รหัสโครงการ SUT3-304-57-24-12

รายงานการวิจัย

การสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ผิวหนังมนุษย์โดยปราศจากไวรัสโดยใช้ 5-Azacytidine และ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

The establishment of Virus-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from human fibroblast using 5-Azacytidine and *Oct4* over expression

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-57-24-12

รายงานการวิจัย

การสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ผิวหนังมนุษย์โดยปราศจากไวรัสโดยใช้ 5-Azacytidine และ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

The establishment of Virus-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from human fibroblast using 5-Azacytidine and *Oct4* over expression

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. ดร.มารินา เกตุทัต คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2558 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยนี้ดำเนินไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกในการรับบริจาคชิ้นเนื้อผิวหนังจากผู้บริจาคเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

.....

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

หัวหน้าโครงการ

สิงหาคม 2559

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันวิทยาการและการวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดเป็นที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (induced pluripotent stem cell; iPSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพสูงคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cell; ESCs) ในด้านความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ได้ทุกส่วน นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* proliferation) ได้ไม่จำกัด สามารถคงสภาพของตัวเอง (self renewal) แต่การได้มาซึ่งเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีความโดดเด่นมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ตรงที่สามารถสร้างได้จากเซลล์ร่างกายซึ่งแตกต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ต้องอาศัยกระบวนการแยกเอาเซลล์มาจากตัวอ่อนมนุษย์ในระยะบลาสโตซีสต์เท่านั้น ซึ่งมีผลต่อให้เกิดความเสี่ยงและขัดแย้งต่อหลักจริยธรรมได้ อย่างไรก็ตามการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจำเป็นต้องมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ของยีน ได้แก่ *Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, และ *c-Myc* ซึ่งถูกค้นพบโดย Takahashi และ Yamanaka ในปี ค.ศ. 2006 โดยใช้ Retrovirus ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามยังมีความกังวลถึงผลจากการเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง 4 โดยเฉพาะ *Klf-4* และ *c-Myc* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการของเซลล์มะเร็งและความเสี่ยงที่เกิดจากการใช้ไวรัสในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการทดสอบกระบวนการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ โดยลดการใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ให้เหลือเพียงแค่ยีน *Oct4* เพียงยีนเดียวเท่านั้น โดยใช้วิธีที่ไม่ใช้ไวรัสในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ ร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine ซึ่งเป็นสารควบคุมการแสดงออกเหนือยีน (epigentic modifier reagent) ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine สามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ (cell morphology) และการตรวจสอบคุณสมบัติบัติของเซลล์ด้วยกระบวนการต่างๆ อย่างไรก็ตามยังพบความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ อันเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนที่ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกที่มากเกินไปของยีน *Oct4* จาก plasmid ที่นำส่งยีน

อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนที่สร้างได้ในการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาผลกระทบของยีน *Oct4* ต่อความผิดปกติของเซลล์และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการฝึกเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ดีได้เนื่องจากมีความคงสภาพสูงมาก และเป็นแนวทางในการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่มีประสิทธิภาพและเพิ่มความปลอดภัยในการนำเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในอนาคต

Abstract

In present, stem cell research and technology is widely approved globally and also in Thailand. Induced pluripotent stem cells or iPSCs is a pluripotent cell similarly to embryonic stem cells (ESCs). It has potential to differentiate into many cell type of human body. Moreover, iPSCs are self-renew cell and limitless *in vitro* proliferation. The outstanding point of iPSCs comparing with ESCs is it can be generated from adult somatic cell. However, ESCs establishment need to sacrifice human embryo at blastocyst stage which may rise ethical controversial. However, iPSCs generation require overexpressing of 4 reprograming genes (*Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, and *c-Myc*) which the first discovered by Takahashi and Yamanaka in 2006 by using retrovirus as a vector. Because of concerning of 4 genes overexpression especially *KLF-4* and *c-Myc* which are oncogene and viral vector using, this research aimed to produce viral free iPSCs by reduced 4 reprograminggenes to only *Oct4* together with 5-Azacytidine (epigenetic modifier regent). To test the possibility of single reprogramming gene viral free iPSCs generation methods.

The results from this study indicated that the use of 5-Azacytidine combined with over expression of *Oct4* gene showed ability to generate human iPS like colonies and other ESCs properties. iPSCs characterization methods demonstrated the chromosomal abnormality with may occurred from the over expression of *Oct4* in the plasmid. However, human fibroblast derived iPSCs in this study may provide the alternative protocol to produce stem cells for the future therapeutic use.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 เอกสารอ้างอิง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
3.1 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	8
3.2 การทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์	8
3.3 การทดลองที่ 2 การเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วย 5-Azacytidine และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*	8
3.4 การทดลองที่ 3 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน	9
3.4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะการแสดงออกของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase	9
3.4.2 Immunocytochemistry	9
3.4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี (RT-qPCR)	9
3.4.4 การเปลี่ยนสภาพเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนให้เป็น Embryoid body	10
3.4.5 การสร้างก้อนเนื้องอก (teratoma formation) ในหนู nude เมาส์	11
3.4.6 การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยวิธี G banding Karyotyping	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	13
4.1 ผลการทดลอง	13
4.1.1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์และการเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อน	13

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.1.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ alkaline phosphates	14
4.1.3 การทดสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*	16
4.1.4 การทดสอบความสามารถในการแปลสภาพของเซลล์ในร่างกายสัตว์ทดลองด้วยวิธี Teratoma formation	17
4.1.5 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะของโครโมโซม (Karyotyping)	18
4.2 ข้อวิจารณ์	19
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก ก	
ประวัติผู้วิจัย	25
ประวัติผู้ร่วมวิจัย	35

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

เรื่อง หน้า

ตารางที่ 1 แสดงไพเมอร์ของยีนต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย 12

ภาพที่ 2 แสดงการพัฒนาของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ให้ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ด้วย 5-Azacytidineและการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ด้วย plasmid ที่มียีน pCAG_*Oct4* 14

ภาพที่ 3 แสดงการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน 14

ภาพที่ 4 แสดงการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ 15

ภาพที่ 5 แสดงการแสดงออกของยีน *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*, *Tert*, และ *mOct4* ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของ *Oct4* 16

ภาพที่ 6 แสดงการทดสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* 17

ภาพที่ 7 แสดงการทดสอบความสามารถในการแปลสภาพของเซลล์ในร่างกายสัตว์ทดลองด้วยวิธี Teratoma formation 18

ภาพที่ 8 แสดงผล G banding karyotyping ของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกด้วยยีน *Oct4* 19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันวิทยาการและการวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดเป็นที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells: ESCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพสูงมาก มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ได้ทุกส่วน (Thomson et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* proliferation) ได้ไม่จำกัด สามารถคงสภาพของตัวเอง (self-renewal) และเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดอื่นๆได้ (Pluripotent) เมื่อถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) จากคุณสมบัติพื้นฐานดังกล่าวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ทำให้มีการศึกษาทดลองอย่างมากเกี่ยวกับเซลล์ประเภทนี้ แต่อย่างไรก็ตามการสกัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จำเป็นต้องทำลายตัวอ่อนทำให้การนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มาศึกษาหรือใช้ในการรักษาซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับทางจริยธรรม ดังนั้นในปี พ.ศ. 2551 จึงมีการค้นพบวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ (human fibroblast) ให้กลายเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human induced-pluripotent stem cells; iPSCs) ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ทุกประเภทในร่างกายมนุษย์ได้

ในปัจจุบันเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (induced pluripotent stem cells, iPSCs) นิยมสร้างโดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญในการคงสภาพเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ 4 ยีน (*Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, และ *c-Myc*) ลงไปในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Takahashi et al., 2007) จากการค้นพบนี้นำมาซึ่งโอกาสในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (iPSCs) ที่เฉพาะต่อบุคคล/ผู้ป่วย ทำให้ไม่จำเป็นต้องทำลายตัวอ่อนมนุษย์และลดอันตรายหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดจากการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกัน (Graft-Versus-Host Disease) เมื่อต้องการปลูกถ่ายเซลล์เข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย แต่อย่างไรก็ตามการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (iPSCs) นั้นจำเป็นต้องมีการนำยีนหรือเพิ่มการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ ซึ่งยีนบางยีนมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดเซลล์มะเร็ง (oncogene) เช่น *Klf-4* และ *c-Myc* อีกทั้งวิธีการนำยีนเข้าสู่เซลล์เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนนั้นมักนิยมใช้ไวรัสเป็นเครื่องมือในการนำยีนเข้าไปแสดงออกในเซลล์ที่ต้องการแปลงสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ซึ่งอาจทำให้เกิดความไม่มั่นใจด้านความปลอดภัยในการใช้เซลล์เหล่านั้นเพื่อการรักษาผู้ป่วยในอนาคต

จากการศึกษาพบว่ายีน *Oct4* เป็นยีนที่มีความสำคัญมากที่สุดในการควบคุมการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน การไม่แสดงออกของยีนนี้ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนและทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเสื่อมสภาพและเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (Ding et al., 2011; Sterneckert et al., 2012)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้ 5-Azacytidine ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกเหนือพันธุกรรม (epigenetic modifier) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ (Huangfu et al., 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ผิวหนังมนุษย์ด้วยวิธีการปราศจากไวรัสแต่จะใช้ plasmid ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าแทน โดยจะทำการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* เพียงยีนเดียวร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine เพื่อสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ใช้การดัดแปลงพันธุกรรมน้อย และนำไปสู่การสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปลอดภัยเพื่อใช้ในการรักษาโรคในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อศึกษาวิธีการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพื่อใช้ในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

