รหัสโครงการ SUT3-304-46-36-18

รายงานการวิจัย

การผลิตลูกโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมียโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง

Production of only female exotic dairy cattle by cloning technology

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค ขอขอบคุณน้ำฝนฟาร์ม อำเภอวังม่วง จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์โคนมตัวรับอุ้มท้อง และขอขอบคุณ ดร.จันทร์เจ้าล้อทองพานิชย์ และ ดร.ชุติ เหล่าธรรมธร ตลอดจนนักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอก ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลองครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูจากโคนมพันธุ์ดีเพศเมีย แล้วนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเข้าทำการทดลอง เพื่อตรวจสอบระยะของ hatching มีผลต่อการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification และการเติม linoleic acid-albumin (LAA) ในน้ำยา IVC และ Ficoll ในน้ำยา vitrification จะเพิ่มการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งหรือไม่ นำไข่ที่เชื่อมกับเซลล์ต้นแบบแล้วไปกระตุ้นด้วย ethanol และ cycloheximide-cytochalasin D (วัน 0) จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA นำตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงไว้ 7 วัน มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสัดส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่ออกมาจากชั้น zona pellucida และเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่อยู่ภายในชั้น zona pellucida นำตัวอ่อนไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification ในน้ำยา TCM199 + 20% FBS ที่มี 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose ที่เติมหรือไม่เติม 10% Ficoll โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะสำหรับแช่แข็ง ตรวจสอบการอยู่รอดหลังจากทำละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง การเติม LAA ลงในน้ำยา IVC และน้ำยาสำหรับทำ vitrification ที่ไม่เติม Ficoll จะได้อัตราอยู่รอดของกลุ่ม early-hatching blastocyst (77%) ไม่แตกต่างจากกลุ่ม middle- และ late-hatching blastocyst (74 และ 80%, ตามลำดับ) การเติม Ficoll ในน้ำยา vitrification ไม่ช่วยให้มีอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสเพิ่มขึ้น (54-68%) ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst ที่ผลิตในน้ำยาที่ไม่มี LAA จะรอดต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม late-hatching blastocyst (56% vs 80%, $p < 0.05$) การตั้งท้องจนคลอดลูกโคโคลนนิ่งออกมาพบได้เฉพาะการฝากตัวอ่อนสดให้ตัวรับเท่านั้น การทดลองนี้สรุปได้ว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ บลาสโตซีสไม่ว่าจะอยู่ในระยะ hatching ใดก็ตาม หากเลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA จะมีอัตรารอดหลังจากแช่แข็งเท่าเทียมกัน และสามารถผลิตลูกโคนมพันธุ์ดีเพศเมียจากการทำโคลนนิ่งได้

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูจากโคนมพันธุ์ดีเพศเมีย แล้วนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเข้าทำการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการอยู่รอดหลังแช่แข็งของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี micro-drop ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa medium + 0.3% BSA นาน 7 วัน นำตัวอ่อนระยะ middle- และ late-hatching blastocyst ไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) โดยวิธี micro-drop การทำละลายตัวอ่อนทำโดยนำ micro-drop ไปไว้ใน 0.6 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาที และล้างใน 0.4 0.2 และ 0 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาทีในแต่ละครั้ง ตรวจสอบการอยู่รอด หลังจากทำ

ละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง และนำตัวอ่อนไปย้อมแบบ differential ด้วย 75 μg/mL propidium iodide + 100 μg/mL Hoechst 33258 ความอยู่รอดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งในน้ำยา VS33 (86%) ไม่แตกต่างจากในน้ำยา VS35 (94%) จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS33 และ VS35 มี 130±50 และ 128±30 ตามลำดับ โคตัวรับมีการตั้งท้องที่ 60 วันหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งในอัตรา 15.8 และ 11.8 % ตามลำดับ มีเพียงโคตัวรับที่ตั้งท้องจากตัวอ่อนสดได้คลอดลูกออกมา การทดลองนี้สรุปได้ว่าสามารถประสบความสำเร็จในการนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสนำไปทำ vitrification ในน้ำยา VS33 และ VS35 โดยวิธี micro-drop และสามารถผลิตลูกโคนมพันธุ์ดีเพศเมียจากการทำโคลนนิ่งได้

Abstract

This experiment was divided into 2 experiments. In Experiment 1, the objective was to produce cloned embryos using ear fibroblasts of exotic female dairy cattle and then embryos at blastocysts stage were determined whether the hatching stage affected cryosurvival after vitrification, and whether addition of linoleic acid-albumin (LAA) to the IVC medium and Ficoll to the vitrification solution improves cryosurvival. Ear fibroblasts of female Holstein Friesian (HF) were used as donor cell. Fused couplets were activated with ethanol and cycloheximide-cytochalasin D (day 0), and were allowed to develop in mSOFaa medium presence of 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA. Hatching blastocysts were harvested at day 7.0, and classified into one of three categories, according to the ratio of extruding embryonics diameter from zona to embryonic diameter inside the zona pellucida. The blastocysts were vitrified in 20% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% ethylene glycol (EG) + 0.5 M sucrose, with or without 10% Ficoll in TCM199 + 20% FBS, using Cryotop as a cryodevice. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h. When the LAA-supplemented IVC medium and the Ficoll-free vitrification solution were used, cryosurvival of the early-hatching blastocysts (77%) was not different from those of middle- and late-hatching blastocysts (74 and 80%, respective). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did not improve the cryosurvival of cloned blastocysts (54 to 68%). Early hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to vitrification procedure (cryosurvival 56%; $p < 0.05$ versus 80% in the late-hatching blastocysts). The full-term developmental potential of cloned blastocysts was proven only in the non-vitrified control group. In conclusion, bovine cloned blastocysts, regardless of their hatching stage, were relatively resistant to vitrification by the ultra-rapid cooling procedure when the blastocysts were produced in the presence of LAA and can be produced an exotic dairy calf from cloning technique.

Experiment 2, the objective was to produce cloned embryos using ear fibroblasts of exotic female dairy cattle and then embryos at blastocysts stage were used to compared the effects of concentration of EG and DMSO in the vitrification solution on the survival rate of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. Ear fibroblasts of female HF were used as donor cell. The embryos were cultured in mSOFaa medium + 0.3% BSA for 7 days. Cloned blastocysts at middle- and late-hatching were vitrified in VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) or VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) using micro-drop technique. Embryos were warmed by directly placed micro-drop

into 0.6 M sucrose at 38° C for 5 min and washed in 0.4 , 0.2 and 0 M sucrose for 5 min in each step at at 38° C. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h and differential stained with 75 μg/mL propidium iodide + 100 μg/mL Hoechst 33258. The cryosurvival of blastocysts after cultured of VS33 (86%) was not significant different with VS35 (94%). Cell numbers of vitrified blastocysts were 130±50 and 128±30 in VS33 and VS35, respectively. The pregnancy rate at days 60 of fresh and vitrified embryos were 15.8 and 11.8 %, respectively. Only pregnant recipients from fresh embryos gave birth to live calves. In conclusion, bovine cloned blastocysts were successfully vitrified by using micro-drop technique in VS33 and VS35 and can be produced an exotic dairy calf from cloning technique.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3. ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4. ข้อตกลงเบื้องต้น	2
1.5. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	5
3.1. การทดลองที่ 1	5
3.1.1. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	5
3.1.1.1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ	5
3.1.1.2. การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ	5
3.1.1.3. การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์	6
3.1.1.4. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว	6
3.1.1.5. การคัดเลือกตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst เพื่อแช่แข็งโดยวิธี Vitrification	7
3.1.1.6. การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี Cryotop	7
3.1.1.7. การละลายตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากละลาย	8
3.1.1.8. การย้ายฝากตัวอ่อน	8
3.1.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ	8
3.2. การทดลองที่ 2	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.1. สารเคมี วิธีการโคลนนิ่ง การเลี้ยงตัวอ่อน	9
3.2.1.1. การแช่แข็งตัวอ่อน	9
3.2.1.2. การละลายตัวอ่อน	9
3.2.1.3. การย้อมสีตัวอ่อน	9
3.2.1.4. การย้ายฝากตัวอ่อน	9
3.2.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	11
ผลการทดลองที่ 1	11
วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1	14
ผลการทดลองที่ 2	17
วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2	19
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	22
สรุปผลการวิจัย	22
ข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ประวัติผู้วิจัย	29

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA .. 12

ตารางที่ 2 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ผ่าน การแช่แข็งและละลาย: ผลของ hatching stage ของตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มี LAA และแช่แข็งในน้ำยา vitrification (VS) ที่มี Ficoll 12

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งและตัวอ่อนสด ... 14

ตารางที่ 4 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching balstocyst หลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 หรือ VS35 18

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ TE และ ICM และอัตราส่วนของ TE และ ICM ของตัวอ่อนโคลนนิ่งโครระยะ hatching blastocyst 18

ตารางที่ 6 อัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสดและตัวอ่อนแช่แข็งระยะ hatching blastocyst 18

