Robotics & Vision (ICARCV), 2014 13th International Conference on, Singapore.*** doi: 10.1109/ICARCV.2014.7064489.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Wu, G.Q., Quan, G.B., Shao, Q.Y., lv, C.R., Jiang, Y.T., Zhao, Z.Y. and Hong, Q.H. 2016. Cryotop vitrification of porcine parthenogenetic embryos at the early developmental stages. 85: 434-440.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1. **ชื่อ** (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย
   (ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. **เกิด**วันที่ 7 มีนาคม 2502

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน รอง**ศาสตราจารย์
   ยื่นผลงานเพื่อขอกำหนดตำแหน่งศาสตราจารย์เมื่อวันที่ 19 กันยายน 2560 และผ่านการประเมินจากมหาวิทยาลัยแล้ว ขณะนี้อยู่ระหว่างรอพระบรมราชโองการโปรดเกล้าโปรดกระหม่อมแต่งตั้ง

4. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้**
   ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
   โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154
   ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. **ประวัติการศึกษา**
   5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
   สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย
   5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
   สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
   Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.
   5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
   สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
   Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.
   5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
   ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.
   5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:
   5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998
   5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)
   5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5.5.4. Asian Reproductive Biotechnology Society

5.5.5. Thai Society for Biotechnology

5.5.6. Thai Society for Reproductive Medicine

5.5.7. Thai Society for Animal Reproduction

5.5.8. Thai Society for Gametes and Embryo Research

5.5.9. Society for Stem Cell Research

6. ประวัติการทำงาน:

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

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

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

9. ผลงานตีพิมพ์ย้อนหลัง 7 ปี

2020

Theerakittayakorn, K., Nguyen, H.T., Musika, J., Kunkanjanawan, H., Imsoonthornruksa, Somredngan, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2020. Differentiation induction of human stem cells for corneal epithelial regeneration. ***Int. J. Mol. Sci.*** 21, 7834.

Kunkanjanawan, H., Kunkanjanawan, T., Khemarangsan, V., Yodsheewan, R., Theerakittayakorn, K. and **Parnpai, R.*.** 2020. A xeno-free strategy for derivation of human umbilical vein endothelial cells and Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: a feasibility study toward personal cell and vascular based therapy. ***Stem Cell International.*** doi.org/10.1155/2020/8832052

Yodrug, T., ***Parnpai, R.****., Hirao, Y. and Somfai, T. 2020. The effects of vitrification after equilibration in different concentrations of cryoprotectants on the survival and quality of bovine blastocysts. ***Anim. Sci. J.*** doi.org/10.1111/asj.13451

Liang, Y.Y., Yoisungnern, T., Huang, Y. Parnpai, R*. 2020. Effects of Lcarnitine on embryo development of vitrified swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. ***Livestock Sci.*** 232: 103933

2019

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

Panta, W., Imsoonthornruksa, S., Yoisungnern, T., Suksaweang, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.***. 2019. Enhanced hepatogenic differentiation of human Wharton's jelly–

derived mesenchymal stem cells by using three-step protocol. ***Int. J. Mol. Sci.*** 20: 3016.

2018

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

Liang, Y. and **Parnpai, R.*** 2018. Effect of vitrification procedures on the subsequent development of in vitro matured swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. ***Anim. Sci. J.*** 89: 1201-1206.

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

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

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2017. Survival and developmental competence of bovine embryos at different developmental stages and separated blastomeres after vitrification in different solutions. ***Anim. Sci. J.*** 89: 42-51.

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2018. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** 89: 307-315.

2017

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

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

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

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

2016

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

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

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

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

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

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.,** Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor

fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology.*** 71: 216-223.

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

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** 61 : 431-437.

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

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

2014

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2013

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

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

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

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

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

2012

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

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

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

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

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

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

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

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M*. and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term

development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14: 248-257.

Takeda, K*., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. ***J. Reprod. Dev.*** 58: 323-329.

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

2011

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

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

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

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

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

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

Noisa, P*. and **Parnpai, R.** 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. ***Stem Cells Int.*** 907961. 3

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

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

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

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16: 057005-1. 2010

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

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

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

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

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

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. รางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปีงบประมาณ 2564 จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

11.2. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

11.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.4. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.5. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

12. การจดสิทธิบัติ

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

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

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

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

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