1.2.2. พัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้ 5-Azacytidine และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

1.2.3. เพื่อทดสอบศักยภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 ทำการศึกษาวิธีการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพื่อใช้ในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในห้องทดลอง

1.3.2 ทำการพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้ 5-Azacytidine และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

1.3.3 ทำการศึกษาและทดสอบศักยภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้จากการใช้ 5-Azacytidine และ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

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

ในปัจจุบันการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนยังใช้วิธีการที่ไม่เหมะสมกับการนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการรักษาเนื่องจากมีการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์โดยการใส่ยีนเข้าไปหลายยีนและพบว่าบางยีนที่ใส่เข้าไปมีความเกี่ยวข้องกับยีนที่กระตุ้นการสร้างเซลล์มะเร็ง (oncogene) อีกทั้งการใช้ไวรัสในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดความกังวลในเรื่องของการก่อให้เกิดโรคในอนาคต

การลดการดัดแปลงพันธุกรรมให้น้อยที่สุดและการใช้วิธีอื่นที่นอกเหนือจากไวรัสจะทำให้การนำเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาใช้ในผู้ป่วยมีความปลอดภัยมากขึ้น เพราะเซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูงเทียบเท่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ของร่างกายมนุษย์ได้ทุกชนิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นอกจากนี้ยังสามารถสร้างมาจากเนื้อเยื่อที่ง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง เช่น เนื้อเยื่อผิวหนัง จึงทำให้สามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีศักยภาพสูงและมีความจำเพาะต่อผู้ป่วยแต่ละคน ซึ่งจะช่วยลดการเกิดการต่อต้านเนื้อเยื่อหลังการปลูกถ่ายได้อีกด้วย

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลองคือทราบกระบวนการ, สารเคมี และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ จากเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์ โดยใช้การเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* และ 5-Azacytidine สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ หรือมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

1.6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

นำเสนอผลงานวิจัยและจัดการประชุมเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยโดยจัดที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี-สุรนารี อีกทั้งร่วมกับคณะแพทยศาสตร์และโรงพยาบาลที่สนใจสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยวิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นเพื่อผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ลดการดัดแปลงพันธุกรรมและมีคุณภาพสูง เพื่อใช้ในการวิจัยการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มาจากผู้ป่วยโรคต่างๆ (patient specific iPSCs) เพื่อใช้ศึกษากลไกการเกิดพยาธิสภาพ (disease modeling) และเป็นต้นแบบในการทดสอบยา (drug screening) ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันวิทยาการและการวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดเป็นที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เป็นเซลล์ที่มีศักยภาพสูงมาก มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ได้ทุกส่วน (Thomson et al., 1998) โดยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ถูกแยกออกมาครั้งแรกจากตัวอ่อนมนุษย์ระยะบลาสโตซิสต์(blastocyst) ที่เหลือจากคลีนิกรักษาผู้มีบุตรยาก (Thomson et al., 1998) จากการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มีคุณสมบัติพิเศษคือมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ สามารถคงสภาพของตัวเอง และเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดอื่นๆได้เป็นอย่างดีเมื่อถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) จากคุณสมบัติพื้นฐานดังกล่าวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ทำให้มีการศึกษาทดลองอย่างมากเกี่ยวกับเซลล์ประเภทนี้ โดยเฉพาะการใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนมนุษย์ในระยะแรกเริ่มผ่านกระบวนการเหนี่ยวนำภายในห้องทดลอง ซึ่งจะแสดงลำดับการพัฒนาคล้ายกับเหตุการณ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตในระยะแกสตรูเลชัน (gastrulation) และการสร้างเนื้อเยื่อจำเพาะชนิดต่างๆ นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์สามารถใช้เป็นเครื่องมือเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนหนึ่ง ๆ ที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เมื่อยีนนั้นมีการแสดงออกที่ผิดปกติ (monogenic disorder) แต่อย่างไรก็ตามการสกัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากตัวอ่อนมนุษย์จำเป็นต้องทำลายตัวอ่อนซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับทางจริยธรรม

ดังนั้นในปี พ.ศ. 2550 จึงมีงานวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างความตื่นตัวอย่างมากในกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ นั่นก็คือการค้นพบวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ (human fibroblast) ให้กลายเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human induced-pluripotent stem cells; iPSCs) ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ทุกประเภทในร่างกายมนุษย์ได้ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญในการคงสภาพเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ 4 ยีน (*Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, และ *c-Myc*) โดยใช้ retrovirus เป็นเครื่องมือในการนำยีนดังกล่าวเข้าไปแสดงออกในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Takahashi et al., 2007) การค้นพบนี้ได้นำมาสู่โอกาสในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ด้วยการเหนี่ยวนำที่เฉพาะของแต่ละบุคคล/ผู้ป่วย ทำให้ไม่จำเป็นต้องทำลายตัวอ่อนมนุษย์ และปลอดภัยจากการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันร่างกายเมื่อต้องการปลูกถ่ายเซลล์กลับสู่ร่างกายผู้ป่วย นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้เพื่อการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกายผู้ป่วยโรคทางพันธุกรรมต่าง ๆ เช่น โรคพาคินสัน (Soldner et al., 2009), โรคฮันติงตัน (Zhang et al., 2010), โรคอัลไซเมอร์ (Yagi et al., 2011) ให้กลับไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ก่อนที่จะทำการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะต่อโรคนั้น ๆ (target cell) เพื่อจำลองสภาวะการเกิดโรคได้อีกด้วย

แต่อย่างไรก็ตามการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้นจำเป็นต้องมีการนำยีนหรือเพิ่มการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ ซึ่งยีนบางยีนมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง (oncogene) เช่น *Klf-4* และ *c-Myc* ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามจะลดการใช้ยีนเหล่านั้นลงแต่มักพบกับปัญหาด้านประสิทธิภาพของการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ลดลง เช่น การใช้แค่ *Oct4* และ *SOX2* (Huangfu et al., 2008; Ichida et al., 2009) อีกทั้งการนำยีนเข้าไปแสดงออกนั้นมักนิยมใช้ไวรัสในกลุ่ม retrovirus (Takahashi et al., 2007), lentivirus (Carey et al., 2008), sendaivirus (Nishimura et al., 2011), และ adenovirus (W. Zhou and Freed, 2009) เป็นเครื่องมือในการนำยีนเข้าไปแสดงออกในเซลล์ที่ต้องการแปลงสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งทำให้เกิดความไม่มั่นใจในการใช้เซลล์เหล่านั้นเพื่อการรักษาผู้ป่วยในอนาคต นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มจึงเริ่มหาวิธีเพื่อใช้ทดแทนการใช้ไวรัส เช่น การใช้ plasmid (Kaji et al., 2009), episomal DNA (Yu et al., 2009), mRNA สังเคราะห์ (Yang et al., 2011) และ โปรตีนสังเคราะห์ (Zhou et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามหลักการของวิธีต่าง ๆ ก็ยังใช้ยีนหรือผลิตภัณฑ์ของยีน *Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, และ *c-Myc* เช่นเดียวกันเพียงแต่เปลี่ยนวิธีการเท่านั้น อีกทั้งอัตราความสำเร็จยังไม่แน่นอนและความปลอดภัยในการใช้เพื่อการรักษายังคงต้องได้รับการตรวจสอบอีกมาก

จากการศึกษาพบว่ายีน *Oct4* เป็นยีนที่มีความสำคัญมากที่สุดในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน การไม่แสดงออกของยีนนี้ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนและทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเสื่อมสภาพและเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (Ding et al., 2011; Sterneckert et al., 2012) อีกทั้งยังมีรายงานว่าการใช้ 5-Azacytidine ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกเหนือพันธุกรรม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนให้ได้จำนวนมากขึ้น (Huangfu et al., 2008) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ผิวหนังมนุษย์โดยไม่ใช้ไวรัสแต่จะใช้ plasmid ซึ่งมีความปลอดภัยสูงกว่าทดแทนและจะเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* เพียงแค่ยีนเดียวร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine ในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ใช้การดัดแปลงพันธุกรรมน้อย นำไปสู่การสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปลอดภัยเพื่อใช้ในการรักษาโรคในอนาคต

2.1 เอกสารอ้างอิง

Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2008). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(1): 157–162.

Ding, J., Xu, H., Faiola, F., Ma'ayan, A., and Wang, J. (2011). Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. *Cell Research*. 22:155–167

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

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only oct4 and sox2. *Nat Biotechnol*. 26: 1269-1275.

Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D.R., Rubin, L.L., and Eggan, K. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-[beta] signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 5: 491-503.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 458: 771-775.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., Sato, H., Motomura, K., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., Asashima, M., Nakauchi, H., Yamaguchi, T., and Nakanishi, M. (2011). Development of defective and persistent sendai virus vector. *J. Biol. Chem*. 286: 4760-4771.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factor. *Cell*. 136: 964-977.