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 Hatching stage ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง 7

ภาพที่ 2 ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน หลังจากแช่แข็ง และละลายออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง Scale bar = 50 μm 13

ภาพที่ 3 ลูกโคโคลนนิ่งเพศเมียที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด ผลิตจากการใช้เซลล์ใบหูโคนมพันธุ์ดีเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ 13

ภาพที่ 4 ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด 19

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปกติโคจะมีโอกาสตกลูกเป็นเพศผู้หรือเพศเมียในอัตราเท่าๆกันขึ้นกับว่าจะได้รับการปฏิสนธิจากตัวอสุจิเพศผู้หรือเพศเมีย กิจการเลี้ยงโคนมต้องการลูกโคเพศเมียเพื่อเอาไว้ขยายพันธุ์และรีดนม หากได้ลูกเพศเมียในอัตราสูงย่อมมีโอกาสได้กำไรสูง ในประเทศไทยโคนมพันธุ์ดีที่ให้น้ำนมเฉลี่ยปีละ 7,000 กิโลกรัม ยังมีน้อยมาก ทำให้โอกาสได้ลูกโคนมพันธุ์ดีเพศเมียมีน้อยลงไปอีก ดังนั้นหากมีวิธีการที่สามารถเพิ่มจำนวนโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมียได้มากๆจะสามารถตอบสนองความต้องการของเกษตรกรและตอบสนองความต้องการบริโภคภายในประเทศ ซึ่งในปัจจุบันยังมีการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท

การโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบเป็นเทคโนโลยีที่จะสามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีค่าพันธุกรรมเหมือนกันและเพศเดียวกันได้อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวนมากตราบเท่าที่เราต้องการ ขึ้นอยู่กับเซลล์ต้นแบบว่านำมาจากโคเพศและพันธุ์ใด ดังนั้นจึงควรศึกษาวิจัยและทดสอบเทคโนโลยีนี้อย่างจริงจัง.เพื่อนำเทคโนโลยีโคลนนิ่งมาใช้เพิ่มจำนวนโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมีย นอกจากนี้แล้วหากสามารถวางรากฐานการโคลนนิ่งในโคได้แล้ว จะสามารถประยุกต์ใช้ในสัตว์ชนิดอื่นได้อีกเช่น สุกร กระบือ สัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์เช่น กูปรี กระทิง เลียงผา แมวป่า แมวลายหินอ่อน เป็นต้น อันจะนำไปสู่ความเป็นผู้นำเทคโนโลยีในภูมิภาคนี้และนำไปสู่การผลิตเพื่อการส่งออกในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยีในระดับประเทศและระดับเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ศูนย์กลางผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอกทางด้านนี้ซึ่งยังขาดแคลนและไม่มีผู้ผลิตโดยตรง

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อผลิตลูกโคนมโคลนนิ่งพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมีย ตั้งท้องในแม่โคพันธุ์ทั่วไป

1.2.2. เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับอัตราการตั้งท้องและคลอดลูกระหว่างการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสดและที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

จะทำการวิจัยหาอัตราการจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งถึงระยะhatching blastocyst เมื่อใช้เซลล์ต้นแบบจากใบหูโคนมพันธุ์ดีเพศเมีย แล้วทำการวิจัยหาวิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่

ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ที่จะทำให้ตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมีการเจริญเติบโตถึงระยะ hatching blastocyst ในอัตราเทียบเท่าตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสดและแช่แข็งให้โคตัวรับ

1.4. ข้อตกลงเบื้องต้น

ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่ง ที่ผลิตจากการใช้เซลล์ใบหูโคนมพันธุ์ดีเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ตลอดจนอัตราความอยู่รอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็ง และอัตราการตั้งท้องและคลอดลูกหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งให้โคตัวรับ

1.5. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1. จะได้ลูกโคนมโคลนนิ่งพันธุ์ดีเพศเมีย ตั้งท้องในแม่โคพันธุ์ทั่วไป

1.5.2. จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับอัตราการตั้งท้องและคลอดลูกระหว่างการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสดและที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ผลสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรายงานโดย Illmensee and Hope (1981) ด้วยการโคลนนิ่งหนูถีบจักรโดยใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบฉีดเข้าในโอโอไซท์ที่ดูดนิวเคลียสออก จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว แล้วนำไปย้ายฝากให้หนูตัวรับจนได้ลูกเกิดมา ความสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งในปศุสัตว์จนได้ลูกแกะโคลนนิ่ง (Willadsen, 1986); ลูกโคโคลนนิ่ง (Prather et al., 1987) และ ลูกสุกรโคลนนิ่ง (Prather et al., 1989) จากความสำเร็จเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายต่างพยายามวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิคการทำโคลนนิ่งโดยเฉพาะในโคซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทั้งด้านเนื้อและนม จนในที่สุดสามารถทำโคลนนิ่งโคเชิงการค้าได้ (Bondioli et al., 1990; Bondioli, 1993; Stice and Keefer, 1993) ประมาณกันว่าจำนวนลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาทั่วโลกจนถึงปี 2538 มีอยู่ระหว่าง 1,000 ถึง 2,000 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตในบริษัทเอกชนแถบอเมริกาเหนือ (Seidel, 1995) ซึ่งทั้งหมดนี้ยังคงใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งเดือนมีนาคม 2540 ได้มีรายงานการเกิดของลูกแกะดอลลีจากการโคลนนิ่งด้วยเซลล์จากต่อมน้ำนมของแกะโตเต็มวัย (Wilmut et al., 1997) นอกจากนี้มีรายงานการเกิดของหนูถีบจักรจากการโคลนนิ่งด้วยการใช้เซลล์คิวมูลัสซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ (Wakayama et al., 1998) ในระยะเวลาที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกต่างพยายามโคลนนิ่งสัตว์ด้วยเซลล์ร่างกายโดยเฉพาะในโคจนได้ลูกโคเกิดจากการใช้เซลล์ร่างกายจากโคเต็มวัยเกิดมาตัวแรกโดยใช้เซลล์คิวมูลัสและเซลล์บุท่อนำไข่เป็นเซลล์ต้นแบบ (Kato et al., 1998) นอกจากนี้เซลล์ร่างกายอื่นๆสามารถนำมาทำโคลนนิ่งจนได้ลูกโคเกิดมาได้แก่เซลล์จากลูกอ่อนโค (Cibelli et al., 1998; Vignon, et al., 1999; Zakhartchenko et al. 1999) และเซลล์จากโคเต็มวัยได้แก่เซลล์แกรนนูโลซา (Wells et al., 1999) และเซลล์ใบหู (Vignon, et al., 1999) จากการใช้เซลล์ร่างกายจากลูกอ่อน (fetal fibroblasts) ที่เชื่อมด้วย β-galactosidase-neomycin resistance fusion gene แล้วนำไปเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแล้วย้ายฝากให้โคตัวรับจนได้ลูกโคที่มี gene นี้เกิดมาแต่เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จยังต่ำ (Cibelli et al., 1998) ในประเทศไทย ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และทีมงานได้ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์แบรงกัสเป็นเซลล์ต้นแบบจนได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาในวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์และรายที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันพันธุ์ดีเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2544 นับเป็นความสำเร็จของการโคลนนิ่งโคพันธุ์บราห์มันรายแรกของโลก (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000; http://www.vet.chula.ac.th) นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนนิ่งกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟ

โบรบลาสจากลูกอ่อนและเซลล์แกรนนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ (รังสรรค์และคณะ 2543b; Parnpai et al. 1999; 2000) นับถึงขณะนี้มีเพียงรายงานเดียวในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์คิวมูลัสเป็นเซลล์ต้นแบบซึ่งมีผลการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น (Nguyen et al., 2000)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การทดลองที่ 1

การทดลองนี้มีวัถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งและ hatching stage ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเพศเมียหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

3.1.1. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.1.1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างใบหูโคนมพันธุ์ดีที่ให้น้ำนมไม่ต่ำกว่า 7,000 กิโลกรัม/ระยะเวลาให้นม ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อน แล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 mm แล้วนำไปวางไว้บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 mm แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยา α MEM +10% FCS ลงไป 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 10 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 3 วัน เมื่อพบเซลล์ไฟโบรบลาสเจริญออกมาจากชิ้นหนังหูมากพอสมควรแล้วจึงแยกเซลล์ไฟโบรบลาสออกด้วยการเติมสารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์แล้วนำชิ้นหนังหูและกระจกสไลด์ออก จากนั้นนำสารละลายในจานเลี้ยงเซลล์ไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM +10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 cm^2 ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา α MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air แล้ว passage ทุกๆ 3-4 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

3.1.1.2. การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิห้อง ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ เจาะดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิล ($\varnothing$ 3-6 mm) ด้วยกระบอกฉีดยา 10 ml ที่ต่อกับเข็ม 21G เก็บส่วนที่ดูดได้ไว้ในหลอด 15 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูดส่วนก้นหลอดไว้ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 90x15 ml นำไป

ส่องตรวจหาโอโอไซท์ด้วยกล้อง stereo microscope แล้วนำเอาโอโอไซท์ที่เจาะดูดได้ไปเลี้ยงในหลอดแก้ว โดยใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) โดยคัดเลือกโอโอไซท์คุณภาพดีไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 µl น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon®, Intervet, Netherlands), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 µg/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 20 ชม. แล้วนำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase แล้วคัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว(มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 µg/ml cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 µg/ml Hoecht 33342

3.1.1.3. การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

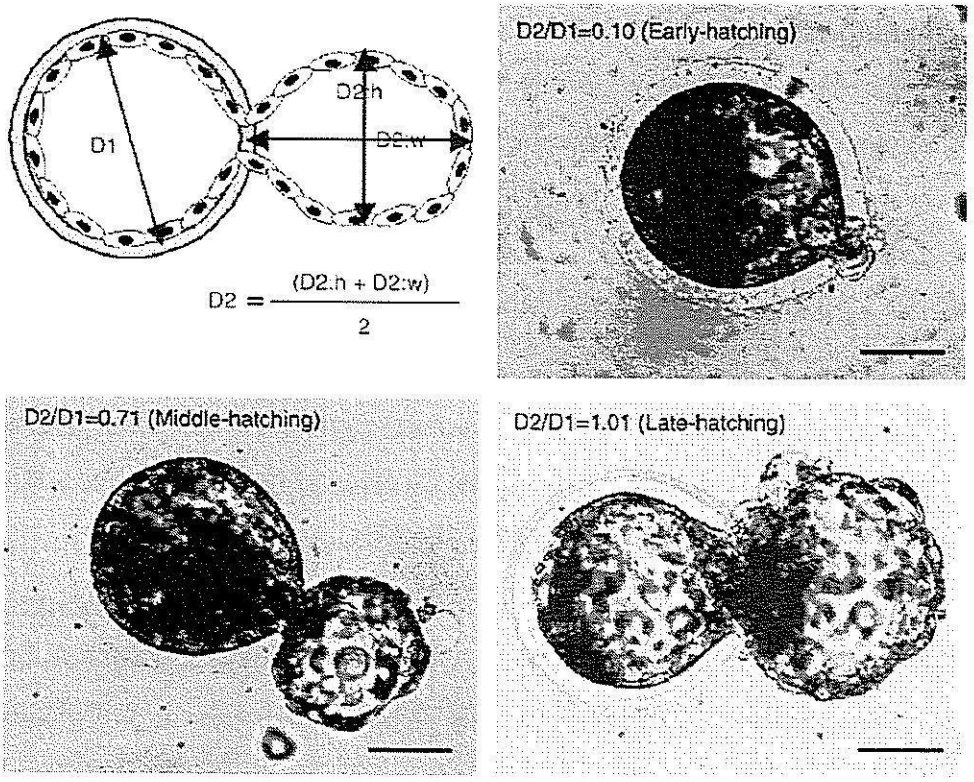
ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space ของไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Electro Cell Fusion จ่ายกระแสไฟ 30V/ใบ ระยะเวลานาน 30 µsec 2 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+20% FCS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา SOFaa (Gardner et al., 1994) +10% FCS ที่มี 10 µg/ml cycloheximide(CH) และ 1.25 µg/ml cytochalasin D (CD) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง

3.1.1.4. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 µl) จากนั้นคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 µl) ทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 µl และเติมน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

3.1.1.5. การคัดเลือกตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst เพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification

ตัวอ่อนโคอายุ 7 วัน เกรด 1 และเกรด 2 ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ถูกนำมาถ่ายภาพ (ภาพที่ 1) และแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแบ่งตามขนาดของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนซึ่งเคลื่อนออกจาก zona pellucida โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางตัวอ่อนที่เคลื่อนออกมาจาก zona pellucida (D2) ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนภายใน zona pellucida (D1) โดยหากผลของ D2/D1 = 0.01-0.70 จัดให้อยู่ในกลุ่ม early-hatching stage; หากผลของ D2/D1 = 0.71–1.00 จัดให้อยู่ในกลุ่ม middle-hatching stage และ หากผลของ D2/D1 = 1.01–1.70 จัดให้อยู่ในกลุ่ม late-hatching stage แต่หากผลของ D2/D1 มากกว่า 1.71 หรือมีคุณภาพต่ำไม่นำมาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 1 Hatching stage ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง A) ตัวอ่อนระยะ early-hatching stage: D2/D1 = 0.01–0.70; B) ตัวอ่อนระยะ middle-hatching stage: D2/D1 = 0.71–1.00; C) ตัวอ่อนระยะ late-hatching stage: D2/D1 = 1.01–1.70; Scale bar = 50 μm.

3.1.1.6. การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี Cryotop

ตัวอ่อนถูกนำไปไว้ในน้ำยา equilibration ซึ่งประกอบด้วย TCM199HEPES + 20% FBS (M199/FBS) ที่มี 10% (v/v) ethylene glycol (EG) + 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา vitrification ซึ่งประกอบด้วย M199/FBS ที่มี

20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose มีและไม่มี 10% (w/v) Ficoll จากนั้นนำตัวอ่อน 1-3 ใบไปวางบนปลายของ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) โดยให้มีน้ำยา vitrification เหลืออยู่บน Cryotop ให้น้อยที่สุด (<1 µl) หลังจากตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification ครบ 30 วินาทีให้นำ Cryotop แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

3.1.1.7. การละลายตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากละลาย

ตัวอ่อนที่แช่แข็งแล้วถูกละลายโดยนำปลาย Cryotop มาแช่ในน้ำยา 0.5 M sucrose ที่ละลายใน M199/FBS ตัวอ่อนอยู่ในน้ำยานี้นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 M sucrose ตามลำดับ น้ำยาละ 5 นาที จากนั้นนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา mSOFaa ที่มี BSA หรือ LAA + BSA (เป็นน้ำยาชนิดเดียวกันที่เลี้ยงตัวอ่อน) และนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 24 ชั่วโมง (1-5 ตัวอ่อนต่อ 100 µl) หลังจากละลายตัวอ่อนแล้วดูทันทีว่ามีลักษณะที่ปกติหรือไม่ และหลังจากเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงต่อมา หากตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตต่อได้แสดงว่าตัวอ่อนรอดจากการแช่แข็ง

3.1.1.8. การย้ายฝากตัวอ่อน

ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งและละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน โดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โค ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและที่เป็นสัดตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดทำได้โดยการฉีด 500 µg ของ $PGF_{2\alpha}$ analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) ตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ไม่ได้แช่แข็งถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับเช่นเดียวกัน (กลุ่มควบคุม) และตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอุลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้องและล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

3.1.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองถูกทำซ้ำอย่างน้อยกลุ่มละ 3 ซ้ำ อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งวิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test ส่วนอัตราการตั้งท้องของแม่ตัวรับใช้ Fisher's exact probability test ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้โปรแกรม StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) ค่าความแตกต่างทางสถิติคิดที่ค่า $P < 0.05$

3.2. การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop

3.2.1. สารเคมี วิธีการโคลนนิ่ง การเลี้ยงตัวอ่อน เหมือนในการทดลองที่ 1

3.2.1.1. การแช่แข็งตัวอ่อน

ตัวอ่อนอายุ 7 และ 8 วัน ที่ระยะ hatching blastocyst เกรด 1 และ 2 จำนวน 1-5 ตัวอ่อน ถูกนำมาใส่ในน้ำยา equilibration solution (7.5% EG + 7.5% DMSO in TCM199 + 20% FBS) นาน 3 นาที และย้ายไปไว้ในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20%FBS) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20% FBS) นาน 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดน้ำยาและตัวอ่อนมาและปล่อยน้ำยา 1-2 µl ที่มีตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง จากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

3.2.1.2. การละลายตัวอ่อน

micro-drop ถูกละลายโดยนำออกมาใส่ในน้ำยา 0.6M sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4M sucrose, 0.2M sucrose และ 0M sucrose ใน TCM199 + 20% FBS นานความเข้มข้นละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C หลังจากละลายแล้วจะสังเกตลักษณะภายนอกของตัวอ่อนว่าปกติหรือไม่ จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาบันทึกผลการทดลองว่ามีตัวอ่อนใบใดบ้างที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3.2.1.3. การย้อมสีตัวอ่อน

หลังจากละลายตัวอ่อนแล้ว 24 ชั่วโมงนำตัวอ่อนที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้มาย่อย zona pellucida ออกโดยแช่ตัวอ่อนใน 0.5% protease และล้างตัวอ่อนที่ย่อย zona pellucida ออกแล้วในน้ำยา mSOFaa จากนั้นนำตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% rabbit anti bovine spleenocytes นาน 45 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement + 75 µg/ml propidium iodide + 100 µg/ml hoechst 33258 นาน 45 นาที แล้วนำตัวอ่อนมาวางบนกระจกสไลด์และปิดทับด้วย glycerol และกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) ภายใต้ fluorescence microscope