Sterneckert, J., Höing, S., and Schöler, H.R. (2012). Concise review: Oct4 and more: The reprogramming expressway. *Stem Cells*. 30: 15-21.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663-676.

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

Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., and Suzuki, N. (2011). Modeling familial alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Gen*. 20(23):4530-9.

Yang, C.-S., Li, Z., and Rana, T.M. (2011). Micrornas modulate ips cell generation. *RNA*. 17: 1451-1460.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 324: 797-801.

Zhang, N., An, M.C., Montoro, D., and Ellerby, L.M. (2010). Characterization of human huntington's disease cell model from induced pluripotent stem cells. *PLoS Curr.* 2: RRN1193.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., and Ding, S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 4: 381-384.

Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 27: 2667-2674.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้ภายหลังการเหนี่ยวนำ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

3.2. การทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังขนาด 2 x 2 เซนติเมตรที่เหลือทิ้งจากการผ่าตัดในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา โดยเจ้าของเนื้อเยื่อและญาติเป็นผู้ลงนามยินยอมก่อนทำการเก็บโดยเก็บใน Hanks Balance Salt Solution (HBSS) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและขนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ การสกัดเซลล์ผิวหนังจะใช้วิธี tissue explants โดยเนื้อเยื่อผิวหนังจะถูกแช่ใน 75% เอทานอล นาน 30 วินาที เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรก หลังจากนั้นทำการตัดเลาะเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันออกให้เหลือแต่ผิวหนังเท่านั้น จากนั้นตัดเนื้อเยื่อผิวหนังให้มีขนาดประมาณ 0.5 - 1 มิลลิเมตร แล้ววางเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วลงบนจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุมที่ปลอดเชื้อแล้วปล่อยทิ้งไว้ 1 – 2 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เนื้อเยื่อเกาะติดกับภาชนะเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงค่อยๆใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ (alpha-MEM ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin, และ 100µg/ml Streptomycin) แล้วเพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2 เป็นเวลา 5-10 วัน จนกว่าจะพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกระสวย (fibroblast-like cells) เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อผิวหนังหลังจากนั้นจะทำการย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตรโดยให้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 5x10^3เซลล์/ตารางเซนติเมตร แล้วทำการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนจนได้ passage ที่ 3 (P3) จากนั้นจะทำการแช่แข็งด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Dimethylsulfoxide (DMSO)

3.3. การทดลองที่ 2 การเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วย 5-Azacytidine และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังได้มากพอแล้ว เซลล์จำนวนหนึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90% เซลล์จะถูกเตรียมการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม 2µM 5-Azacytidine ลงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจะถูกเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *Oct4* โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 การนำ plasmid ที่มียีน pCAG_*mOct4* เข้าสู่เซลล์ผิวหนังโดยใช้ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ตามกรรมวิธีที่แนะนำในผลิตภัณฑ์

ระยะที่2 เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากระยะที่ 1 ใน น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ซึ่งประกอบด้วย Knockout DMEM (Invitrogen) + 20% Knockout serum replacement (Invitrogen) + 5 ng/mL b-FGF (Preprotech) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะที่ 3 เซลล์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกเลือกและย้ายลงไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง(Feeder cells) ที่ผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย mitomycin C โดยเลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์+ 5 ng/mL b-FGF

เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกตรวจสอบทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกเลือกเพื่อทำการเพิ่มจำนวนและทำการแช่งแข็งเก็บเอาไว้ในไนโตรเจนเหลว

3.4. การทดลองที่ 3 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ที่ได้นั้นเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจริงหรือไม่ ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

3.4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะการแสดงออกของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase

ตัวอย่างเซลล์จะถูกล้างด้วย 0.1M phosphate buffer solution (PBS) 3 ครั้ง ตามด้วยการ fix ด้วย 4% paraformaldehyde ใน PBS นาน 30 นาที และล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS หลังจากนั้นเติม alkaline phosphatase substrate (ATCC) ลงไปและเก็บในที่มืดประมาณ 60 นาที แล้วดูด substrate ออกและล้างด้วย PBS อีก 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4.2 Immunocytochemistry

ตัวอย่างเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตามด้วยการ fix ด้วย 4% paraformaldehyde ใน PBS นาน 30 นาทีและล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS จากนั้นป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะของ antibody ด้วย blocking solution นาน 2 ชั่วโมงแล้วจึงใส่ primary antibody ได้แก่ anti-human Oct4, anti-human Sox2, anti-human Nanog, anti-human SSEA-3, และ anti-human Tra1-60 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 คืน หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 5 ครั้งและใส่ secondary antibody และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 5 ครั้ง และใส่ 4',6-diamidino-2-phenylindole เพื่อย้อมดูนิวเคลียส จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นต์

3.4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse Transcription Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

ทำการสกัด RNA ของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้โดยใช้ TRIzol® (Thermo Fisher) จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้ให้เป็น cDNA ด้วยชุด reverse transcription Superscript III (Invitrogen) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่าง cDNA ที่สกัดได้จากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ด้วยวิธี RT-qPCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Lin28*, และ *Tert* โดยใช้ Biorad's SSO Fast Evagreensupermix นอกจากนี้จะตรวจสอบการทำงานของ plasmid โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ plasmid pCAG_Oct4 และจะใช้ยีน *GAPDH* เป็นยีน reference

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ของยีนต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR

Gene	Primer sequences 5'-3'	Assession Number	References
hOct4	F: 5' GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA 3' R: 5' TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA 3'	AF268617	Henderson et al., 2002
mOCT4	F: 5' CTCTGAGCCCTGTGCCGACC 3' R: 5' CTGCAAGGCCTCGAAGCGACA 3'	NM_013633.3	Addgene Plasmid
Sox2	F: 5' CCCCCGGCGGCAATAGCA 3' R: 5' TCGGCGCCGGGGAGATACAT 3'	BC013923.2	Henderson et al., 2002
Nanog	F: 5' AGCCTCTACTCTTCCTACCACC 3' R: 5' TCCAAAGCAGCCTCCAAGTC 3'	AB093576	Henderson et al., 2002
hLin-28	F: 5' TTTGCAGGTGGCTGCGCCAAG 3' R: 5' TTTGGCCGCCTCTCACTCCCA 3'	NM_024674.4	Henderson et al., 2002
hTERT	F: 5' CCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTG 3' R: 5' GGAAAAGCTGGCCCTGGGGTGGAGC 3'	NM_001193376.1	Henderson et al., 2002
GAPDH	F: 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3' R: 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'	NM_0012897461.1	-

3.4.4 การเปลี่ยนสภาพเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนให้เป็น Embryoid body

เนื่องจากเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะต้องมีความสามารถเปลี่ยนไปเป็นเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้น (3 germ layers) ได้เหมือนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนคุณภาพดีจะถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ และเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์แบบไม่เคลือบผิวในรูปแบบของเซลล์ลอย ในน้ำยาเลี้ยง

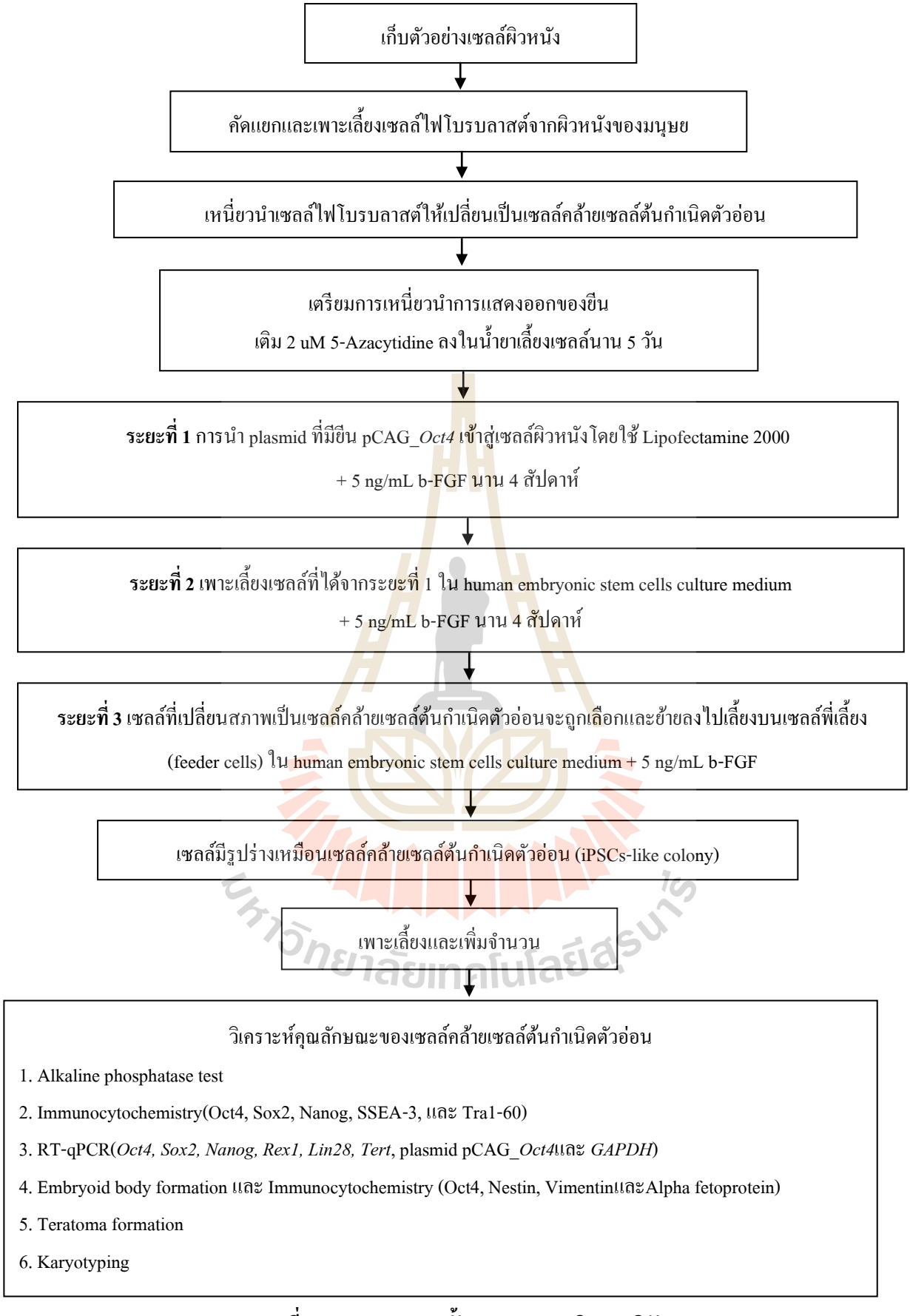
เซลล์ที่ประกอบด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ที่ไม่ใส่ b-FGF เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบการเปลี่ยนสภาพโดยใช้วิธี immunocytochemistry โดยจะทำการย้อมด้วย primary antibody ที่จำเพาะกับเซลล์ในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ anti-human Oct4 สำหรับเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ยังไม่เปลี่ยนสภาพ, anti-human Nestin สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm), anti-human Vimentin สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm), และ anti-human Alpha fetoprotein สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 คืน หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 5 ครั้งและใส่ secondary antibody และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 2 ชั่วโมงจากนั้นล้างด้วย PBS 5 ครั้ง และใส่ 4',6-diamidino-2-phenylindole เพื่อย้อมดูนิวเคลียส จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นต์

3.4.5 การสร้างก้อนเนื้องอก (teratoma formation) ในหนู nude เมาส์

นอกจากการเปลี่ยนสภาพเป็นเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้นในหลอดทดลอง (*in vitro* differentiation) แล้วการเปลี่ยนสภาพเป็นเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้นในสัตว์ทดลอง (*in vivo* differentiation) ยังเป็นลักษณะสำคัญอีกลักษณะหนึ่งของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกตัดออกจากเซลล์พี่เลี้ยงและทำการแยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โดยใช้ 0.025% trypsisn/EDTA หลังจากนั้นจะถูกปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น 1 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วฉีดสารละลายเซลล์จำนวน 100 ไมโครลิตร เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูโดยนายสัตวแพทย์ผู้ดูแลการวิจัย หลังจากฉีดก้อนเนื้องอก teratoma จะเกิดขึ้นใน 6-8 สัปดาห์ หนูที่มีก้อนเนื้องอกเกิดขึ้นจะถูกเมตาฆาตและเก็บชิ้นเนื้องอกเพื่อนำไปศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

3.4.6 การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยวิธี G banding Karyotyping

เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกเลี้ยงในรูปแบบที่ไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงบน matrigel (BD) เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้น เปลี่ยนน้ำยาเป็นน้ำยาที่มีการเติมความเข้มข้น Colchicine 0.04 ug/ml และเข้าเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ด้วย 0.025% trypsisn/EDTA แล้วเก็บตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,200 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทำการแตกเซลล์ด้วย 0.075M KCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นทำการตรึงเซลล์ด้วย Carnoy's fixative ที่แช่เย็นใน อุณหภูมิ -80°C เก็บตะกอนเซลล์เซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,800 rpm แล้วทำการตรึงเซลล์ซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายไม่ต้องปั่นเหวี่ยงแต่ทำการเก็บหลอดเซลล์ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C 1 คืน หลังจากนั้นทำการหยดลงบนสไลด์แก้วที่ทำความสะอาดเอาไว้แล้ว เมื่อสไลด์แก้วแห้ง ทำการอบสไลด์ให้แห้งในเตาอบอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 20 นาที และปล่อยให้สไลด์แก้วเย็นลงที่ อุณหภูมิห้อง เมื่อสไลด์เย็นจึงทำการย้อมด้วยสี Giemsa และจุ่มลงในสารละลาย 0.025% trypsisn/EDTA เมื่อเสร็จสิ้นการย้อมสี ทำการตรวจนับโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการตรวจสอบอย่างน้อย 20 metaphase



ภาพที่1. แผนภาพแสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1 การคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์และการเหนี่ยวนำการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังขนาด 2 x 2 เซนติเมตรที่เก็บได้จากโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ถูกทำการสกัดเซลล์ผิวหนังจะใช้วิธี tissue explantation โดยใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ alpha-MEM (Gibco) ที่เติมด้วย 10% FBS (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml Penicillin (Sigma), และ 100 µg/ml Streptomycin (Sigma) แล้วเพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนจนได้ P3 (ภาพที่ 2A) แล้วแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 10% DMSO

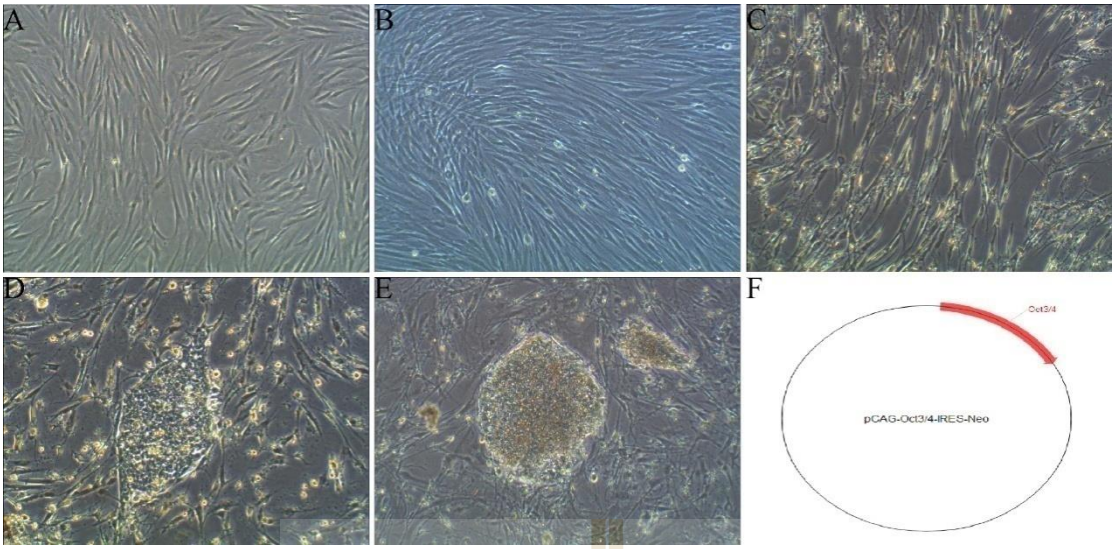
เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ผิวหนังได้มากพอแล้ว เซลล์จำนวนหนึ่งจะถูกเลี้ยงเพื่อใช้เหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนต่อไปและเมื่อความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90% เซลล์จะถูกเตรียมการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยการเติม 2 uM 5-Azacytidine ลงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 2B) การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนโดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*แบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 การนำ plasmid ที่มียีน pCAG_*Oct4* (ภาพที่ 2F) เข้าไปในเซลล์ผิวหนังโดยใช้ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ตามกรรมวิธีที่แนะนำในผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2C)

ระยะที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากระยะที่ 1 ใน น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ + 5 ng/mL b-FGF เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งการทดลองส่วนใหญ่พบว่าเซลล์ที่ได้จะไม่พัฒนาเป็นโคโลนีคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ แต่จากการทำซ้ำหลายครั้งพบว่าได้โคโลนีตั้งต้นที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เกิดขึ้น (ภาพที่2D)

ระยะที่ 3 เซลล์ที่เปลี่ยนสภาพคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะถูกเลือกและย้ายลงไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่ผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย mitomycin C โดยเลี้ยงด้วย น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์+ 5 ng/mL b-FGF (ภาพที่ 2E)

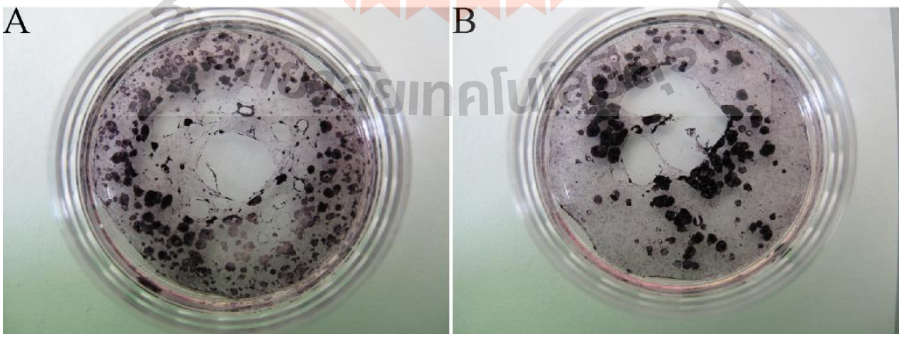
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2 แสดงการพัฒนาของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ให้ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วย 5-Azacytidine และการเพิ่มการแสดงออกของยีน*Oct4* ด้วย plasmid ที่มียีน pCAG_*Oct4*