3.2.1.4. การย้ายฝากตัวอ่อน

เหมือนในการทดลองที่ 1 โดยตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 และละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนถูกย้ายฝากสู่ตัวรับแบบไม่ผ่าตัด

3.2.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่ง วิเคราะห์โดยการหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA โดยใช้โปรแกรม SAS โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1

ไข่โคที่กำจัดนิวเคลียสออกสำเร็จคิดเป็น 86.4% (1614/1868) และเชื่อมเซลล์ไฟโบรบลาสกับไข่สำเร็จคิดเป็น 85.4% (1136/1330) หลังจากนำตัวอ่อนโคลนนิ่งไปเลี้ยงนาน 7 วัน (ตารางที่ 1) พบว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA (40.7%, 246/604) พัฒนาเข้าสู่ระยะ blastocyst ได้สูงกว่า ($P<0.005$) ในน้ำยาที่ไม่มี LAA (31.8%, 125/393)

อัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งอายุ 7 วันที่ระยะ hatching blastocyst หลังจากแช่แข็งและละลายได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปตัวอ่อนที่รอดหลังจากละลายแล้วเลี้ยงไปแล้ว 24 ชั่วโมงแสดงไว้ในภาพที่ 2 หลังจากแช่แข็งและละลายตัวอ่อนพบว่าไม่มีตัวอ่อนสูญหาย เมื่อนำตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA และนำมาแช่แข็งในน้ำยา vitrification ที่ไม่มี Ficoll พบว่าอัตรารอดหลังจากละลายตัวอ่อนในกลุ่ม early-hatching blastocyst (77%) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม middle-hatching blastocyst และ late-hatching blastocyst (74% และ 80% ตามลำดับ) จากผลการทดลองพบว่า Ficoll ที่เติมลงในน้ำยา vitrification ไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ (54-68%) และพบว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ early-hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA มีความทนทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนระยะ middle-hatching blastocyst และ late-hatching blastocyst

อัตราการตั้งท้องและคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน แสดงในตารางที่ 3 หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงจำนวน 25 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 14 ตัว พบว่าที่ 40 วันหลังจากเป็นสัดมีตัวรับตั้งท้อง 7 ตัว (50%) หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่ได้แช่แข็งจำนวน 37 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 27 ตัว พบว่าตั้งท้องที่ 40 วันจำนวน 11 ตัว (41%) เมื่อตรวจการตั้งท้องที่ 60 วัน พบว่าตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งยังคงตั้งท้องอยู่ 4 ตัว จาก 7 ตัว (29%) และในกลุ่มโคที่ตั้งท้องตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็งพบว่ามียังคงมีโคตั้งท้องอยู่ 7 ตัว จาก 11 ตัว (26%) และมีเพียงลูกโคโคลนนิ่ง 3 ตัว (11%) จากการย้ายฝากตัวอ่อนสดคลอดจากโคตัวรับ 3 ตัว ลูกโคสองตัวตายหลังจากคลอดไม่เกิน 12 ชั่วโมง และมี 1 ตัว (ภาพที่ 3) ที่ยังคงมีชีวิตอยู่

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA

Culture Medium	Enu. (%)	Fused (%)	Cleaved (%)	8-cell (%)	Mor. at D-5	Blast. at D-7
(+) LAA	919/1068 (86.0)	671/782 (85.2)	604/671 (90.0)	485/671 (72.3)	297/604 (49.2)	246/604 (40.7)
(-) LAA	589/691 (85.2)	465/548 (84.7)	393/541 (87.1)	292/451 (64.8)	173/393 (44.0)	125/393 (31.8)

ตารางที่ 2 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย: ผลของ hatching stage ของตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มี LAA และแช่แข็งในน้ำยา vitrification (VS) ที่มี Ficoll

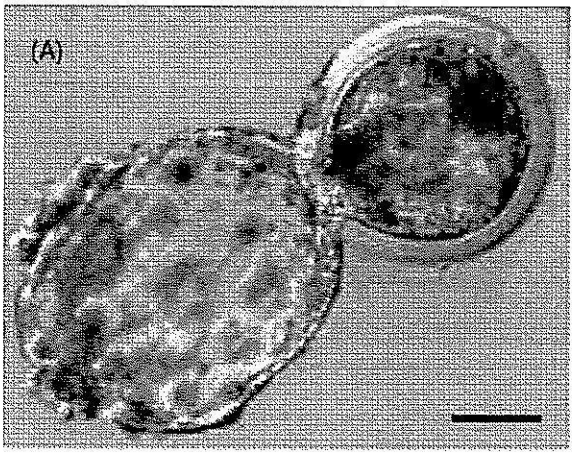
LAA during IVC	Ficoll in VS	No. survived/no. examined (%)			
		Hatching stage			
		Early	Middle	Late	รวม
+	-	23/30 (77)	20/27 (74)	24/30 (80)	67/87 (77)[a]
+	+	23/34 (68)	15/28 (54)	19/32 (59)	57/94 (61)[b]
-	-	15/27 (56)[x]	20/30 (67)[x,y]	28/35 (80)[y]	63/92 (68)[a,b]

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

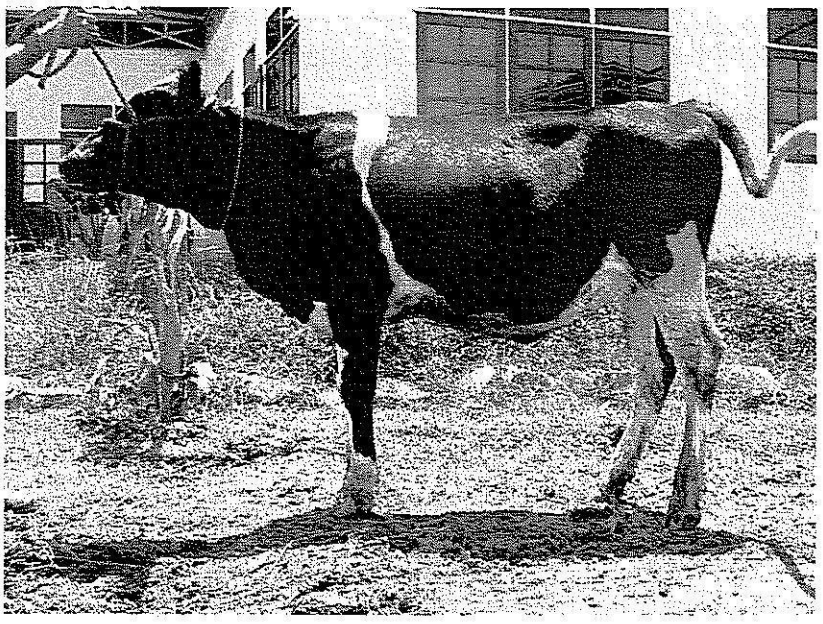
[b]ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$

[x]ภายใน Row เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$

[y]ภายใน Row เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$



ภาพที่ 2 ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน หลังจากแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง Scale bar = 50 μm



ภาพที่ 3 ลูกโคโคลนนิ่งเพศเมียที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด ผลิตจากการใช้เซลล์ใบหูโคนมพันธุ์ดีเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งและตัวอ่อนสด

Groups	No. embryos transferred/recipient females	No. (%) pregnant[a]			
		Day 40	Day 60	Day 120	Full-term
Vitrified	25/14	7 (50)	4 (29)	0 (0)[b]	0 (0)[b]
Fresh control	37/27	11 (41)	7 (26)	5 (19)[c]	3[d] (11)[c]

[a]ตัวรับทุกตัวตั้งท้องลูกตัวเดียว

[b]ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติ $P < 0.05$

[c]ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติ $P < 0.05$

[d]ลูกโค 2 ตัวตายหลังคลอดไม่เกิน 12 ชั่วโมง, ลูกโค 1 ตัวมีชีวิตรอด

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

จากผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้ Cryotop พบว่าให้อัตรารอดสูง ในปัจจุบันมีการคิดค้นอุปกรณ์ที่ใช้เป็นภาชนะสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนและไข่สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยวิธี vitrification หลายชนิด อาทิเช่น electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) OPS (Vajta และคณะ, 1998) nylon loop (Lane และคณะ, 1999) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ซึ่งอุปกรณ์ทั้งหมดออกแบบมาเพื่อทำให้ปริมาณน้ำยา vitrification เหลือน้อยที่สุดก่อนที่จะถูกนำไปไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เกิดการถ่ายเทอุณหภูมิได้เร็วที่สุด มีการศึกษาทดลองเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์หลายชนิด เช่น โคและแกะระยะ morula และ blastocyst (Kelly และคณะ, 2004) ระหว่าง OPS และ Cryotop ตัวอ่อนกระต่ายระยะ pronuclear (Hochi และคณะ, 2004) และไข่ปลาวาพระยะ germinal vesicle (Iwayama และคณะ., 2004) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการใช้ Cryotop ให้อัตรารอดที่ดีกว่า OPS และมีรายงานว่ามีการทดลองใช้ Cryotop ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรในระยะ pre-hatching (Ushijima และคณะ, 2004; Esaki และคณะ, 2004) ไข่และตัวอ่อนมนุษย์ (Hiraoka และคณะ, 2004; Katayama และคณะ, 2003) Kuwayama และ Kato (2000) เป็นนักวิทยาสตร์กลุ่มแรกที่รายงานการใช้ Cryotop ในการแช่แข็ง โดยวิธี vitrification ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant (CPA) ในน้ำยา vitrification ที่น้อยลง (30%) แต่ส่วนประกอบของน้ำยา vitrification ที่ใช้ในการทดลองนี้มีส่วนประกอบเหมือนในการทดลองที่ใช้ OPS คือมี 40% CPA (Vajta และคณะ, 1998)

ขั้นตอนการผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งจะต้องทำให้ zona pellucida เกิดรูเพื่อจะกำจัดนิวเคลียสออกไปทำให้ตัวอ่อนระยะ blastocyst เข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วกว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติ ซึ่งการผลิตตัวอ่อนที่มีการฉีด DNA เข้าไปยัง pronuclear ทำให้ตัวอ่อนเข้าสู่

ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วเช่นเดียวกัน และพบว่าหลังจากแช่แข็งตัวอ่อนที่ zona pellucida ถูกทำให้เปิดอยู่อายุ 7 วัน โดยวิธี conventional freezing และวิธี vitrification พบว่ายังคงได้อัตรารอดที่ดี (Ito และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst อายุ 6 วัน มีความทนทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนอายุ 7 วัน นอกจากนี้มีการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วอายุ 7-8 วัน ระยะ blastocyst ที่มีการเก็บเซลล์ตัวอ่อนออกไปพบว่ามีอัตรารอด 78% (Ito และคณะ, 1999) และ 86% (Vajta และคณะ, 1997) มีการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้วและชะล้างตัวอ่อนจากมดลูกโค ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากที่สุด (Massip, 2001) Kelly และคณะ (2004) รายงานว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคและแกะที่ผลิตในหลอดแก้วโดยใช้ Cryotop และ OPS เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ตัวอ่อนหลังจากละลายสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เพิ่มขึ้นตามอายุของตัวอ่อนที่ถูกนำมาแช่แข็ง Amarnath และคณะ (2004) ได้รายงานว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst อายุ 8 วันที่ถูกนำมาแช่แข็งโดยวิธี conventional freezing สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้สูงกว่าตัวอ่อนระยะ early blastocyst (86% vs 14%) จากผลการทดลองนี้พบว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ early hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA มีอัตรารอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ middle และ late hatching blastocyst ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (56% vs 80%, ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเซลล์ของตัวอ่อนระยะ early hatching blastocyst มีจำนวนน้อยเกินไป

ยังคงมีรายงานเกี่ยวกับผลของการเติม LAA ลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโครยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วว่าสามารถเพิ่มอัตรารอดหลังการแช่แข็งโดยวิธี conventional freezing (Tominaga และคณะ, 2000; Hochi และคณะ, 1999; Imai และคณะ, 1997) ในการทดลองนี้พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในน้ำยาที่มี LAA จะช่วยทำให้ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst มีอัตรารอดมากขึ้น (ตารางที่ 2) การเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วจะไปเหนี่ยวนำให้เกิด intracellular lipid droplets (Yamashita และคณะ, 1999, Abe และคณะ, 2002) ซึ่งส่งผลให้ตัวอ่อนสุกร (Nagashima และคณะ, 1995) และโค (Ushijima และคณะ, 1999) มีความทนทานต่อการแช่แข็งลดน้อยลง นอกจากนี้คุณภาพของตัวอ่อนก็มีส่วนสำคัญที่เป็นสิ่งบ่งบอกถึงการพัฒนาและปริมาณเซลล์ตัวอ่อน ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA ให้คุณภาพตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกัน แต่ LAA จะช่วยให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีขึ้นโดย LAA จะไปดัดแปลงส่วนประกอบของ lipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์เกิดได้ดีขึ้น ทำให้การแช่แข็งมีประสิทธิภาพดีขึ้นเนื่องจากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อย สำหรับในตัวอ่อนสุกรจะมีปริมาณของ lipid droplet ที่สูงในระยะแรกของการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนสุกรมีความทนต่อการแช่แข็งที่ค่อนข้างต่ำ (Nagashima และคณะ, 1995) จากการทดลองของ

Hayashi และคณะ (1989) พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนสุกระยะ expanded และ hatching blastocyst โดยวิธี conventional freezing หลังจากละลายตัวอ่อนสามารถพัฒนาต่อได้

สารเคมีที่เติมในน้ำยา vitrification ทั้งชนิดที่ซึมเข้าเซลล์ได้ และชนิดที่ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ หรือ น้ำตาล เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อน ซึ่งน้ำยา vitrification ชื่อ EFS40 เป็นน้ำยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูถีบจักร, กระต่าย, ม้า, โค, จิงโจ้, สุกร และมนุษย์ โดยเปลี่ยนจากน้ำตาล sucrose เป็น trehalose (Kasai, 1997) บทบาทของ cryoprotectant ชนิดที่ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้หรือสารโมเลกุลใหญ่ที่ใส่ลงในน้ำยา vitrification อาทิเช่น polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, percoll, Ficoll, และ BSA ที่ใส่ลงในน้ำยา vitrification จะช่วยทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะไปเป็นของแข็ง (น้ำแข็งที่ไม่มีผลึกน้ำแข็งอยู่ภายใน) ได้เร็วและดีขึ้น และช่วยลดความเป็นพิษของ cryoprotectant ที่ซึมเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย โดยพบว่า Ficoll-70 มีความเป็นพิษน้อยกว่า polyethylene glycol เมื่อใส่ลงในน้ำยา vitrification ที่มี EG เข้มข้น 40% (Kasai, 1994) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเติม Ficoll-70 ในน้ำยา vitrification ที่มี 20% EG, 20% DMSO และ 0.5M sucrose ไม่สามารถช่วยให้อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst เพิ่มขึ้นได้ ซึ่ง Ficoll อาจจะมีส่วนช่วยเล็กน้อยหรือไม่มีผลทำให้ตัวอ่อนมีอัตรารอดได้มากขึ้นเลย ซึ่งรายงานการใช้ Ficoll พบว่าจะใช้ร่วมกับน้ำยา vitrification ที่มี 30-40% EG หรือ 40-50% glycerol (Kasai, 1997)

ในการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาจนกระทั่งตัวอ่อนพัฒนาจนออกจาก zona pellucida หลังจากละลาย เนื่องจากตัวอ่อนที่ได้จะนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับทั้งที่เป็นโคสาวและแม่โค ซึ่งพบว่าหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งไม่มีโคตัวรับที่ตั้งท้องที่ 120 วัน ซึ่งสาเหตุการตั้งท้องไม่ครบจนกระทั่งคลอดอาจเกิดจากความผิดปกติของการสร้างรกของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง มีการศึกษาพบว่าในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องพบว่าแม่ตัวรับมีอัตราการแท้งที่สูง ซึ่งความผิดปกติที่มีรายงานในลูกโคโคโคลนนิ่งได้แก่ ความผิดปกติของการพัฒนาของรก ลูกโคโคโคลนนิ่งมีขนาดและน้ำหนักที่มากกว่าปกติ (large calf syndrome) ทำให้คลอดยาก และตายหลังคลอด (Cibelli และคณะ, 1998; Hill และคณะ, 1999; Wakayama และ Yanagimachi, 1999; Wells และคณะ, 1999; Hill และคณะ, 1999, 2001) และพบว่ารกของลูกโคโคโคลนนิ่งจะมีปริมาณ Placentome น้อยกว่าปกติและพบว่า Placentome จะมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (Hill และคณะ, 1999) การพัฒนาที่ผิดปกติของรกอาจเกิดจากระบบเส้นเลือดที่ผิดปกติ หรืออิทธิพลของ epigenetic/imprinting gene ที่ผิดปกติ (Young และ Fairburn, 2000) imprinting gene มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต การพัฒนาของตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งรกด้วย ซึ่งมีหลายยีนส์ที่พบว่าเกิดการผ่าเหล่าหรือเกิดความผิดพลาดทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและรกผิดปกติ (Lau และคณะ, 1994; Guillemot และคณะ, 1994; Leighton และคณะ, 1995, 1996) สาเหตุดังกล่าวส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงขนาด

ของอวัยวะภายในที่ผิดปกติไป และเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนในครรภ์ตายและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา (Farin และคณะ, 2001)

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งมีอัตราการตั้งท้องที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลูกโคโคลนนิ่งตัวแรกที่ผ่านการแช่แข็งและถูกย้ายฝากสู่ตัวรับมีการตั้งท้องและคลอดในปี 2003 (Tecirlioglu และคณะ, 2003) Gong และคณะ (2004) รายงานว่าทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน 9 ตัวอ่อน สู่ตัวรับ 9 ตัว พบว่าที่ 60 วันหลังจากย้ายฝากมีตัวรับตั้งท้อง 3 ตัว และได้ลูกโคโคลนนิ่งคลอดออกมา 3 ตัว และทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง 8 ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็งสู่แม่ตัวรับ 8 ตัว พบว่าที่ 60 วันมีตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว และมีลูกโคคลอด 2 ตัว Tecirlioglu และคณะ (2003) ย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ blastocyst ที่ถูกแช่แข็งจำนวน 53 ตัวอ่อนให้กับ 14 ตัวรับ ที่ 40 วันมีโคตัวรับท้อง 6 ตัว และทั้ง 6 ตัวก็ท้องจนคลอดได้ลูกโคโคลนนิ่ง 6 ตัว จากนั้นในการทดลองต่อมา Tecirlioglu และคณะ (2003) ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่ถูกแช่แข็งจำนวน 7 ตัวอ่อนสู่โคตัวรับพบว่าไม่มีโคตัวรับตั้งท้องจนกระทั่งคลอดเลย ซึ่งอัตราการแท้งของตัวอ่อนโคลนนิ่งจะเกิดค่อนข้างสูงในช่วง 3-6 เดือนแรกของการตั้งท้อง ซึ่งยังคงเป็นปัญหาสำหรับการผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในปัจจุบัน

ผลการทดลองที่ 2

ผลแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน โดยวิธี micro-drop แสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยอัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 พบว่าตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มรอดทั้งหมดหลังละลายที่ชั่วโมงที่ 0 ตัวอ่อนหลังจากละลายออกมาจะถูกนำมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS35 มีอัตรารอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 (86% vs 94% ตามลำดับ) แต่หลังจากนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่าง

ตารางที่ 4 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching balstocyst หลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 หรือ VS35

Vitrification solution	Normal morphology and survival rate	
	0 h (%)	24 h (%)
VS33	99/99 (100)	93/99 (94)
VS35	98/98 (100)	84/98 (86)

หลังจากตัวอ่อนถูกละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนบางส่วนจากทั้งสองกลุ่มถูกนำมาย้อม TE และ ICM เพื่อดูจำนวนเซลล์ของตัวอ่อน หลังจากย้อมเซลล์แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนจากน้ำยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราส่วนของจำนวน ICM:TE เซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS35 มีมากว่า VS33 (1:3.9 และ 1:3.2 ตามลำดับ)

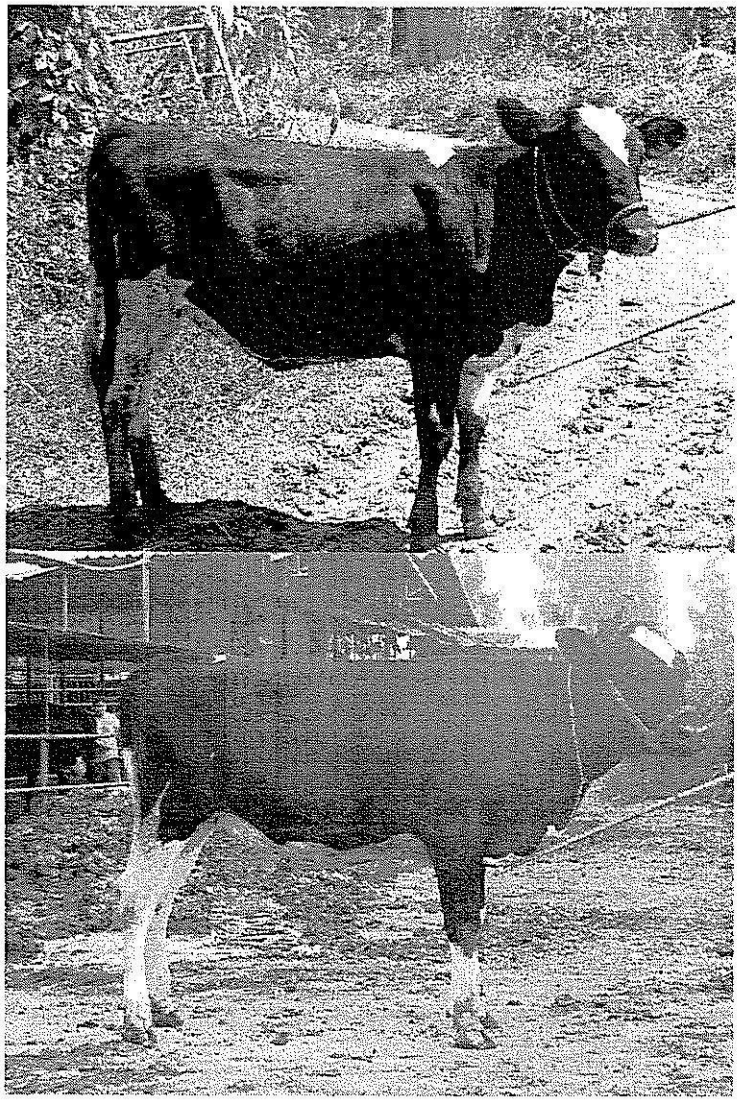
ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ TE และ ICM และอัตราส่วนของ TE และ ICM ของตัวอ่อนโคลนนิ่งโครระยะ hatching blastocyst

Vitrification solution	No. embryos	ICM	TE	ICM : TE	Total cell
VS33	25	31±18	99±41	1:3.2	130±50
VS35	25	26±8	102±28	1:3.9	128±30

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน จำนวน 39 ตัวอ่อนสู่ตัวรับ 19 ตัว พบว่าที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีตัวรับตั้งท้องจำนวน 3 ตัว (15.8%) ตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็งในน้ำยา VS33 จำนวน 30 ตัวอ่อนถูกย้ายฝากสู่ตัวรับ 17 ตัว พบว่ามีตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว (11.8%) (ตารางที่ 6) โดยอัตราการตั้งท้องระหว่างตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โคตัวรับตัวอ่อนสดคลอดลูก 2 ตัว มีสุขภาพแข็งแรง (ภาพที่ 4) ส่วนโคตัวรับตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งหมดทั้ง 2 ตัว

ตารางที่ 6 อัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสดและตัวอ่อนแช่แข็งระยะ hatching blastocyst

Groups	No.embryos transfer/recipient	Pregnancy rate on days 60 (%)	Calving (%)
Fresh control	39/19 (2.0)	3/19 (15.8)	2/19 (10.5)
VS33	30/17 (1.8)	2/17 (11.8)	0/17 (0)



ภาพที่ 4 ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

ปัจจุบันการแช่แข็งตัวอ่อนในโคโดยวิธี vitrification เพื่อการค้ายังไม่แพร่หลายเมื่อเทียบกับการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี conventional freezing (Vajta, 2000) ตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 มีอัตรารอดสูงกว่าในน้ำยา VS35 เนื่องจากน้ำยา VS35 มีความเป็นพิษสูงกว่าน้ำยา VS33 ทำให้ตัวอ่อนมีอัตรารอดน้อยกว่าในกลุ่ม VS33 ซึ่งอัตรารอดของตัวอ่อนในการทดลองนี้สูงกว่าการแช่แข็งโดยใช้ OPS (Kelly และคณะ, 2004) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตรารอดของตัวอ่อนนอกจากชนิดและความเป็นพิษของ cryoprotectant แล้ว อุณหภูมิขณะทำการทดลอง ชนิดของน้ำตาลที่ใส่ในน้ำยาแช่แข็ง ระยะของตัวอ่อน รวมทั้งเทคนิคที่ใช้ทำล้วนมีผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งทั้งสิ้น (Seidel, 2006) การทดลองนี้ได้นำตัวอ่อนในน้ำยา VS33 และ VS35 เพื่อศึกษาผลกระทบจากความเป็นพิษของ

cryoprotectant ในน้ำยา VS35 ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าน้ำยา VS33 ทำให้ปริมาณของ cryoprotectant มีโอกาสเข้าสู่ภายในเซลล์ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่อยู่ใน VS35 มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแบบ micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 จะให้อัตรารอดหลังละลายไม่แตกต่างกันที่ 24 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อน (94% และ 86% ตามลำดับ) แสดงว่าความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในVS33 และ VS35 ไม่มีผลต่อกระทบต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังจากละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง รวมทั้งไม่มีผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ hatching blastocyst อีกด้วย

ในการทดลองนี้ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่แช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็ง เพื่อศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งต่ออัตราการตั้งท้อง จากการทดลองนี้พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งสู่ตัวรับไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องเมื่อเทียบกับตัวอ่อนสด ในปี 1997 มีการทดลองย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification และ conventional freezing ให้ตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (van Wagtendonk-de Leeuw และคณะ, 1997) ในปี 2002 Lopatarova และคณะ ทดลองชะล้างตัวอ่อนจากโคตัวให้ออกมาเพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ OPS และ conventional freezing จากผลการทดลองพบว่า อัตรารอดของตัวอ่อนจากการแช่แข็งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (OPS: 92.9% และ conventional freezing: 91.1%) โดยมีอัตรารอดใกล้เคียงกับการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่โคตัวรับพบว่าจะมีอัตราการแท้งที่ค่อนข้างสูงในช่วง 3 เดือนแรกซึ่งมักจะมีความผิดปกติที่เกิดจากการขบวนการ reprogramming ทำให้การแสดงออกของ gene ต่างๆ ผิดปกติซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งและตายหลังคลอดของลูกโคโคลนนิ่ง (Li และคณะ, 1992; Okano และคณะ, 1999; First และคณะ, 2002) การพัฒนาของรกของลูกอ่อนโคลนนิ่งจะช้ากว่ารกของลูกอ่อนตามธรรมชาติ และมีปริมาณเนื้อเยื่อ cuboidal chorionic epithelium น้อยกว่าปกติเป็นสาเหตุให้การสร้างระบบหลอดเลือดและสายสะดือที่เชื่อมจากแม่ไปลูกพัฒนาได้ไม่ดี ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและการแลกเปลี่ยนของเสียระหว่างแม่และลูกเกิดได้ไม่ดี ส่งผลให้ตัวอ่อนขาดอาหารและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา นอกจากนี้หากขนาดของ placentome เล็กจะส่งผลให้มีพื้นที่สัมผัสการส่งผ่านของอาหารและของเสียเกิดได้น้อย หากปริมาณของ placentome มีน้อยจะทำให้การส่งผ่านของฮอร์โมนและ growth factor ชนิดต่างๆ เช่น IGFs (insulin-like growth factors) ลดน้อยลง ซึ่งมีผลต่อขนาดของรก แต่ถ้ามีการแสดงออกในปริมาณมากจะทำให้รกมีขนาดและน้ำหนักมากผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000) นอกจากนี้พบว่า 30-40% ของลูกโคโคลนนิ่งจะมีขนาดและน้ำหนักตัวที่โตผิดปกติที่เรียกว่า large offspring syndrome (LOS) หรือ large calf syndrome (LCS) (Bondioli และคณะ, 1990; Keefer และคณะ, 1994; Wilson และคณะ, 1995) ซึ่งโรคนี้ไม่เกิดขึ้นในสัตว์ทุกชนิด

แต่จะพบบ่อยในโคโคลนนิ่ง สาเหตุการเกิดโรคนี้อาจเกิดจากความผิดปกติของ epigenetic ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรกที่ผิดปกติทำให้ลูกอ่อนเกิดความผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000; De Sousa และคณะ, 2001) ลูกโคที่เป็น LOS มักจะเกิดปัญหาการคลอดยาก (dystocia) จึงต้องช่วยคลอดหรือผ่าตัดทำคลอด (Cesarean section) ส่วนใหญ่ลูกโคที่เป็นโรคนี้มักจะตายระหว่างคลอดหรือหลังคลอด จึงจำเป็นต้องมีการดูแลอย่างใกล้ชิดหลังคลอด เนื่องจากลูกโคโคลนนิ่งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการตายหลังคลอดสูงถึง 9-50% นอกจากนี้พบว่าจะมีการตอบสนองต่อการดูดนม (suckling reflex) ต่ำทำให้ลูกโคได้รับนมน้ำเหลืองในปริมาณไม่เพียงพอ และมักจะมีปัญหาเกี่ยวกับ ขบวนการ metabolism และ respiratory acidosis มีระดับ insulin ในเลือดสูง มีลักษณะ hypothyroidism ขนาดของ thyroid grand มีขนาดโตผิดปกติ เกิดภาวะ hypoxemia, hypoglycemia, lung fibrosis, ตับแข็ง (First และคณะ, 2002)

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า

1. การแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี LAA มีความทนทานต่อขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยขึ้นอยู่กับขนาดของ hatching stage และ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตรารอดหลังการแช่แข็งและละลาย และสามารถผลิตลูกโคพันธุ์ดีเพศเมียจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสด

2. การแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ในน้ำยา VS33 และ VS35 ตัวอ่อนมีอัตรารอดหลังละลายสูง และการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องที่ 60 วัน หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่ตัวรับ แต่มีเฉพาะตัวรับที่ฝากตัวอ่อนสดเท่านั้นที่สามารถคลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวรับที่ฝากตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งทั้งหมด

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมียจากการทำโคลนนิ่งได้ แต่อัตราความสำเร็จยังต่ำ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงเทคนิคการทำโคลนนิ่ง เพื่อทำให้ตัวอ่อนที่ผลิตได้มีการ reprogramming ได้ดีขึ้น และไม่มีความผิดปกติทางด้าน gene expression และควรทำการทดลองเพิ่มเติมในเรื่องของการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวนมาก เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถผลิตลูกโคได้จากการทดลองดังกล่าวนี้

2. การแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification จากการทดลองนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดี จึงควรนำไปประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธี *in vivo* หรือ *in vitro* fertilization และควรทำการทดลองเพิ่มเติมในเรื่องของการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวนมาก เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถผลิตลูกโคได้จากการแช่แข็งด้วยวิธีนี้

3. ควรมีการทำธนาคารเซลล์ร่างกายโคนมพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง เพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543a. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์.** 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. pp. 79-85.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543b. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์** 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.** 61: 57–66.

Amarnath, D., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2004. Cryopreservation of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts: effect of developmental stage. **J. Reprod. Dev** 50: 593–598.

Bondioli, K.R., Westhusin, M.E., Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. **Theriogenology** 22: 165-174.

Bondioli, K.R. 1993. Nuclear transfer in cattle. **Mol. Reprod. Dev.** 36: 274-275.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256-1258.

De Sousa, P.A., King, T., Harkness, L., Young, L.E., Walker, S.K., Wilmut, I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placenta. **Biol. Reprod.** 65: 23-30.

Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., Ushijima, H., Kuwayama, M. Nagashima, H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. **Biol. Reprod.** 71: 432–437.

Farin, P.W., Crosier, A.E., Farin, C.E. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology** 55: 151–170.

First, N.L., Beyhan, Z., Ambroggio, J.D. 2002. **Principles of cloning**; In "Chapter 19 Cloning of cattle" ;Eds: Cibelli, J., Lanza, R.P., Campbell, K.H.S., West, M.D.; Academic Press, pp 375-390.

Gardner, D.K., Lane, M. and Batt, P. 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.

Gong, G., Dai, Y., Fan, B., Zhu, H., Zhu, S., Wang, H., Wang, L., Tang, B., Li, R., Wan, R., Liu, Y., Huang, Y., Zhang, L., Sun, X., Li, N. 2004. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. **Mol. Reprod. Dev.** 69:278–288.

Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., Joyner, A.L. 1994. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. **Nature** 371:333–336.

Hayashi, S., Kobayashi, K., Mizuno, J., Saitoh, K., Hirano, S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. **Vet. Rec.** 125:43–44.

Hill, J.R., Roussel, A.J., Edwards, J.F., Thompson, J.A., Cibelli, J.B. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology** 51: 1451–1465.

Hill, J.H., Burghardt, R.C., Jones, K., Long, C.R., Looney, C.R., Shin, T., Spencer, T.E., Thompson, J.A., Winger, Q.A., Westhusin, M.E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.** 63: 1787-1794.

Hill, J.R., Edwards, J.F., Sawyer, N., Blackwell, C., Cibelli, J.B. 2001. Placental anomalies in a viable cloned calf. **Cloning** 3: 83-88.

Hiraoka, K., Hiraoka, K., Kinutani, M., Kinutani, K. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Hum. Reprod.** 19: 2884–2888.

Hochi, S., Kanamori, A., Sugisawa, K., Kimura, K., Hanada, A. 1999. Effect of linoleic acid–albumin in the IVM and IVF media on survival of frozen-thawed pronuclear bovine zygotes. **J. Mamm. Ova Res.** 16: 19–22.

Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M., Hirao, M. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. **Theriogenology** 61: 267–75.

Illmensee, K. and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell** 23: 9-18.

Imai, K., Kobayashi, S., Goto, Y., Dochi, O., Shimohira, I. 1997. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology** 47: 347 (abstract).

Ito, K., Otake, S., Hirabayashi, M., Hochi, S., Ueda, M. 1998. Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. **Theriogenology** 50: 1093–1100.

Ito, K., Sekimoto, A., Hirabayashi, M., Hochi, S., Kimura, K., Ueda, M., Nagao, Y. 1999. Effect of time interval between biopsy and vitrification on survival of in vitro-produced bovine blastocysts. **J. Reprod. Dev.** 45: 351–355.

Iwayama, H., Hochi, S., Kato, M., Hirabayashi, M., Kuwayama, M., Ishikawa, H., Ohsumi, S., Fukui, Y. 2004. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (Balaenoptera bonaerensis) oocytes at germinal vesicle-stage. **Zygote** 12: 333–338.

Kasai M. 1997. Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. **J. Mamm. Ova Res.** 14: 17–28.

Kasai, M. 1994. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Mori T, Aono T, Tominaga T, Hiroi M, editors. **Perspectives on assisted reproduction frontiers in endocrinology**, 4. Roma, Italy: Ares-Serono Symposia Publications; p. 481–487.

Katayama, K.P., Stehlik, J., Kuwayama, M., Osamu, K., Stehlik, E. 2003. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. **Fertil. Steril.** 80: 223–224.

Keefer, C.L., Slice, S.L., Matthews, D.L. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. **Biol. Reprod.** 50: 935-939.

Kelly, J.M., Kleemann, D.O., Kuwayama, M., Walker, S.K. 2004. Vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. **Reprod. Fertil. Dev.** 16:172–173 (abstract).

Kuwayama, M. and Kato, O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J. Assist. Reprod. Genet.** 17: 477 (abstract).

Lane, M., Schoolcraft, W.B., Gardner, D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloopcontainer-less technique. **Fertil. Steril.** 72: 1073-1078.

Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., Stewart, C.L. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes Dev.** 8: 2953–2963.

Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., Tilghman, S.M. 1995. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. **Nature** 375: 34–39.

Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S., Tilghman, S.M. 1996. Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. **Biol. Reprod.** 54: 273–278.

Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell** 69:9 15–926.

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

Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. **Biol. Reprod.** 54: 1059–1069.

Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Anim.** 36: 49–55.

Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R.J., Grupen, C.G., Nottle, M. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature** 374: 416.

Nguyen, B.X., Sotomaru, Y., Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2000. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. **Theriogenology** 53: 1439–1448.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 99: 247–257.

Prather, R.S., Barnes, F.L., Sim, M.M., Robl, J.M. Eystone, W.H. and First, N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol. Reprod.** 37: 859-866.

Prather, R.S., Sim, M.M. and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol. Reprod.** 41: 414-418.

Seidel, G.E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology** 65: 228-235.

Seidel, G.E. 1995. Sexing, bisection and cloning embryo: perspectives and applications to animal breeding. In: **Proc. of Symposium on Reproduction and Animal Breeding,** Milan, pp. 147-154.

Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. **Biol. Reprod.** 48: 715-719.

Tecirlioglu, R.T., French, A.J., Lewis, I.M., Vajta, G., Korfiatis, N.A., Hall, V.J., Ruddock, N.T., Cooney, M.A., Trounson, A.O. 2003. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reprod. Fertil. Dev.** 15: 361–366.

Tominaga, K., Hamada, Y., Yabuue, T., Ariyoshi, T. 2000. Effect of linoleic acid–albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. **J. Vet. Med. Sci** 62: 465–467.

Ushijima, H., Yoshioka, H., Esaki, R., Takahashi, K., Kuwayama, M., Nakane, T., Nagashima, H. 2004. Improved survival of vitrified n vivo-derived porcine embryos. **J. Reprod. Dev.** 50: 481–486.

Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H. 1999. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biol. Reprod.** 60: 535–539.

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

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification:a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** 51: 53–58.

Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci** . 60–61: 357–64.

Vignon, X., LeBourthis, D., Chesne, P., Marchal, J., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. **Thariogenology** 51: 216.

van Wagtendonk-de Leeuw, A.M., den Dass, J.H.G., Rall, W.F. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology** 48: 1071–1084.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. **Nat. Genet.** 22: 127-128.

Wells, D.N., Misca, P.M., Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol. Reprod.** 60: 996-1005.

Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature** 320: 63-65.

Wilson, J.M., Williams, J.D., Bondioli, K.R., Looney, C.R., Westhusin, M.E., McCalla, D.F. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.** 38: 73–83.

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

Yamashita, S., Abe, H., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. 1999. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts and their improved viability after freezing and thawing. **Cytotechnology** 31: 1–9.

Young, L.E. and Fairburn, H.R. 2000. Improving the safety of embryo technologies; possible role of genomic imprinting. **Theriogenology** 53: 627–648.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. **J. Reprod. Fert.** 115: 325-331.

http://www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db_directory/ruminant/lg_rum/cattle/cattle_braman.htm

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

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 องเมือง จ.นครราชสีมา

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 อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร 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

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. 20010**. 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. 2009.** 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.** 2009. 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. *Fertility and Sterility* 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.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Cloning of pig embryo by using ear fibroblasts and tail muscle cells as donor nuclei : Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo. *Thai J. Agri. Sci.* 34: 187-194.

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.

7.2. 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 สม สวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. การย้ายฝากตัวอ่อน (E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.

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

7.3. นำเสนอในการประชุมนานาชาติ

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. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Masstricht, The Netherlands, 9-11 January, 2000. Published in *Theriogenology* 53: 239.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction.* Stockholm, Sweden, 2-6 July 2000, Abstracts Volume 2: 241.

Parnpai, R., Chuangsoongneon, U. and Kamonpatana, M. 1991. Assessment of optimum time for acrosome reaction in swamp buffalo frozen semen. *Proceeding of the 3rd World Buffalo Congress*, Varna, 17-19 May, 1991.

Parnpai, R. and Kamonpatana, M. 1990. Swamp buffalo oocyte maturation in vitro: The optimum assessment using 199 media supplement with FSH, 17β-estradiol, fetal calf serum and oestrus

cow serum. *Proceeding of the 5th AAAP Animal Science Congress*, Taipei, Taiwan, 27May -1 June, Vol. III, p. 223.

Parnpai, R., Sophon, S. and Kamonpatana, M. 1987. Short period storage of mouse embryo. *Proceeding of the 4th AAAP Animal Science Congress*, Hamilton, New Zealand, 1-6 February, 1987, p. 261.

Parnpai, R., Intarachote, P., Sophon, S., Wattanodorn, P., Kurdchuchurn, P., Tantrakul, S., Suwankumjaya, T., Srisakwatana, K. and Kamonpatana, M. 1986. Embryo transfer of dairy crossbred cows in tropical environment. *Paper Presented to International Symposium on Modern Advance in Animal Reproduction,* Bangkok, 20-23October, 1986.

Parnpai, R. and Kamonpatana, K. 1989. Optimization of culture media supplement with FSH, 17β-estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum in vitro oocyte maturation of swamp buffaloes. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29November, 1989, p. IV-3.

Prongcharoen, M., Chewataworn, S., Chumrasboon, C., **Parnpai, R.**, and Kamonpatana, M. 1989. Surgical embryo transfer in goat: Effect of breeds on superovulatory response. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-4.

Sridech, P., Suwankumjaya, T., **Parnpai, R.**, Meebumroong, K., Intarachote, P. and Kamonpatana, M. 1989. Reciprocal embryo transfer between beef and dairy cattle: Using beef cattle as donor and dairy cattle as recipient. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-3.

7.4. นำเสนอในการประชุมระดับชาติ

Srirattana K., Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Devahudi R., Sangmalee A., Tunwattana W., Somsa W., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of cloned cattle embryos and inter-species cloned gaur embryos. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 10-16.

Laowtammathron C., Srirattana K., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Davahudee R., Thongprapai T. Chaimongkol C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Birth of cloned calves after

transferred frozen embryos using drop vitrified technique. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 99-105.

Liang Y.Y., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Ye D.N., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of chemical activation treatments on the development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 78-86.

Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Davahudee R., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of donor cell source on development and quality of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 87-94.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sangmalee A., Srirattana K., Laowtammathron C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2008. Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* p. 292-297.

Thumanu K., Tanthanuch W., Lorthongpanich C. and Parnpai R. 2008. Comparison between synchrotron infrared microspectroscopic mappings and focal plane array imaging of mouse blastocyst. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 131.

Rattanasuk S., Parnpai R. and Ketudat-Cairns M. 2008. Comparison of primers used for bovine sex determination. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 184.

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทอง พานิชย์ 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 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 85-90.

Imsoonthomruksa, 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.** 2008. Oct4 expression in cloned embryo of endangered feline family. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 344-348.

Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthomruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2008. Evaluation of activation treatments of bovine oocyte after intracytoplasmic sperm injection. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008, Khon Kaen, Thailand, p. 349-352.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., Chan, A.W.S. and **Parnpai, P.** 2008. Supplemented compound enhances success rate of ES cell establishment from single blastomere. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 340-343.

Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Birth of cloned goats by somatic cell nuclear transfer : Possibility of endangered mountain goat conservation. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 332-335.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development and telomerase activity of gaur embryos derived from inter–species somatic cell nuclear transfer. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 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

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Srirattana, K., Sangsritavong, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Production of sexed bovine embryos by *in vitro* fertilization. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 7

Imsoontronruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of hatching stage on cryosurvival of cloned domestic cat blastocyst after vitrification. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 59.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Sripunya, N., Thangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน 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. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ 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. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนควายโคลนนิ่งหลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี 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. การโคลนนิ่ง

ข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบ. *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. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร 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.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 86-89.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 79-85.

8.5. 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" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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. การจดสิทธิบัติ

13.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คม สัน ภายเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช "อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์" ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัติเมื่อเดือนเมษายน 2550

13.2. 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