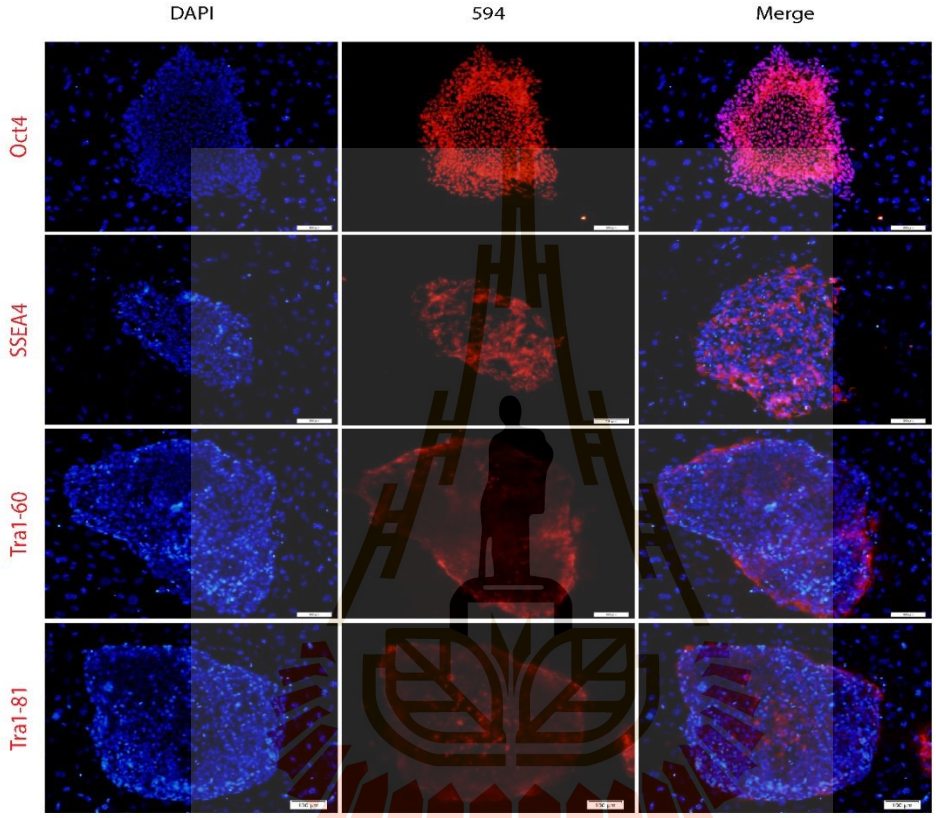
4.1.2 ผลการทดลองที่ 2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ alkaline phosphates ของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสองออกของยีน *Oct4* และทำการแช่แข็งอาไว้บางส่วนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปแล้ว เซลล์คล้ายเซลล์กำเนิดตัวอ่อนได้ทดสอบคุณลักษณะด้วยการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase อย่างมาก ทั้งในเซลล์รูปแบบเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (ภาพที่ 3A) และในรูปแบบ embryoid bodies (ภาพที่ 3B)



ภาพที่ 3 แสดงการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (A) และใน embryoid bodies (B)

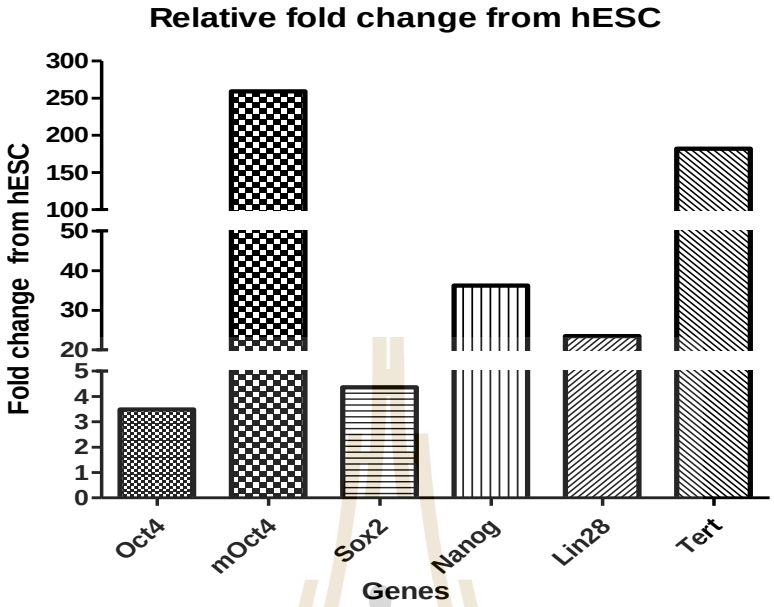
หลังจากเซลล์ให้ผลการสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase เป็นบวกแล้ว จึงนำเซลล์ที่ได้ไปทำการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ได้แก่ Oct4, SSEA4, Tra1-60 และ Tra1-81 ด้วยวิธี immunocytochemistry (ภาพที่ 4) ซึ่งพบว่าจากการทดสอบเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* มีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์เช่นเดียวกับในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์



ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ได้แก่ Oct4, SSEA4, Tra1-60 และ Tra1-81 ด้วยวิธี immunocytochemistry ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

เมื่อพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ จึงทำการทดสอบต่อไปด้วยการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกมากในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ได้แก่ *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*, *Tert*, และ *mOct4* (ยีนที่พบได้จาก plasmid) โดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งพบว่าเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่สร้างได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* มีการแสดงออกของยีนมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาก อีกทั้งยังพบว่ามี

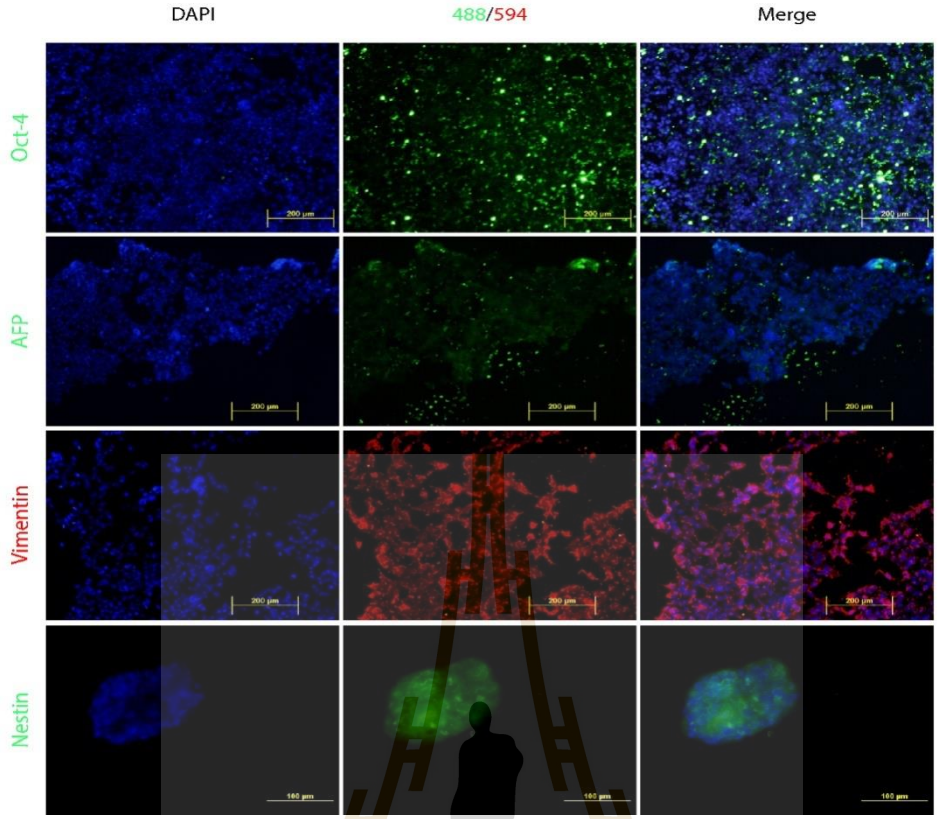
การแสดงออกของยีน *mOct4* ที่ได้รับมาจาก plasmid ที่ใส่เข้าไปเพื่อเพิ่มการแสดงอออกของยีน *Oct4* (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การแสดงออกของยีน *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28*, *Tert*, และ *mOct4*ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของ *Oct4*ด้วย plasmid (*mOct4*) ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์มีการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากตัวอ่อนมนุษย์

4.1.3 ผลการทดลองที่ 3 การทดสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน*Oct4*

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกายได้ทุกชนิด และหากแบ่งชนิดของการพัฒนาการของร่างกายสิ่งมีชีวิตต่อการพัฒนาการของตัวอ่อนจะมีการสร้างเนื้อเยื่อ 3 ชั้นขึ้นได้แก่เนื้อเยื่อชั้นนอก, เนื้อเยื่อชั้นกลาง, และเนื้อเยื่อชั้นใน ดังนั้นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างขึ้นจึงต้องผ่านการทดสอบนี้ด้วยการกระตุ้นการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อ 3 ชั้นด้วยการสร้าง embryoid body และทดสอบด้วยวิธี immunocytochemistry โดยย้อมด้วย marker ที่เป็นตัวแทนของเนื้อเยื่อชั้นต่างๆได้แก่ Oct4 เพื่อเป็นตัวแทนของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและแสดงถึงการแสดงออกของยีนที่ได้จาก plasmid, AFP เป็นตัวแทนเนื้อเยื่อชั้นใน Vimentin เป็นตัวแทนเนื้อเยื่อชั้นกลางและ Nestin เป็นตัวแทนเนื้อเยื่อชั้นนอก ซึ่งจากการทดสอบพบว่าเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ยังมีการแสดงออกของ *Oct4* อยู่และสามารถพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ดีเห็นได้จากพบว่ามีการย้อมติดได้ด้วย Vimentin แต่กลับพบว่ามีการย้อมติดด้วย AFP และ Nestin เพียงเล็กน้อย เท่านั้น (ภาพที่ 6)

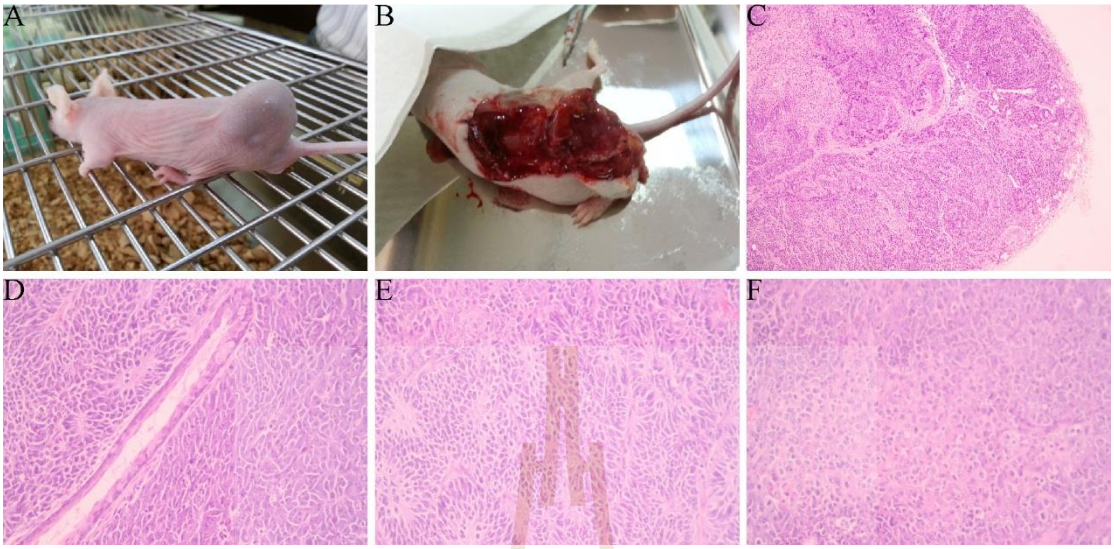


ภาพที่6 แสดงการทดสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ในเซลล์ที่ผ่านการทำ Embryoid body และทดสอบด้วย Immumocytochemistry โดยย้อมด้วยmarker (Oct4, AFP, Vimentin, และ Nestin)

4.1.4 ผลการทดลองที่4 การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ในร่างกายสัตว์ทดลองด้วยวิธี Teratoma formation

เนื่องด้วยเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกายได้ การทดสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้นในร่างกายสัตว์ทดลองได้หรือไม่ จากการทดสอบโดยการฉีดเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* พบว่าหลังจากฉีดเซลล์เข้าไปในชั้นใต้ผิวหนูทดลองจำนวน $10x10^7$ ล้านเซลล์ พบว่าหลังจากฉีด 6 สัปดาห์มีการเกิดก้อนเนื้อขึ้นใต้ผิวหนังบริเวณที่ฉีด (teratoma formation) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตรซึ่งไม่พบก้อนเนื้อในลักษณะเดียวกันแต่อย่างใดบริเวณที่เป็นการฉีดควบคุมด้วยน้ำเกลือ เมื่อทำการเมตาฆาตหนูทดลองและผ่าเอาชิ้นก่อนเนื้อออกมาพบว่าเป็นก้อนเนื้อมีลักษณะดังภาพที่ 7A-C เมื่อส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อไปตรวจโดยนักพยาธิวิทยาพบว่า เนื้อเยื่อประกอบด้วยกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางลักษณะเป็นกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 7D) และเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นท่อของเนื้อเยื่อชั้นใน (ภาพที่ 7E) แต่ไม่พบลักษณะของเนื้อเยื่อชั้นนอกแต่อย่าง

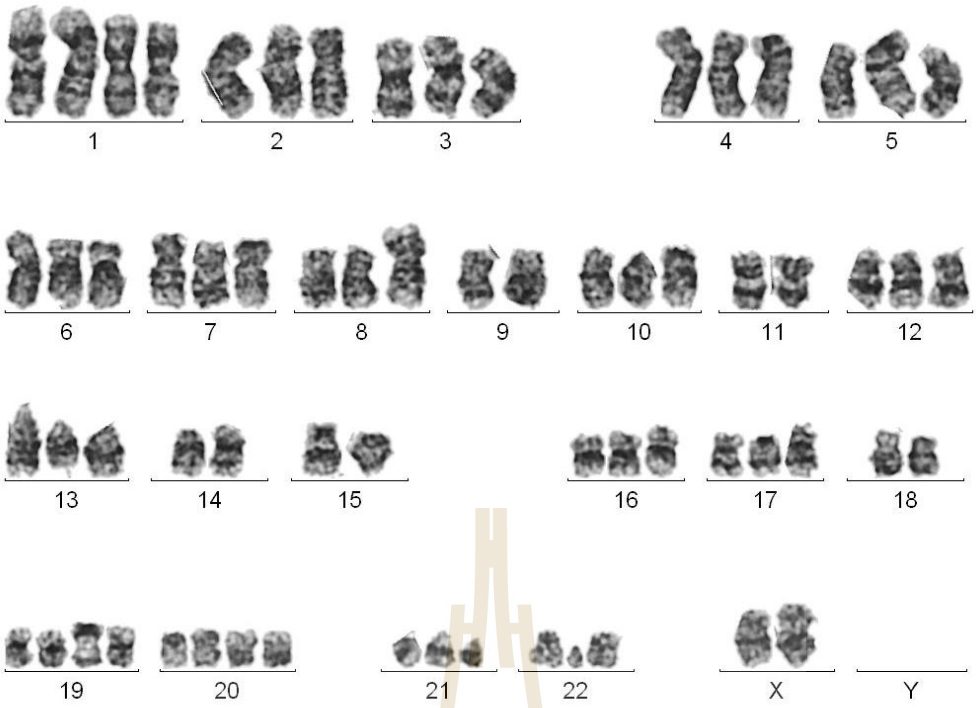
ใด นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่เกิดจากเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเป็นเป็นเนื้อเยื่อชั้นต่างๆที่แน่ชัดซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเซลล์มะเร็ง (undifferentiated malignant like cell)



ภาพที่ 7 การทดสอบความสามารถในการแปลสภาพของเซลล์ในร่างกายสัตว์ทดลองด้วยวิธี (Teratoma formation) ของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

4.1.5ผลการทดลองที่5 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะของโครโมโซม (Karyotyping) ของเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนที่สร้างได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4*

เนื่องจากพบความผิดปกติของการพัฒนาของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อ 3 ชั้น ทั้งในระบบหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นลักษณะที่ผิดปกติและไม่พบในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน อีกทั้งยังพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนสามารถคืนสภาพกลับไปเป็นของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้อีกครั้งแม้กระทั่งผ่านการทำการกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็น Embryoid body แล้วหรือแม้กระทั่งเลี้ยงในน้ำยาที่ใช้เซลล์เลี้ยงไปแล้วเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เกิดขึ้นในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนปกติ เพื่อทดสอบผลกระทบของการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนที่สร้างได้ จึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี G banding karyotypingซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติจาก 46,XX ในเซลล์ผิวหนังที่เป็นเซลล์เริ่มต้นเปลี่ยนเป็น 66,XX ซึ่งการมีลักษณะโครโมโซมคู่ที่ 1, 19 และ 20 เกินเป็น 2 คู่ และพบโคโมโซม 3 แท่งในโครโมโซมคู่ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 21, และ 22 ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงผล G banding karyotypingของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกด้วยยีน *Oct4*

4.2 ข้อวิจารณ์

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human ESCs) เป็นเซลล์ที่ศักยภาพสูงซึ่งมีความสามารถในการคงสภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและการแปลสภาพไปเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดในเซลล์ร่างกายมนุษย์ โดยแรกเริ่มเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถสร้างได้จากการสกัดเซลล์กลุ่ม inner cell mass (ICM) จากตัวอ่อนมนุษย์ในระยะบลาสโตซิสต์ (Thomson et al., 1998) แต่เนื่องด้วยวิธีการสร้างเซลล์ดังกล่าวจำเป็นต้องทำลายตัวอ่อนของมนุษย์ซึ่งอาจมีผลต่อหลักจริยธรรมได้จึงทำให้เกิดการพัฒนาการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (iPSCs) ขึ้นจากเซลล์ร่างกายแทนเพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายตัวอ่อนและทำให้เอื้อต่อการนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อการรักษาจำเพาะบุคคลได้ (Autologus cell therapy) (Takahashi et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006) นอกจากเซลล์ชนิดนี้จะมีลักษณะเหมือนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนทุกประการในด้าน การคงสภาพและความสามารถในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกายได้แล้ว เซลล์ชนิดนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการเป็นตัวแทนและต้นแบบในการนำมาใช้ในการศึกษาการดำเนินไปของโรคต่างๆ และสามารถนำมาสร้างเซลล์เป้าหมายของโรคเพื่อในใช้ในการศึกษาทางพยาธิวิทยาและทดสอบการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาหรือวิธีอื่นในหลอดทดลองก่อนนำไปใช้ในการรักษาจริงอีกด้วย (Chamberlain et al., 2010; Maria C. N. Marchetto et al., 2010; Maria C.N. Marchetto et al., 2010; Soldner

et al., 2009) อย่างไรก็ตามการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเริ่มแรกสร้างโดยการนำส่งยีนที่เป็น reprogramming ยีนเข้าไปในเซลล์ร่างกายโดยวิธีใช้ไวรัส ในการพายีนเข้าไปแสดงออกในเซลล์ร่างกาย (Hotta and Ellis, 2008; Takahashi, Tanabe, et al., 2007) ด้วยความไม่มั่นใจด้านการเปลี่ยนแปลงและการอาจจะก่อโรคของไวรัสที่นำส่งยีนเข้าไปจึงมีการพัฒนาการนำส่ง reprogramming ยีนด้วยวิธีอื่น ได้แก่ การใช้ plasmid (Chou et al., 2011; Okita et al., 2008), episomal (Chou et al., 2011) หรือ RNA (Warren et al., 2010)เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการลดจำนวน reprogramming ยีนลงด้วยจากเดิมใช้ 4 ยีนได้ *Oct4*, *Sox2*, *Klf-4*, และ*c-Myc* เหลือเพียงแค่ 2 ยีนได้แค่ *Oct4* และ *Sox2* (Giorgetti et al., 2009; Huangfu et al., 2008) เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูด้วยการใช้เพียง *Oct4* เพียงแค่ยีนเดียวโดยการนำส่งด้วย Lentivirus ร่วมกับสารเคมีกลุ่ม epigenetic modifier 4 ชนิด ได้แก่ Valproic acid, CHIR99021, 616452 , และ Tranylcypromine (Li et al., 2011) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยใช้ยีน *Oct4* เพียงแค่ยีนเดียวร่วมกับสารเคมีกลุ่ม epigenetic modifier ผู้วิจัยเลือกวิธีการใช้ plasmid ในการนำส่งยีน *Oct4* เพียงแค่ยีนเดียวเพื่อลดความเสี่ยงในการใช้ไวรัส และเลือก plasmid เป็น pCAG_*Oct4* เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน *Oct4*ปริมาณมากเพียงพอและสามารถแยกการแสดงออกของยีน *Oct4* ที่เกิดจาก plasmid และจากเซลล์ผิวหนังจากได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 5) ทั้งนี้ยังได้ใช้ร่วมกับ 5-Azacytidine ซึ่งเป็น epigenetic modifier กลุ่ม DNA methyltransferase inhibitor เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มโอกาสในการ reprogramming ซึ่งจากทดลองพบว่าสามารถสร้างเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้สำเร็จ (ภาพที่ 2) นอกจากนี้เซลล์ดังกล่าวยังมีการแสดงออกของลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ได้แต่ ความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ alkaline phosphatase (ภาพที่ 3) และการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน Oct4, SSEA4, Tra1-60 และ Tra1-81 (ภาพที่ 4) แต่กระนั้นเมื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปเป็น Embryoid body ตรวจสอบความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้น พบว่าเซลล์บางส่วนสามารพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางและชั้นในได้ แต่การพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกได้ไม่ดี (ภาพที่ 6) ซึ่งพบลักษณะเช่นเดียวกันในการทดสอบการพัฒนาการของเซลล์ในสัตว์ทดลองด้วยวิธี Teratoma formation ซึ่งไม่พบเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นนอกในการอ่านผลทางพยาธิวินิจฉัย (ภาพที่ 7) อีกทั้งการพบว่าเซลล์ดังกล่าวยังคงมีการแสดงออกของโปรตีน Oct4 ของมนุษย์มากในการทดสอบการทำ Embyoid body (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ *Oct4* ที่ได้จากการเพิ่มการแสดงออกด้วย plasmid ด้วย pCAG promoter อาจกระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน *Oct4* ของมนุษย์ที่มากเกินไปจนกระทั้งส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งพบได้เช่นกันว่ายีน *Oct4* ควบคุมการคงสภาพและยับยั้งการพัฒนา

ของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น และมีส่วนในการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนคงสภาพและกลายเป็นเซลล์ที่ไม่สามารถพัฒนาการได้ (ground-state pluripotency) (Ding et al., 2011; Hall et al., 2009; Sterneckert et al., 2012) นอกจากนี้การที่เซลล์ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเนื้อชั้นนอกได้มีความเกี่ยวข้องกับ epigenetic ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชนิดต่างๆที่แต่ต่างกัน ซึ่งมีรายงานว่าสามารถพบได้ในเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน(Kim et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าการพัฒนาการของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเซลล์ประสาทซึ่งอยู่ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นนอกจำเป็นต้องมีการลดการแสดงออกของยีน *Oct4* ก่อน (Yang et al., 2013) จากผลการทดลอง teratoma formation ในสัตว์ทดลอง (ภาพที่ 7) พบเซลล์และเนื้อเยื่อที่ยังไม่พัฒนา (undifferentiated cell) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์มะเร็ง ประกอบกับการที่มีจำนวนโครโมโซมที่มากผิดปกติ (ภาพที่ 8) เกิดจากการเพิ่มการแสดงออกที่มากเกินไปของยีน *Oct4* จาก plasmid ทำให้ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนนี้ได้ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ในครั้งนี้คงสภาพการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและตอบสนองการกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้น้อยมาก นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *Oct4* มีส่วนเกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนและพัฒนาการของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มะเร็ง (cancer stem cell) อีกด้วย จึงสามารถใช้ยีน *Oct4* ในการตรวจวัดการพัฒนาของเซลล์มะเร็งได้ (Koo et al., 2015; Yang et al., 2013) กระนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ร่วมกับ 5-Azacytidine สามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ แต่เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *Oct4* ที่เพิ่มการแสดงออกได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ร่วมกับ 5-Azacytidin สามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ แต่เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการแสดงออกที่มากเกินไปของยีน *Oct4* จาก plasmid ทำให้เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้มีความผิดปกติไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆได้ดี และมีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติ อย่างไรก็ตามเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ในการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาผลกระทบของยีน *Oct4* ต่อความผิดปกติของเซลล์ และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการฝึกเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ดีได้เนื่องจากมีความคงสภาพสูงมาก

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปในเรื่อง

5.2.1 การควบคุมการแสดงออกของยีน *Oct4* หลังได้เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์แล้วอาจทำให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ได้

5.2.2 ควรเลือกระบบการนำส่งยีนที่สามารถควบคุมการแสดงออกได้ เช่นระบบ tet-on system หรือระบบ Cre- recombinase เพื่อสามารถหยุดการแสดงออกของยีนที่นำส่งเข้าไปได้ตามที่ต้องการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Chamberlain, S.J., Chen, P.-F., Ng, K.Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders angelman and prader–willi syndromes. *Proceedings of the National Academy of Science*. 107: 17668-17673.

Chou, B.-K., Mali, P., Huang, X., Ye, Z., Dowey, S.N., Resar, L.M.S., Zou, C., Zhang, Y.A., Tong, J., and Cheng, L. (2011). Efficient human ips cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res*.

Ding, J., Xu, H., Faiola, F., Ma'ayan, A., and Wang, J. (2011). Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. *Cell Res*.

Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., Raya, A., Boué, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., Torrabadella, M., Veiga, A., and Belmonte, J.C.I. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using oct4 and sox2. *Cell Stem Cell*. 5: 353-357.

Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., Tomlinson, S., and Smith, A. (2009). Oct4 and lif/stat3 additively induce kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 5: 597-609.

Hotta, A., and Ellis, J. (2008). Retroviral vector silencing during ips cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem*. 105: 940-948.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only oct4 and sox2. *Nat Biotech*. 26: 1269-1275.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K.C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T.J., Irizarry, R.A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S.H., Weissman, I.L., Feinberg, A.P., and Daley, G.Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 467: 285-290.

Koo, B.S., Lee, S.H., Kim, J.M., Huang, S., Kim, S.H., Rho, Y.S., Bae, W.J., Kang, H.J., Kim, Y.S., Moon, J.H., and Lim, Y.C. (2015). Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene.* 34: 2317-2324.

Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu, C., Zhang, W., Zhang, X., Wu, Y., Li, H., Liu, K., Wu, C., Song, Z., Zhao, Y., Shi, Y., and Deng, H. (2011). Generation of ipscs from mouse fibroblasts with a single gene, oct4, and small molecules. *Cell Res.* 21: 196-204.

Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell.* 143: 527-539.

Marchetto, M.C.N., Winner, B., and Gage, F.H. (2010). Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Gen.* 19: R71-R76.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 322: 949-953.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 136: 964-977.

Sterneckert, J., Höing, S., and Schöler, H.R. (2012). Concise review: Oct4 and more: The reprogramming expressway. *Stem Cells.* 30: 15-21.

Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2: 3081-3089.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131: 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663-676.

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

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., and Rossi, D.J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mrna. *Cell Stem Cell.* 7: 618-630.

Yang, L., Zheng, J., Xu, T., and Xiao, X. (2013). Downregulation of oct4 promotes differentiation and inhibits growth of be (2)-c human neuroblastoma i-type cells. *Oncol Rep.* 29: 2191-2196.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

ประวัติ รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

6. ประวัติการทำงาน:

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

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

2016

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. ***J. Reprod. Dev.*** Accepted July 19, 2016. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2016. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12623

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. ***Theriogenology.*** 86: 214-220. (IF=1.798; เป็นCorrespondence)

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai. R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. ***Stem Cell Intl.*** 3038764. (IF=2.813; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. ***Theriogenology.*** 85: 509-518. (IF=1.798; เป็นCorrespondence)

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.**, Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380. (IF=2.104)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology***. 71: 216-223. (IF=1.587)

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. and Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. ***Theriogenology.*** 83: 891-896. (IF=1.792)

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** 61 : 431-437. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170. (IF=5.578)

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health***. pii: 0748233715579805. (IF=1.859)

2014

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9. (IF=5.365)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24. (IF=0.96)

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 119-123. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 237-240. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 241-243. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

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

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 60: 336-341. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

2013

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500. (IF=0.541)

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** 59: 214-218. (IF=1.515)

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 617-621. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin*** 32 (Special Issue 1): 196-203. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 613-616. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.* and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R***. 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** 112: 141-146. (IF=1.125; เป็น Correspondence)

2012

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., **Parnpai, R*.** and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. ***Mitochondrion*** 12: 506-513. (IF=3.249; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.***, Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14: 79-87. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology*** 65: 151-156. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R**.* 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** 83: 630-638. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205. (IF=3.727)

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M*. and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14: 248-257. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Takeda, K*., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. ***J. Reprod. Dev.*** 58: 323-329. (IF=1.515)

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai**, **R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst*** 135: 4774-4784. (IF=4.107; เป็น Correspondence)

2011

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant humen leukemia

inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302. (IF=2.871)

Kunkanjanawan, T., Noisa, P*. and **Parnpai, R*.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131. (IF=3.169 ; เป็น Correspondence)

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology*** 75: 1652-1660. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R*.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Lorthongpanich, C*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R*.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Parnpai, R., Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med*** Suppl. 41: 77-85. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542. (IF=1.515)

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R**. and Takeda, K*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82: 236-243. (IF=0.96)

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16: 057005-1. (IF = 2.859; เป็น Correspondence)

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

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

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

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

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.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

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

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

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

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

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

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

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

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

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

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

11. รางวัลที่ได้รับ

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

11.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

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

11.9. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.10 รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัติ

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

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

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

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

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

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1 ชื่อ นาง มาริน า เกตุทัต-คาร์นส์

Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 011xx xx x

รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

e-mail: ketudat@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24	
	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	
พ.ศ. 2538	Ph.D. (Biology) 4.00	
	University of California, San Diego, USA	
พ.ศ. 2538	ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology	
	Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, Germany	

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
- Recombinant Protein Production
- Gene Expression in cloned animals and stem cells

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

6.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : โครงการการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้เชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบกะ ส่งรายงาน

6.2 **ผู้ประสานงานชุดโครงการ** การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

6.3 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจเชื้อก่อโรคปนเปื้อนในเนื้อไก่สด ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2559
- การโคลนและศึกษาการทำงานของ Os1BGlu4 เบตากลูโคไซเดสจากข้าว ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
- การศึกษาความยาวของเทลโลเมียร์ในลูกแมวที่เกิดจากการโคลนนิ่ง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
- การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33) ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2556
- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2557
- การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
- การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2553
- การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
- การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551
- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions.

(National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537

6.4 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

ดูหัวข้อ 7.3

6.5 **งานวิจัยที่กำลังทำ** :

- การดัดแปลงพันธุกรรมของ Sacchromyces cerevisiae เพื่อให้สามารถผลิตเอธานอลจากแป้งมันสำปะหลังได้โดยตรง
  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2557 และได้ดำเนินการไปแล้ว 40%
- การผลิต *Pichia pastoris* ที่มีโอเมก้า 3 สูง สำหรับใช้เป็นอาหารปลา
  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2556 และได้ดำเนินการไปแล้ว 80%

Publications:

Parnpai, R., Ling, Y-Y., **Ketudat-Cairns, M.**, Somfai, T., and Nagai, T. (2016) Vitrification of Buffalo Oocytes and Embryos Theriogenology. 86(1) 214-220

Wendong, D. Gerdthai, T. Huang , Z., Ketudat-Cairns, M., Tang, R. Wang, S. (2015) Genetic analysis for anthocyanin and chlorophyll contents in rapeseed (Brassica napus L.) Ciência Rural 46 (5) 790-795

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., Parnpai, R., Rungsiwiwut, R., **Ketudat-Cairns, M**. (2015) Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture J Mol Microbiol Biotechnol. 25(6):372-380

Sripunya, N., Ling, Y-Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A. Ngernsoungnern, P., **Ketudat-Cairns, M.**, and Parnpai, R. (2014) Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. Cryobiology 2014 Dec 16;69(3):496-9.

Rouyi, C., Changxiang Z., Jiang C., Minna P., **Ketudat- Cairns, M**. (2014) Optimization of Quantitative Real-time PCR System on Amplification of Os1bglu4 gene. Agricultural Science and Technology 15(7):1096-1100.

Rouyi, C., Changxiang Z., Jiang C., Minna P., **Ketudat- Cairns, M**. (2014) Evaluation on Inducible Effect of pOp6 Promoter in Transgenic Rice. Agricultural Science and Technology 15(5):742-744

Srirattana, K., **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, kaneda, M., R. Parnpai (2014) Effects of Trichostatin a on *in vitro* development and DNA methylation level of the Satellite I Region of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos. J Reprod Dev 60(5) 336-341

Pakping, S., **Ketudat-Cairns, M.,** Boontawan, A. (2014) Extractive Fermentation of Ethanol from Fresh Casava Roots using Vacuum Fractionation Techniques. Adv. Mat. Res 931: 1096-1100

Rouyi C, Baiya S, Lee S-K, Mahong B, Jeon J-S, Ketudat-Cairns, J. and **Ketudat-Cairns, M**.. (2014) Recombinant Expression and Characterization of the Cytoplasmic Rice β-Glucosidase Os1BGlu4. PLoS ONE 9(5): e96712. doi:10.1371/journal.pone.0096712

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

Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Novel multiplex polymerase chain reaction and an oligonucleotide array for specific detection of the dominant foodborne bacterial pathogens in chicken meat. African Journal of Microbiology Research 7 (24) 3085-3095 DOI: 10.5897/AJMR12.2102

Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Oligonucleotide macroarray for specific detection of bacterial foodborne pathogens Chiang Mai Journal of Science (accepted 4 June 2013)

Kupradit, C., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Development of a DNA macroarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s11274-013-1394-1 (accepted 31 May 2013)

Chittapun, S., Ruamkuson, D. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Identification and Nutritional Value of Live Feeds for Ornamental Fish from Bangkok Metropolitan Markets in Thailand Chiang Mai Journal of Science 40 (3) 364-375

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

Imsoonthornruksa, S., K. Srirattana, W. Phewsoi, W. Tunwattana, R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2012) Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring Mitochrondrion Mitochondrion 12(5): 506–513

Srirattana K, , Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C, Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., **Ketudat-Cairns M**, Parnpai, R. (2012).Full-term development of gaur-bovine

interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment Cellular Reprogramming 14(3): 248-257

Imsoonthornruksa, S., A. Sangmalee, K. Srirattana, , R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2011) Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring Cellular Reprogramming 14(1): 79-87

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(4) 1-7

Ruamkuson, D., Tongpim, S., and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia Food Control 22: 1742-1747

Rattanasuk, S., Parnpai, R., and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination J of Reprod and Dev 57(4)

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos J Reprod Dev 57(3) 385-392

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M**. (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology* (151): 295-302

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos Reprod Fertil Dev 2010; 22(4):613-24

Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos J Reprod Dev 2010 Feb; 56(1):49-54.

Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 283-290

Ruamkusol, D., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 311-317

Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein Suranaree J. Sci Technol 16 (3) 245-251

Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin J. of Sci and Tech 31(4) 395-399

Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M**. (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M**. and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev 54(5) 306-313

Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.,** and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T ., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. (408) 241-249

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and. Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141

Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long- Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62

Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. Theriogenology. 67(4) 893-900

Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M**., Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a □-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant □-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 ** *Received Best paper of the year award.* **

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

Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55

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. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.

Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M**. (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62

Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)

Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211

Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Ueda T, Waverczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

Paper Presented at National and International Conferences (since 1998 > 80 titles)

Major advisor to 6 Ph.D. and 15 M.Sc. gratuates (since 2000)

Currently major advisor to 5 Ph.D. students

mkc

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี