รหัสโครงการ SUT3-304-60-12-16

รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

Induction of rhesus monkey embryonic stem cells differentiate into cardiomyocytes

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-60-12-16

รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

Induction of rhesus monkey embryonic stem cells differentiate into cardiomyocytes

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัย ดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

หัวหน้าโครงการ

เมษายน 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่สามารถแยกได้จากตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีสต์ เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้อย่างไม่จำกัด โดยที่เซลล์ยังคงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด สามารมารถเก็บรักษาเซลล์ต้นกำเนิดไว้ในสภาวะที่เหมาะสมและยังคงมีศักยภาพในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดต่างๆที่ทำหน้าที่ได้ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเซลล์ประสาท เป็นต้น การศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากลิงวอกลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับมนุษย์ถึง 90% และถูกใช้เป็นตัวแทนของมนุษย์ในการศึกษาโรคต่างๆมากมาย รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดและหัวใจ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ผลิตจากตัวอ่อนที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่ (ICSI) ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เริ่มจากนำเซลล์มาตรวจสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยการทำ immunocytochemistry ผลการตรวจพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะ ได้แก่ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4, TRA1-60 และ alkaline phosphatase จากผลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ได้จากการทำ ICSI มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกอย่างแท้จริง จากนั้นได้ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แล้วใช้วิธี immunocytochemistry ตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ได้แก่ Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43 จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่านการทำให้เกิด embryoid bodies (EBs) แล้วนำ EBs ไปเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี glucose และไม่มี pyruvate และเติม lactate เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Embryonic stem cells (ES cells) are the cells derived from embryo at blastocyst stage, which are growing and developing into different cell types. ES cells are capable of replicating itself (Self-renewal) and still retain the property of ES cells. ES cells can be preserved under optimum conditions in the laboratory and also have the ability to turn into different type of cells, including muscle cells, cardiac muscle cells and nerve cells. ES cell of rhesus monkey is so interested in research. Since there is a close genetic relative to humans more than 90% and also using rhesus monkey as a model to study the disease in human beings including cardiovascular disease.

The aim of this study was to induction of rhesus monkey ES cells derived from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryos into neuron cells. Starting from examining the properties of ES cells by immunocytochemistry. The results showed that rhesus monkey ES cells expressed specific protein markers that are indicative of true rhesus monkey ES cells including Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4 TRA1-60 and alkaline phosphatase. Then induction of rhesus monkey ES cells differentiated to be cardiomyocytes which confirmed by immunocytochemistry. The results found that the entire cells expressed specific protein markers of the cardiomyocytes Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43. From the results can be concluded that the induction protocol via embryoid bodies (EBs) production and then cultured EBs in the medium without glucose and pyruvate, and supplemented with lactate are efficient,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	3
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	
การทบทวนวรรณกรรม	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล	7
สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	7
การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง	7
การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก	8
การเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกโดยวิธี Mechanical passaging	8
การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก	9
การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่าน Embryoid bodies (EBs)	9
การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
ผลการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง	11
ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก และการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกโดยวิธี Mechanical passaging	12
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก	14
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	17

หน้า

บทที่ 6 สรุปผล และข้อเสนอแนะ
สรุปผลการวิจัย..... 19
ข้อเสนอแนะ..... 19
บรรณานุกรม..... 20
ภาคผนวก ก..... 23
ประวัติผู้วิจัย..... 23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเซลล์ลูกอ่อนหนูถีบจักร..... 11
รูปที่ 2 เซลล์พี่เลี้ยงที่จะนำไปเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก..... 12
รูปที่ 3 เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ละลายออกมาจากการแช่แข็ง..... 13
รูปที่ 4 การ subculture เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก..... 13
รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก
ที่มีการแสดงออกของ Nanog, Oct4, SSEA4, TRA-1-60 และ AP..... 14
รูปที่ 6 การสร้าง Embryoid bodies..... 14
รูปที่ 7 เซลล์ที่เจริญเปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก
เป็น Beating cells..... 15
รูปที่ 8 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่มีการแสดงออก
ของ Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43..... 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) นับเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประชากรทั่วโลกในปัจจุบัน ในประเทศไทยพบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุของการตายลำดับต้นๆ ของประชากรภายในประเทศ โดยเฉพาะในกลุ่มบุคคลคนที่อยู่ในสังคมเมือง ซึ่งคาดว่าแนวโน้มของโรคหัวใจและหลอดเลือดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามพัฒนาการทางเศรษฐกิจและสังคม เนื่องจากมีปัจจัยเสี่ยงต่อการก่อโรคเพิ่มขึ้น เช่น อาหาร มลพิษ ความเครียด หรือโรคประจำตัว นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาให้ความสำคัญกับการป้องกันและควบคุมโรคมากขึ้น โดยการคิดค้นกระบวนการรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันและควบคุมโรคดังกล่าว ซึ่งวิธีการที่กำลังเป็นที่นิยมและมีประสิทธิภาพสูงในการรักษา ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ต่างให้ความสนใจและมุ่งเน้นพัฒนาเทคนิคนี้อย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือ การใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการปลูกถ่ายเพื่อการรักษา

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) ได้เข้ามามีบทบาทเกี่ยวข้องและมีรายงานการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ถึงการแก้ไขปัญหาโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยเฉพาะโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial infraction, MI) โดยการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiomyocytes) ที่ตายลงจากพยาธิสภาพของโรค เซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ตั้งต้นของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและเซลล์ชนิดอื่นๆของร่างกาย รวมถึงการส่งสัญญาณและมีกระบวนป้องกันการเกิดการตายแบบ apotosis ได้ด้วย โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดที่สำคัญ คือ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic stem cells, ESCs) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยและการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์มาก เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้เกือบทุกชนิดในร่างกาย (Pluripotency) ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเซลล์ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่มีการสลายลงไปของพยาธิสภาพที่เกิดจากโรคต่างๆ อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ยังมีปัญหาด้านจริยธรรม เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ได้จากการตัดแยกส่วน Inner cell mass ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ และก่อนที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มาใช้ในทางคลินิก จำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ด้านต่างๆ เช่น ความปลอดภัย ปลอดเชื้อ หรือคุณสมบัติด้านบวกของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ทดลองให้แน่ชัดเสียก่อน นักวิจัยจึงมุ่งเน้นความสำคัญไปที่การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากสัตว์อื่นที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากที่สุด ซึ่งก็คือสัตว์ตระกูลลิง (Non-human primate) ถือเป็นสัตว์ที่มีความใกล้เคียงของสารพันธุกรรมกับมนุษย์มากกว่า 90% ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิง (Monkey embryonic stem cells) จึงถูกเลือกมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาวิจัยโรคต่างๆของมนุษย์

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนั้น ได้มีงานวิจัยเผยแพร่อย่างกว้างขวาง โดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ หรือเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้าย

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Induced pluripotent stem cells, IPSCs) ซึ่งเมื่อได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจแล้ว มีการนำไปทดสอบปลูกถ่ายในสัตว์ทดลองตระกูลลิง ซึ่งเซลล์เหล่านี้อาจเกิดกระบวนการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากไม่ใช่การปลูกถ่ายจากเซลล์เนื้อเยื่อของลิงเอง อย่างไรก็ตามมีการรายงานการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไม่มากนัก (งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยใช้วิธีการที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อประโยชน์ในกาศึกษาวิจัยด้านการแพทย์ การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ และนำไปประยุกต์ใช้รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือดในมนุษย์เพื่อใช้ในทางคลินิกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในห้องทดลองโดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม

1.2.2 เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกในห้องทดลอง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมในห้องทดลอง

1.3.2 ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกในห้องทดลอง

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย (ถ้ามี)

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกมีคุณสมบัติแบ่งตัวเพิ่มจำนวนตัวเองได้ (Self-renewal) และยังสามารถแสดงคุณสมบัติการเจริญเปลี่ยนแปลงในห้องทดลองไปเป็นเซลล์ในชั้นเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายได้ทั้ง Ectoderm, Mesoderm และ Endoderm เหมือนเช่นคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยทั่วไป และสามารถเหนี่ยวนำโดยใช้วิธีการที่เหมาะสมในห้องทดลองไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้มีการแสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจปกติ โดยสามารถแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ตลอดจนทำหน้าที่ได้เหมือนเซลล์ในเนื้อเยื่อหัวใจ คือ มีการหดและคลายตัว (Beating) ได้อีกด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตรฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.5.1. จะสามารถเผยแพร่ผลงานโดยการนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1.5.2. จะสามารถตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

1.6.1. ถ่ายทอดผลงานวิจัยไปให้หน่วยงานที่สนใจด้วยการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นกลุ่มของโรคที่เกิดจากการทำงานผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือดที่หล่อเลี้ยงไปทั่วร่างกาย เช่น ความดันโลหิตสูง (Hypertension), โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary heart disease), โรคหลอดเลือดสมองแตก (Stroke) หรือ ภาวะหัวใจล้มเหลว (Congestive heart failure) (Mendis และคณะ, 2015) สาเหตุหลักมาจากพฤติกรรมทางสุขภาพและภาวะทุพลภาพของบุคคลนั้น เป็นกลุ่มอาการก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพ การสูญเสีย และการเสียชีวิตเป็นอันดับ 1 ทั่วโลก ตามการรายงานของ Global status report on noncommunicable diseases 2014 อาทิ เช่น โรคหัวใจขาดเลือดจากหลอดเลือดโคโรนารี่ที่ไปเลี้ยงหัวใจตีบตัน ส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจตายขยายเป็นวงกว้างจนกระทั่งผู้ป่วยเสียชีวิต หรือเส้นเลือดในสมองแตก (Mendis และคณะ, 2015) โดยในประเทศไทยพบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายเป็นลำดับที่ 2 ในปี 2554 (Chotiyarnwong และ Harnphadungkit, 2015) และจากรายงานทางสถิติปี 2558 ของวารสาร American Heart Association Statistical Update พบว่าในปี 2011 พบการตายจากโรคหัวใจและหลอดเลือดของคนอเมริกันมากกว่า 2,150 คนในแต่ละวัน หรือโดยเฉลี่ยพบการตาย 1 คนในทุก 40 นาที ซึ่งโดยส่วนใหญ่เกิดจากกลุ่มบุคคลที่มีอายุน้อยกว่า 75 ปี (Mozaffarian และคณะ, 2015) และในปี 2012 ประชากรกว่า 17.5 ล้านคนเสียชีวิตจากโรคนี้ (Mendis และคณะ, 2015) พบว่าโรคนี้เป็นสาเหตุการตายมากที่สุดในหญิงชาวอังกฤษ (28% ของผู้หญิงที่เสียชีวิต) (Bhatnagar และคณะ, 2015)

ระบาดวิทยาของโรคหัวใจและหลอดเลือดพบมากในประเทศที่มีการพัฒนาแล้วและกำลังพัฒนาซึ่งมีความเสี่ยงด้านคุณภาพชีวิตหลายด้านที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ ซึ่งจากข้อมูลที่สำคัญเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า โรคหัวใจและหลอดเลือดกลายมาเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประชากรทั่วโลกในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาให้ความสำคัญกับการป้องกันควบคุมโรคไม่ให้เพิ่มมากขึ้น รวมถึงคิดค้นกระบวนการรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาโรคนี้ พยาธิสภาพของโรคหัวใจและหลอดเลือดมีผลให้ออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อหัวใจไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ส่งผลให้เกิดเนื้อเยื่อพังผืด และเกิดแรงดันการไหลของเลือด จนกระทั่งหัวใจล้มเหลวและตาย การฟื้นฟูคืนสภาพเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจ โดยการสร้างเซลล์เนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเพื่อรักษาพยาธิสภาพของโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยเทคนิคที่ได้รับความนิยมแพร่หลายในปัจจุบันคือการใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการปลูกถ่ายเพื่อการรักษา

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเป็นเซลล์ที่แยกได้จาก inner cell mass ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ที่เกิดขึ้นภายหลังจากเกิดการปฏิสนธิ พบว่ามีคุณสมบัติสามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้ และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะคงสภาวะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไว้ ภายหลังระยะเวลาการเลี้ยงที่ยาวนานในห้องทดลองและยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้เกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ประสาท เซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือด (Davila, และคณะ, 2004) เป็นต้น ตลอดจนมีศักยภาพในการกลายไปเป็น

เซลล์ในเนื้อเยื่อทั้งสามชั้นของร่างกาย (Three germ layers) ได้แก่ Ectodermal, Mesodermal และ Endodermal lineages (Thomson และคณะ, 1998) ด้วยเหตุผลนี้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจึงเป็นเซลล์ที่ได้รับความสนใจและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยโดยเฉพาะวิทยาการทางการแพทย์ เกี่ยวกับการซ่อมแซมอวัยวะและเนื้อเยื่อ (Regenerative medicine and tissue replacement) รายงานการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ และนำมาใช้ในการศึกษาทดลองทางการแพทย์ ซึ่งมีรายงานการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเริ่มตั้งแต่ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูถีบจักร ซึ่งประสบความสำเร็จในการผลิตในปี 1981 (Evans และคณะ, 1981) จนกระทั่งมีรายงานความสำเร็จการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ในปี 1998 (Thomson และคณะ, 1998) จากความสำเร็จดังกล่าวนำไปสู่การนำมาใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการผลิตเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Kehat และคณะ, 2001; Boheler และคณะ, 2002) ซึ่งสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาวิจัยโรคในมนุษย์ นำไปสู่การศึกษาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเพื่อให้ทราบถึงกลไกลการเปลี่ยนแปลงและประสิทธิภาพในการรักษา (Segers และ Lee 2008; Chong และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในการปลูกถ่ายเข้าสู่สัตว์ทดลอง หรือการใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในทางคลินิก จำเป็นต้องผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ อาทิ เช่น ต้องเป็นเซลล์ชนิดจำเพาะที่ไม่ปนเปื้อนกับเซลล์ชนิดอื่น เซลล์ที่ได้ภายหลังการเหนี่ยวนำสามารถทำงานได้ตามปกติของสภาวะร่างกาย เซลล์ที่ได้ต้องมีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายในหนูหรือสัตว์ทดลองขนาดใหญ่ที่เป็นโมเดลของโรคหัวใจ และจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Boheler และคณะ, 2002) ดังนั้นการศึกษารูปแบบของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ทดลองนั้นยังมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่จะนำไปใช้จะต้องมีความปลอดภัยสูงสุดก่อนนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกในมนุษย์ได้

นักวิทยาศาสตร์จึงได้นำเอาโมเดลสัตว์ทดลองที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์ ได้แก่ลิงวอก (Rhesus macaque, *Macaca mlatta*) ซึ่งเป็นสัตว์ตระกูลเดียวกับมนุษย์ (Human primate) มาใช้เพื่อการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ของมนุษย์ เนื่องจากลิงวอกนั้นมีพันธุกรรมที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่า 90% ซึ่งมากกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่นๆ จึงมีความเหมาะสมในการศึกษากลไกของโรคต่างๆที่เกิดขึ้นในมนุษย์ (Porrino และคณะ, 1987; Cornblath และคณะ, 1989; Rokkas และคณะ, 1993) โดยนักวิทยาศาสตร์ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของสัตว์ตระกูลไพรเมทขึ้นครั้งแรกในปี 1995 โดย Thomsonและคณะ (Thomson และคณะ, 1995) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกสามารถแสดงคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกันกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ อาทิ เช่น มีลักษณะรูปร่างลักษณะโคโลนี การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ และศักยภาพในการเหนี่ยวนำไปเป็นเนื้อเยื่อในชั้นต่างๆของร่างกาย (Mitalipov และคณะ, 2006) และสามารถถูกเหนี่ยวนำภายใต้สภาวะที่เหมาะสมไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด(Honig และคณะ, 2004; Chen และคณะ, 2003; Chen และคณะ, 2006; Mitalipov และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2011) ดังนั้นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกจึงมีศักยภาพที่จะเป็นโมเดลที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปใช้ทางการแพทย์ของมนุษย์ และในปัจจุบันพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกสามารถนำมาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคในมนุษย์ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคพาร์คินสัน

และโรคไขสันหลังบาดเจ็บ (Kuo และคณะ, 2003; Mitalipov และคณะ, 2006; Byrne และคณะ, 2007; Navara และคณะ, 2007; Dighe และคณะ, 2008; Laowtammathron และคณะ, 2010) ดังนั้นวิทยาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อจากการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกในโมเดลสัตว์ทดลองลิงวอก อาจจะนำมาสู่ความสำเร็จด้านวิทยาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อในมนุษย์ได้

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจสำเร็จครั้งแรกโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูถีบจักร (Klug และคณะ, 1996) และได้มีการศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง(Wobus และคณะ, 1991) โดยการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและการปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเข้าไปยังสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการรักษาโรค (Min และคณะ, 2002) ทั้งนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการโดยต้องคำนึงถึงความเข้ากันกับเซลล์เนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองนั้นๆ กระทั่งนักวิจัยรายงานการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Kehat และคณะ, 2001) จนกระทั่งสามารถนำมาใช้ปลูกถ่ายในลิงกัง (*Macaca nemestrina*) ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองตระกูลเดียวกับมนุษย์ได้ (Chong และคณะ, 2014) อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดจำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อจากสัตว์ทดลองชนิดนั้นๆ (Autologous transplantation) เพื่อหลีกเหลี่ยงปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกาย การนำเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ปลูกถ่ายให้กับเนื้อเยื่อของลิงจึงจำเป็นต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อร่างกายสัตว์ทดลองด้านอื่นๆได้ ส่วนในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกมีรายงานความสำเร็จในการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดย Schwanke และคณะ (2006) โดยการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เกิด embryoid body (EB) โดยไม่ใช้สารเคมีเป็นตัวกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงเป็น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจซึ่งได้ความสำเร็จไม่ดีนัก หลังจากนี้มีรายงานการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก และเซลล์ iPSCs ลิงวอก โดยไม่ผ่านการเกิด EB โดยมีการเติมสารเคมีลงไปในน้ำยาเหนี่ยวนำทำให้เพิ่มประสิทธิภาพและได้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมากขึ้น (Zhang และคณะ, 2017; Lin และคณะ, 2018) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาศักยภาพการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก ด้วยการเหนี่ยวนำโดยวิธีที่เหมาะสม รวมถึงตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

โครงการวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาและได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำการทดลอง ณ ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

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

3.3 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง

เลี้ยงหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR นำหนูเพศเมียผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ นำหนูที่ตั้งท้อง 13 วันมาฆ่าด้วยวิธีเมตตาฆาต จากนั้นทำการเปิดช่องท้อง เพื่อนำลูกอ่อน (Fetus) หนูออกมา ทำการตัดส่วนหัวและอวัยวะภายในช่องท้องของตัวอ่อนหนู แล้วล้างออกด้วย PBS แล้วนำมาสกัดแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Mouse embryonic fibroblast; MEF) โดยนำส่วนเนื้อเยื่อที่เหลือมาใส่หลอด conical (Corning, USA) ขนาด 50 ซีซี เพื่อย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยน้ำยา Trypsin/EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมกับเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin/EDTA ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย α-MEM แล้วเติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin และ 100 µg/ml Streptomycin แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ข้างต้น หลังจากนั้นนำเซลล์ไปใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ (Nunc, Denmark) ขนาด 60 มม. แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน จนเซลล์มีความหนาแน่น 80-90% จึงนำไป subculture หรือ passage เซลล์ ทำการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณเซลล์จนได้ passage ที่ 3 โดยเลี้ยงจนได้ความหนาแน่น 80-90% แล้วเก็บเซลล์โดยใช้น้ำยา Trypsin/EDTA ย่อยเซลล์ แล้วนำไปปั่นให้ตกตกตะกอน จากนั้นจะนำเซลล์มาละลายในน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่ประกอบด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ซึ่งเติมด้วย 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วใส่หลอดแช่แข็งแบบ straw ขนาด 0.25 ซีซี แล้วนำไปไว้ที่ -80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเก็บไว้ใช้งานต่อไป

การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (Feeder cell) ทำโดยนำ straw ที่เก็บเซลล์แช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลวใส่ลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 นาที แล้วตัด straw เพื่อให้น้ำยาที่มีเซลล์หยดลงในหลอด conical ขนาด 15 ซีซี ที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 5 ซีซี ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm นาน 5 นาที แล้วนำเซลล์ผสมกับน้ำยาเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบ

เลี้ยงเซลล์ จนได้ความหนาแน่น 80-90% แล้วนำไปเตรียมเป็นเซลล์พี่เลี้ยง โดยนำเซลล์ไป inactivate ด้วย 5 µg/ml mitomycin C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการ passage ไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 4-well dish (Nunc) หรือจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. โดยมีความเข้มข้น 4×10^5 เซลล์/dish เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงสำหรับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกต่อไป

3.4 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

งานวิจัยในครั้งนี้ใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก (YRES-7) ที่ได้จากการผลิตตัวอ่อนในห้องทดลองโดยวิธีการ ICSI ที่นำมาจาก Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, Georgia, USA โดยผ่านการทำ Material Transfer Agreement ร่วมกันแล้ว การเลี้ยงเริ่มจากนำหลอดเก็บเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวออกมาไว้ในน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 1 นาที แล้วดูดน้ำยาที่มีเซลล์ใส่ลงในหลอด conical ขนาด 15 ซีซี ที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน 5 ซีซี น้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 ที่เติม 20% knockout serum replacement (KSR), 1% non-essential amino acids (NEAA), 40 ng/ml bFGF, 2mM L-glutamine, 100 U/ml Penicillin และ 100 ug/ml Streptomycin หลังจากตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ประมาณ 4-7 วัน โดยในขั้นตอนนี้จะยังไม่มีการเปลี่ยนน้ำยา แล้วนำเซลล์ออกมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเริ่มเห็นเซลล์เกาะกันเป็นโคโลนี โดยภายในโคโลนีจะประกอบไปด้วยเซลล์เดี่ยว ที่มีลักษณะนิวเคลียสกลมโตอยู่ตรงกลาง มีไซโตพลาสซึมปริมาณน้อยอยู่รอบ ๆ จะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกประมาณวันที่ 7-14 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ครึ่งหนึ่งทุก ๆ 2 วัน โคโลนีจะเจริญเติบโตได้ประมาณ 70-80% ประมาณวันที่ 10-14 พร้อมที่จะนำไป passage เพื่อขยายเพิ่มจำนวนบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ต่อไป

3.5 การเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกโดยวิธี Mechanical passaging

เตรียมยืดเข็มแก้วที่มีลักษณะเป็นรูปตะขอเกี่ยว (capillary hook needle) โดยใช้ไฟลนที่ปลายเข็มด้านหนึ่งแล้วดึงออกใช้ปลายที่ดึงออกผ่านเปลวไฟจะทำให้เข็มโค้งได้เข็มรูปตะขอเกี่ยว นำเซลล์ที่เจริญ 70-80% มาตัดโดยใช้ส่วนที่เป็นตะขอตัดออกเป็นชิ้น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเซลล์ไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงจานใหม่ แล้วเลี้ยงต่อไปประมาณ 3-4 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ครึ่งหนึ่งทุก ๆ 2 วัน เซลล์จะเจริญเติบโตที่ 70-80% อีกรอบหนึ่ง ซึ่งเซลล์ที่เจริญภายหลังการ passage ครั้งแรกจะสังเกตลักษณะรูปร่าง

ของเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น ทำการ passage เปลี่ยนไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ จนได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมากพอเพื่อใช้ในการทดลองและทำการเก็บแช่แข็งต่อไป

3.5 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

นำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกมาตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent stem cells markers ซึ่งจะมีการแสดงออกของ Oct4, Nanog, Sox2, SSEA-4, TRA-1-60 โดยทำการทดสอบด้วยการย้อมสีดูโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์และภายในนิวเคลียส โดยวิธี Immunocytochemistry ซึ่งมีขั้นตอนคือ นำเซลล์ที่เลี้ยงเจริญเติบโตประมาณ 70-80% มาล้างด้วย PBS(-) สองครั้ง แล้วนำเซลล์มาตรึงด้วย 4% Paraformaldehyde (PFA) เป็นเวลา 15-30 นาที โดยหากย้อมสีของ marker ที่อยู่ในนิวเคลียสจะเติม 1% Triton-X เพื่อ permeabilization จากนั้นทำการ block ด้วยสารละลาย PBS ที่มีส่วนผสมของ 2% BSA และ 130 mM glycine เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเติม primary antibody ที่ละลายกับ blocking solution ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ Nanog (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA), Oct4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), SSEA-4 (1:250, Chemicon, USA) และ TRA-1-60 (1:200, Chemicon) แล้วบ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้าง primary antibody ออกด้วย PBS (-) โดยทำซ้ำ 3 ครั้งๆละ 15 นาที แล้วเติม secondary antibody ที่ conjugated กับ Alexa Red (Molecular Probe, USA) บ่มไว้ประมาณ 45-60 นาที แล้วล้าง 3 ครั้งๆละ 15 นาที นำไปตรวจสอบด้วยกล้อง จุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Eclipse Ti Nikon, Japan)

การตรวจสอบ Alkaline phosphatase activity (AP) ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่มีคุณสมบัติเป็น pluripotency โดยการย้อมสี AP มีขั้นตอนคือ นำเซลล์ออกมาล้างด้วย PBS (-) 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์มาตรึงด้วย 4% PFA นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS (-) 3 ครั้ง แล้วเติม Alkaline phosphatase substrate Kit (Vector Lab, USA) บ่มไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที แล้วล้างออกด้วยด้วย PBS (-) 3 ครั้ง นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.6 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่าน Embryoid bodies (EBs)

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่าน EBs การเหนี่ยวนำในการทดลองนี้ ใช้วิธีที่รายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมนุษย์โดยผ่านการสร้าง EBs ตามรายงานของ Tohyama และคณะ (2013) โดยมีวิธีการดังนี้ เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนบนเซลล์พี่เลี้ยงในน้ำยาจนกระทั่งเซลล์เจริญได้ 70-80% จากนั้นทำการ subculture เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้เข็มแก้วที่

ทำเป็นรูปตะขอเกี่ยว ในที่นี้สามารถตัดชิ้นโคโลนีของเซลล์ให้มีขนาดเล็กลงจากวิธีการ subculture ปกติ นำเซลล์ไปเลี้ยงแบบแขวนลอยในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย α-MEM ที่มี 50 mg/ml ascorbic acid, 5% FBS และ 0.1 mM β-mercaptoethanol และไมมี bFGF โดยอัตราการเลี้ยงเซลล์ที่ตัดแล้วจาก 1-2 จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. สามารถนำไปเลี้ยงได้ใน 1 จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. แบบ low attachment culture dish (Corning) ทำการเปลี่ยนน้ำยาออกครึ่งหนึ่งทุกๆสองวัน เมื่อเลี้ยงได้ 10-14 วันจะได้ก้อน EBs ลักษณะกลม จะพบว่ามีเซลล์ประมาณร้อยละ 1-10 ที่เกิดการหดและคลายตัว (Beating cells) ซึ่งแสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จากนั้นจะนำก้อน EBs ที่เลี้ยงนานประมาณ 20-30 วันเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดแยกเอาเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในก้อน EBs โดยเลี้ยงในน้ำยา Glucose-free DMEM (ไม่มี glucose และไม่มี pyruvate, Invitrogen) ที่เติม 4 mM lactate เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2-3 วัน เป็นเวลา 6 วัน และล้างเซลล์บนแผ่นกรองขนาด 40 μm (Becton Dickinson, USA) เพื่อกำจัดเซลล์ที่ตายออกไป จากนั้นจะทำการเลี้ยงแบบ monolayer โดยย้ายก้อน EBs ไปยังจานเลี้ยงเซลล์ 4-well dish ที่เคลือบด้วย fibronectin โดยเลี้ยง 3-4 EBs/well แล้วเลี้ยงประมาณ 2-3 วัน ด้วยน้ำยา α-MEM เติมด้วย 5% FBS แล้วจึงนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยดูการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์

3.7 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

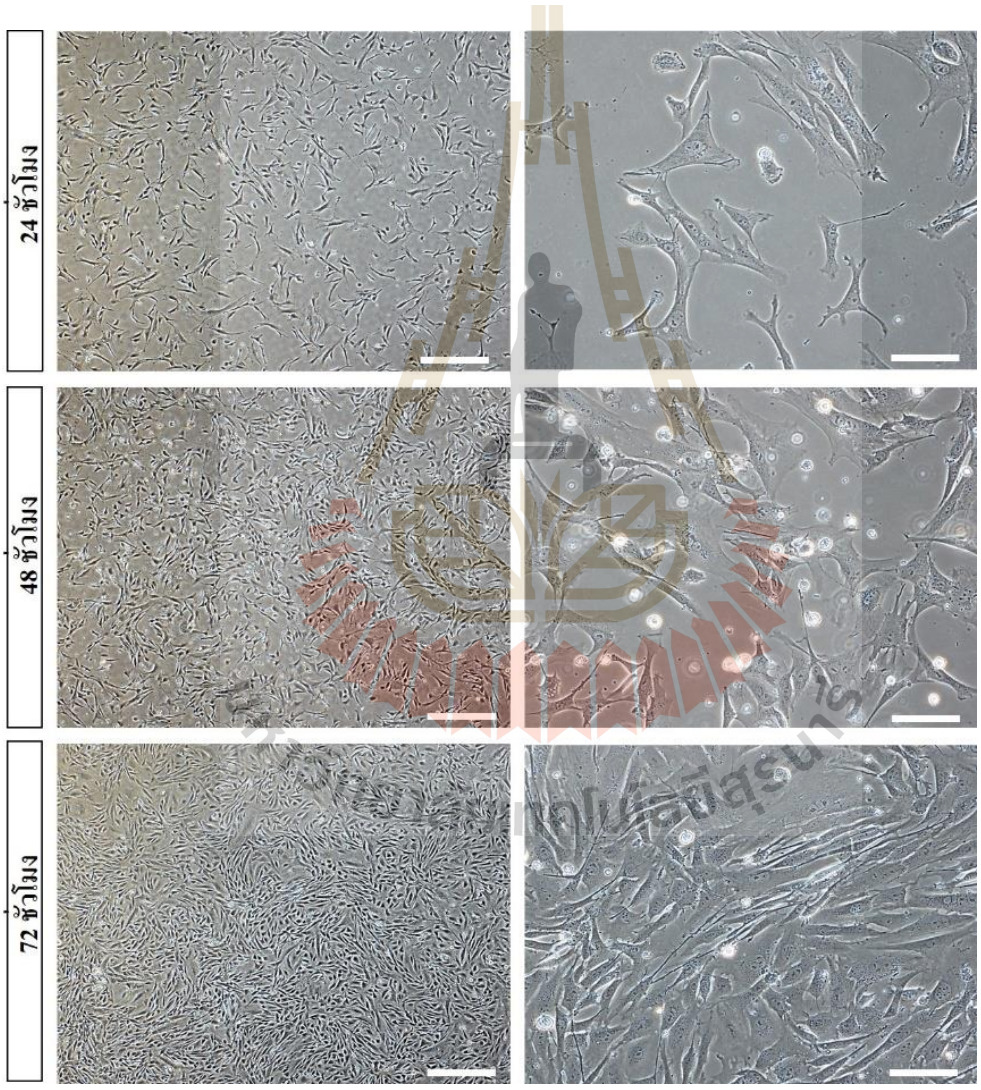
การตรวจการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์จะใช้วิธี Immunocytochemistry โดยนำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ผ่านการเหนี่ยวนำแล้วมาล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง และตรึงเซลล์ด้วย 4% PFA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดผลการจับกับโปรตีนอย่างไม่จำเพาะด้วย 10% Normal goat serum ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะนำไปบ่มกับ primary antibody ต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ได้แก่ mouse anti sarcomeric Alpha-Actinin (1:500), mouse anti Cardiac Troponin T (1:200, Santa Cruz Biotechnology) และ mouse anti Connexin-43 (1:500, Cell Signaling Technology, USA) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นบ่มกับ secondary antibody ที่ conjugated กับ AlexaFluor-488 (Alpha-Actinin) และ conjugated กับ Alexa Red (Cardiac Troponin T และ Connexin-43) (Molecular Probes) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในห้องมืด จากนั้นย้อมสี DAPI เพื่อดูนิวเคลียสด้วย เป็นเวลา 10 นาที ในห้องมืด และนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

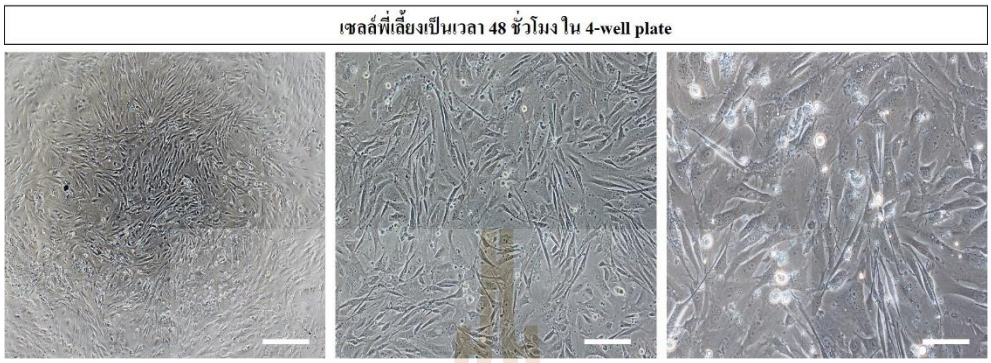
4.1.1 ผลการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง

เนื้อเยื่อที่ย่อยจากลูกอ่อนหนูถีบจักร เมื่อเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง นำออกมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบเซลล์รูปร่างลักษณะคล้ายรูปกระสวยเกาะอยู่ที่พื้นภาชนะเลี้ยงเซลล์ (**รูปที่ 1** บน) เมื่อทำการเลี้ยงต่ออีกประมาณ 1-2 วัน จะได้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 80-90% (**รูปที่ 1** กลาง-ล่าง)



รูปที่ 1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเซลล์ลูกอ่อนหนูถีบจักร ซ้าย กำลังขยาย 40x, ขวากำลังขยาย 200x

ในการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงที่ต้องใช้ Mitomycin C เพื่อหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบบลาสต์ แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงใน 4 well dish นาน 24-48 ชั่วโมง จะได้เซลล์พี่เลี้ยงมีความหนาแน่นที่ 70-80% และแผ่เรียงกันเป็น monolayer (**รูปที่ 2**) พร้อมนำไปใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดได้ภายใน 2-4 วัน ภายหลังการเตรียมในแต่ละครั้ง



รูปที่ 2 เซลล์พี่เลี้ยงที่จะนำไปเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก ซ้าย กำลังขยาย 40x, กลาง กำลังขยาย 100x, ขวา กำลังขยาย 200x

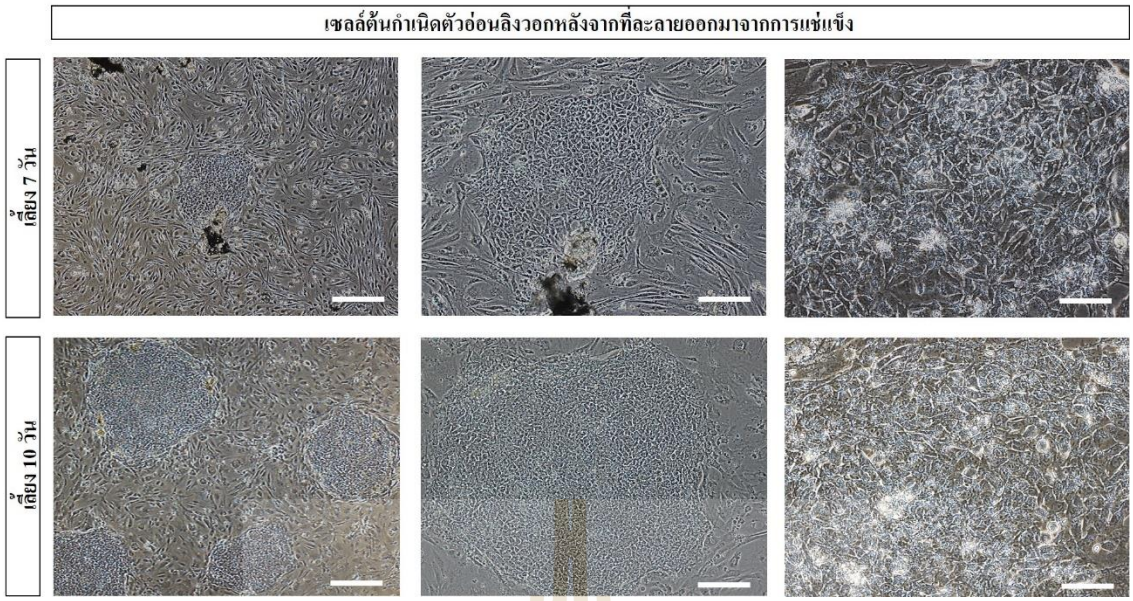
4.1.2. ผลการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก และการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกโดยวิธี Mechanical passaging

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่แซ่แข็งออกมาเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ 4-7 วัน จะเริ่มเห็นโคโลนี (**รูปที่ 3** บน) เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกประมาณวันที่ 7-14 วัน จะเห็นโคโลนีเจริญเติบโต และประมาณวันที่ 10-14 เซลล์จะเติบโตได้ประมาณ 70-80% (**รูปที่ 3** ล่าง) ซึ่งนำไป passage เพื่อเพิ่มจำนวนบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ต่อไป โดยใช้เข็มแก้วที่ทำเป็นรูปตะขอเกี่ยวตัดโคโลนีให้เป็นชิ้นเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มจากตัดแนวสีดำ (**รูปที่ 4** บน) แล้วจึงนำไปตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงจานใหม่อีกประมาณ 3-4 วัน จะได้เซลล์เจริญเติบโตที่ 70-80% (**รูปที่ 4** ล่าง)

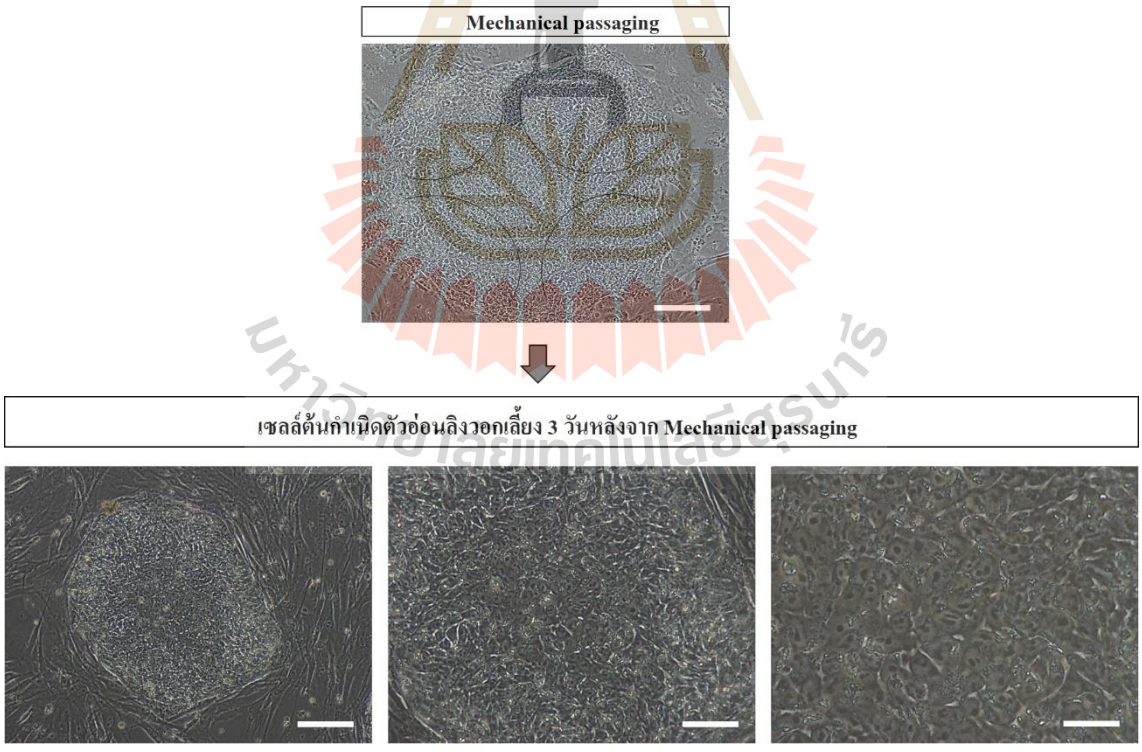
4.1.3. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก

จากการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่เลี้ยงได้ไปย้อมสีดูโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์และภายในนิวเคลียส โดยวิธี immunocytochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ pluripotent stem cell markers โดยจะพบ Nanog, Oct4 และ Sox2 แสดงออกภายในนิวเคลียส (Nuclear markers) และ SSEA-4, TRA-1-60 แสดงออกที่ผิวเซลล์ (Cell surface markers) (**รูปที่ 5**) และจะพบเซลล์ย้อมติด AP (**รูปที่ 5** ล่างขวา)

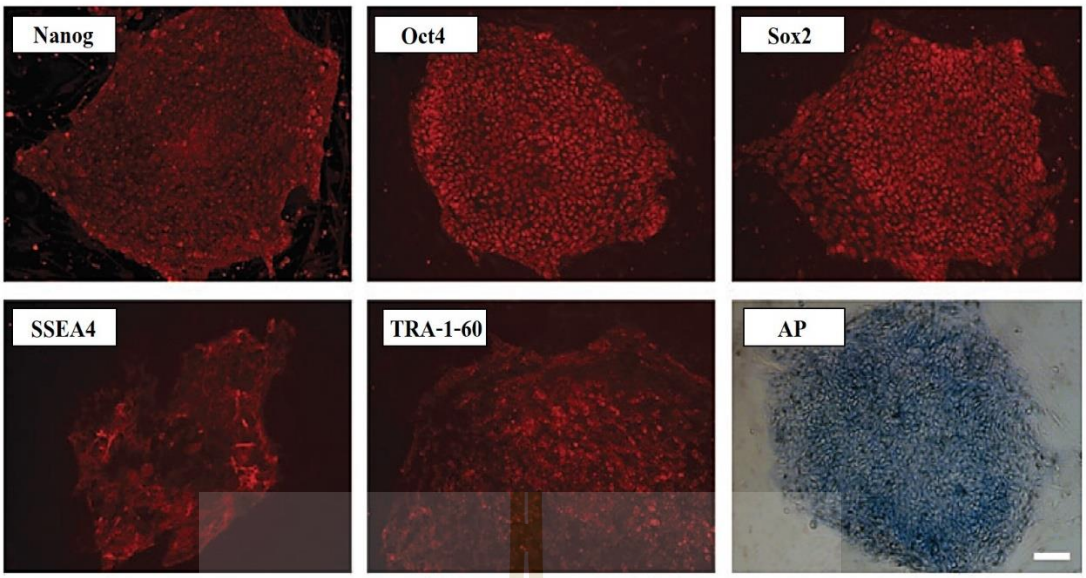
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3 เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกที่ละลายออกมาจากการแช่แข็ง ซ้าย กำลังขยาย 40x, กลาง กำลังขยาย 100x, ขวา กำลังขยาย 200x



รูปที่ 4 การ subculture เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก บน กำลังขยาย 100x, ล่างซ้าย กำลังขยาย 40x, ล่างกลาง กำลังขยาย 100x, ล่างขวา กำลังขยาย 200x



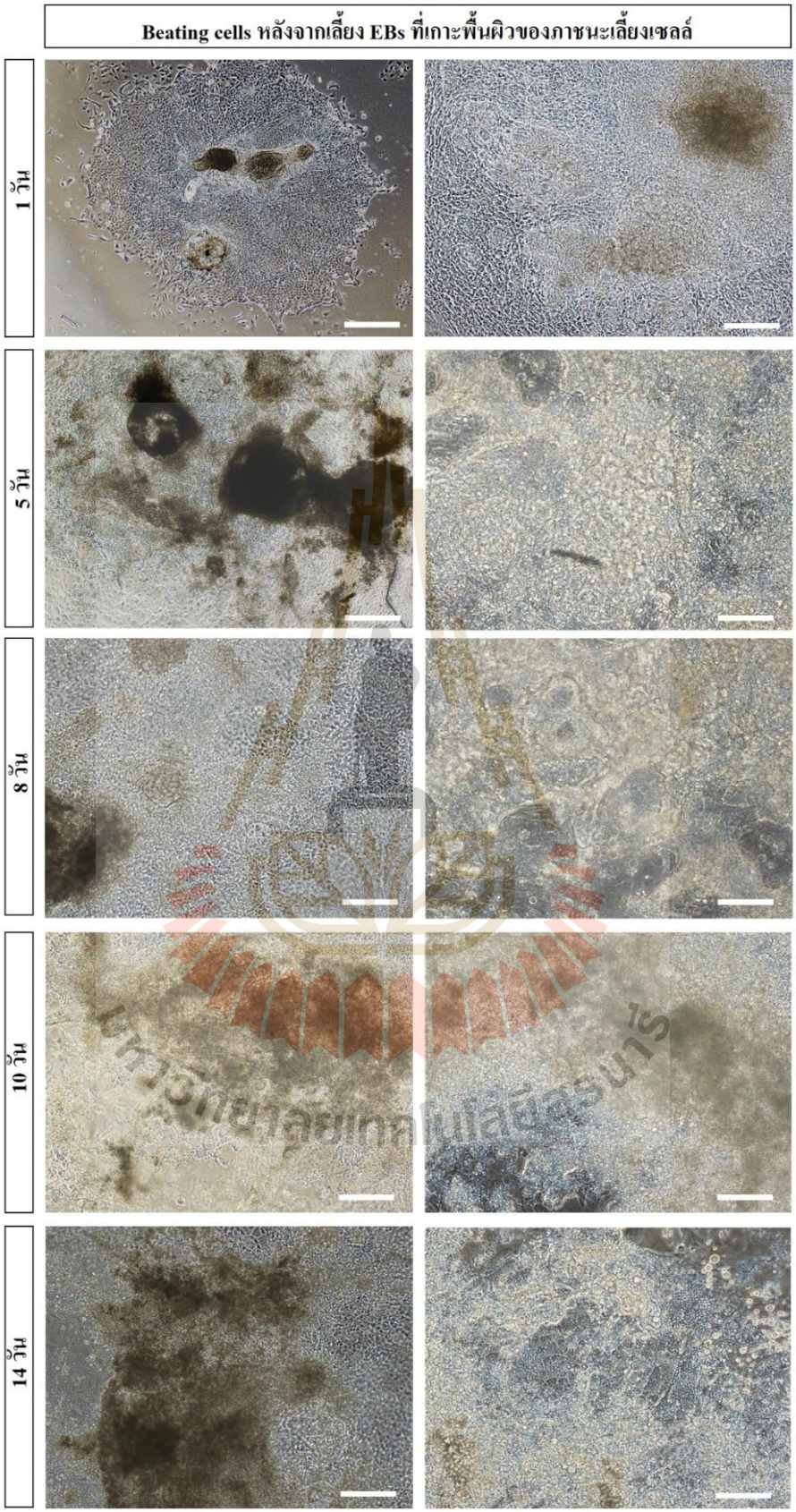
รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอก ที่มีการแสดงออกของ Nanog, Oct4, SSEA4, TRA-1-60 และ AP กำลังขยาย 200x

4.1.4. ผลการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่าน EBs และการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่าน EBs โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงแบบแขวนลอยในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไมมี bFGF ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ low attachment culture dish ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงได้ 7-10 วันจะได้ก้อน EB ลักษณะกลม (**รูปที่ 6**) ซึ่งจะพบเซลล์ประมาณร้อยละ 1-10 ที่มีการบีบหดตัวซึ่งแสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อนำก้อน EBs ที่เลี้ยงนานประมาณ 20 วัน ไปเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มีกลูโคสโดยเติม 4 mM lactate เป็นเวลา 6 วัน แล้วกรองแยกเซลล์ตายออก แล้วนำไปเลี้ยงแบบ monolayer ใน 4-well dish ที่เคลือบด้วย fibronectin โดยเลี้ยงต่ออีก14 วัน (**รูปที่ 7**) แล้วจึงนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยดูการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของ Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43 (**รูปที่ 8**) ซึ่งเป็น marker ที่เฉพาะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

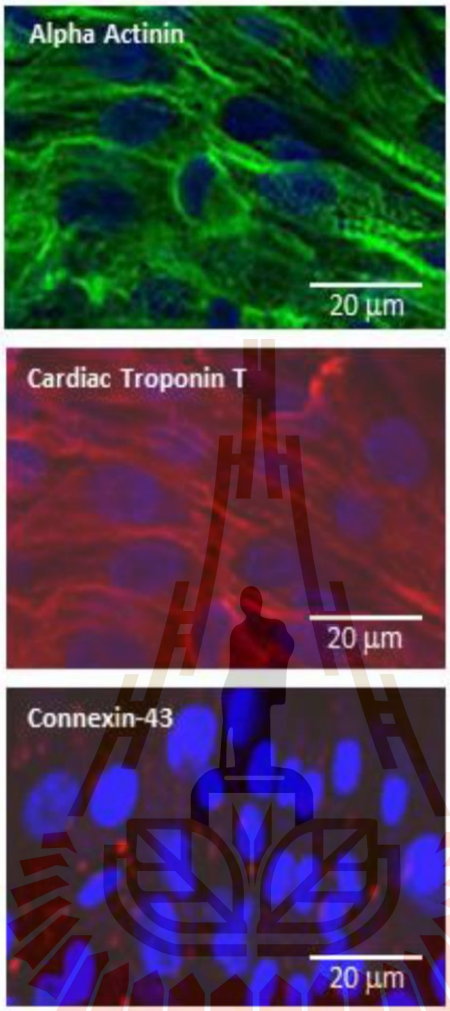
รูปที่ 6 การสร้าง Embryoid bodies ซ้าย กำลังขยาย 40x, กลาง กำลังขยาย 100x,

ขวา กำลังขยาย 200x



รูปที่ 7 เซลล์ที่เจริญเปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกเป็น Beating cells

ซ้าย กำลังขยาย 40X, ขวา กำลังขยาย 200X



รูปที่ 8 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่มีการแสดงออกของ Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน หรือ เซลล์ iPSCs ของมนุษย์ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แล้วนำไปปลูกถ่ายให้สัตว์ทดลองที่เป็นโมเดลของโรค MI ในสัตว์ตระกูลหนู สุกร โดยเฉพาะสัตว์ตระกูลลิง เป็นสิ่งที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญเพื่อนำไปใช้ในมนุษย์ในอนาคต จากรายงานของ Chong และคณะ (2014) ซึ่งเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แล้วนำไปปลูกถ่ายให้ลิงกังที่เป็นโมเดลของโรค MI ซึ่งได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่ยังคงมีปัญหาเรื่องการที่ต้องฉีดยากดภูมิคุ้มกันให้สัตว์ก่อนการปลูกถ่ายเพื่อป้องกันการต่อต้านเซลล์จากมนุษย์ ซึ่งทำให้ผลการทดลองขาดข้อมูลทางด้านสัญญาณทางสรีรวิทยา และการทำงานของเซลล์ได้จริงของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมนุษย์ในหัวใจสัตว์ทดลอง นอกจากนี้การปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้ให้ผู้ป่วยยังมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดเนื้องอก เนื่องจากยังมีเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นจึงควรหาวิธีผลิตเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจให้มีประสิทธิภาพในปริมาณที่มากพอใช้และต้องหาวิธีแยกเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจซึ่งจะนำไปสู่การรักษาด้วยการปลูกถ่ายที่มีประสิทธิภาพที่สุด (Tohyama และคณะ, 2013) หัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) มีเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอยู่ประมาณ 600 ล้านเซลล์ ดังนั้นจึงต้องการเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจประมาณ 100 ล้านเซลล์เพื่อใช้ปลูกถ่ายให้ผู้ป่วย (Hattoti และ Fukuda, 2012) ดังนั้นจึงต้องพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน หรือเซลล์ iPSCs ให้มีประสิทธิภาพทั้งด้านปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำไปใช้ และทำให้มีความบริสุทธิ์ไม่มีเซลล์อื่นปนเปื้อน การศึกษาวิจัยการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน หรือเซลล์ iPSCs ของสัตว์ตระกูลลิง เช่นลิงวอก ให้ได้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แล้วนำไปปลูกถ่ายให้ลิงวอกที่เป็นโมเดลของโรค MI จะทำให้ได้ข้อมูลที่ตรงประเด็นที่สุด เพราะทำในสัตว์ชนิดเดียวกัน ซึ่งเมื่อได้ผลดีแล้วจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้รักษาในมนุษย์ต่อไป

Schwanke และคณะ (2006) เป็นทีมวิจัยแรกที่รายงานการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยผ่านการเลี้ยงแบบแขวนลอยให้ได้ EB น้ำยาที่ใช้เลี้ยงไม่ได้เติมสารเคมีหรือโกรทแฟคเตอร์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำ ทำให้ได้ประสิทธิภาพต่ำ การวิจัยนี้ได้นำวิธีการที่รายงานโดย Tohyama และคณะ (2013) ที่เหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และเซลล์ iPSCs มนุษย์ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยผ่านการทำให้เกิด EB แล้วนำ EB ไปเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี glucose และไม่มี pyruvate และเติม lactate ทำให้ได้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอย่างน้อย 95% หลักการของขั้นตอนการใช้ lactate คือกล้ามเนื้อหัวใจของลูกอ่อนจะใช้ lactate ในการสร้างพลังงาน ซึ่งต่างจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของตัวเต็มวัยที่ใช้กลูโคสในการสร้างพลังงาน (Fisher และคณะ, 1981; Neely และ Morgan, 1974; Werner และ Sicard, 1987) ซึ่งการทดลองนี้พบว่าสามารถเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ดี โดยมีการแสดงออกของ marker ที่สำคัญของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ก่อนหน้านี้มี

รายงานของ Zhang และคณะ (2017) ที่เหนี่ยวนำเซลล์ iPSCs ลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ผ่านการทำให้ได้ EB โดยใช้ CHIR99021 (CHIR) ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเล็กที่ยับยั้ง glycogen synthesis kinase 3 (GSK3) และ IWR-1 ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเล็กที่ยับยั้ง Wnt signaling แล้วเลี้ยงต่อในน้ำยาที่เติมด้วย retinoic acid ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ได้ทั้งเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องบนและห้องล่าง นอกจากนี้ Lin และคณะ (2018) ได้รายงานการเหนี่ยวนำเซลล์ iPSCs ลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ผ่านการทำให้ได้ EB เริ่มโดยใช้ CHIR กระตุ้นให้ได้เซลล์ของเนื้อเยื่อ early mesoderm แล้วใช้โกรทแฟคเตอร์ 3 ตัว คือ BMP4, Activin A, และ FGF2 แล้วเติม IWP2 ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง Wnt signaling ซึ่งทำให้ได้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในปริมาณที่สูงมาก จะเห็นได้ว่าการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีสองวิธีการหลักคือผ่านการทำ EB และไม่ผ่านการทำ EB โดยเลี้ยงแบบ monolayer มีการทำให้ได้ปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่มากขึ้นโดยการเปลี่ยนสารตั้งต้นในการสร้างพลังงานของเซลล์ การใช้สารโมเลกุลเล็กที่ไปยับยั้ง Wnt signaling และยับยั้ง GSK3 และการใช้โกรทแฟคเตอร์

หมายเหตุ

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ไม่ได้รับงบประมาณการวิจัยในปีที่ 2 จึงทำให้ไม่สามารถทำวิจัยในส่วนที่เหลือได้แก่ การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยเลี้ยงแบบ monolayer และการแยกเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิค Immunomagnetic โดยใช้ Alpha-Actinin antibody ที่ conjugated กับ metal bead จึงทำให้การวิจัยนี้ยังไม่สำเร็จครบถ้วนตามที่เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 6
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

6.1.1 สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดลิงวอกให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้

6.1.2 เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ผลิตได้มีการแสดงออกของ marker ที่สำคัญได้แก่ Alpha Actinin, Cardiac Troponin T และ Connexin-43

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ควรมีการทำการทดลองเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดลิงวอกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยเลี้ยงแบบ monolayer

6.2.2. ควรมีการทำการทดลองแยกเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิค Immunomagnetic หรือวิธีการอื่นๆที่มีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Williams, J., Rayner, M. and Townsend, N. 2015. The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014. ***Heart.*** 101: 1182-189.

Boheler, K. Czyz, R., J., Tweedie, D., Yang, H.-T., Anisimov, S. V. and Wobus, A. M. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. ***Circ. Res.*** 91: 189-201.

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

Chen, S. S., Revoltella, R. P., Papini, S., Michelini, M., Fitzgerald, W., Zimmerberg, J., and Margolis, L. 2003. Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cell in three-dimensional culture systems. ***Stem Cells*** 21: 281-295.

Chen, S. S., Revoltella, R. P., Zimmerberg, J. and Margolis, L. 2006. Differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional collagen matrix. ***Embryonic Stem Cell Protocols, Springer:*** 431-443.

Chong, J.J.H., Yang, X., Don, C.W., Minami, E., Liu, Y.W., Weyers, J. J., Mahoney Jr., W.M., Biber, B.V., Cook, S.M., Palpant, N.J., Gantz, J., Fugate, J.A., Muskheli, V., Gough, G.M., Vogel, K.W., Astley, C.A., Hotchkiss, C.E., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, E.A., Nelson, V., Kiem, H.-P., Laflamme, M.A. and Murry, C.E. 2014. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. ***Nature*** 510: 273-277.

Chotiyarnwong, C. and Harnphadungkit, K. 2015. Epidemiological characteristics of outpatients in Cardiac Rehabilitation Unit, Siriraj Hospital. ***J. Thai Rehabil. Med.*** 25: 30-38.

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

Davila, J. C., Cezar, G. G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T. and Trosko, J. 2004. Use and application of stem cells in toxicology. ***Toxicol. Sci.*** 79: 214-223.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

Fisher, D.J., Heymann, M.A. and Rudolph, A.M. 1981. Myocardial consumption of oxygen and carbohydrates in newborn sheep. ***Pediatr. Res.*** 15: 843-846.

Hattori, F. and Fukuda, K. 2012. Strategies for replacing myocytes with induced pluripotent stem in clinical protocols. Transplant Rev. (Orlando). 26: 223-232.

Honig, G., Li, F., Lu, S.-J. and Vida, L. 2004. Hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells. ***Blood Cells Mol Dis.*** 32: 5-10.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. and Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. ***J Clin Invest.*** 108: 407.

Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y. and Field, L. J. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts. ***J. Clin. Invest.*** 98: 216.

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

Laowtammathron, C., Cheng, E. C., Cheng, P.-H., Snyder, B. R., Yang, S.-H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.-C., Parnpai, R. and Chan, A. W. 2010. Monkey hybrid stem cells develop cellular features of Huntington's disease. ***BMC Cell Biol.*** 11: 12.

Lin, Y., Liu, H., Klein, M., Ostrominski, J., Hong, S. G., Yada, R. C., Chen, G., Navarengom, K., Schwartzbeck, R., San, H., Yu, Z. X., Liu, C., Linask, K., Beers, J., Qiu, L., Dunbar, C. E., Boehm M. and Zou, J. 2018. Efcient diferentiation of cardiomyocytes and generation of calcium-sensor reporter lines from nonhuman primate iPSCs. ***Scientific Reports.*** 8: 5907.

Mendis, S., Davis, S. and Norrving, B. 2015. Organizational update The World Health Organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular Disease. ***Stroke.*** 46: e121-e122.

Min, J.-Y., Yang, Y., Converso, K. L., Liu, L., Huang, Q., Morgan, J. P. and Xiao, Y.-F., 2002. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. ***J. Appl. Phys.*** 92: 288-296.

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

Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., de Ferranti, S., Despres, J.-P., Fullerton H. J. and Howard, V. J. 2015. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American heart association. ***Circulation.*** 131: e29.

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

Neely, J.R. and Morgan, H.E. 1974. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. ***Annu. Rev. Physiol.*** 36, 413-459.

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

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

Schwanke, K., Wunderlich, S., Reppel, M., Winkler, M. E., Matzkies, M., Groos, S., Itskovitz-Eldor, J., Simon, A.R., Hescheler, J., Haverich, A. and Martin, U., 2006. Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem Cells. ***Stem Cells.*** 24: 1423-1432.

Segers, V. F. and Lee, R. T. 2008. Stem-cell therapy for cardiac disease. ***Nature.*** 451: 937-942.

Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., Egashira, T., Seki, T., Naoto Muraoka, Yamakawa, H., Ohgino, Y., Tanaka, T., Yoichi, M., Yuasa, S., Murata, M., Suematsu, M. and Fukuda,

K. 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. ***Cell Stem Cell.*** 12: 127-137.

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.

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

Wang, X., Jin, L., Ji, S., Guo, X., Chen, H. and Ji, W. 2011. Hepatocytic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells promoted by collagen gels and growth factors. ***Cell Biol. Int.*** 35: 775-781.

Werner, J.C. and Sicard, R.E. 1987. Lactate metabolism of isolated, perfused fetal, and newborn pig hearts. ***Pediatr. Res.*** 22: 552–556.

Wobus, A. M., Wallukat, G. and Hescheler, J. 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca^{2+} channel blockers. ***Differentiation*** 48: 173-182.

Zhang, Cao, H., Bai, S., Huo, W. and Ma, Y., 2017. Differentiation and characterization of rhesus monkey atrial and ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Res.*** 20: 21-29.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

CV รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เกิดวันที่ 7 มีนาคม 2502

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)

5.5.4. Asian Reproductive Biotechnology Society

5.5.5. Thai Society for Biotechnology

5.5.6. Thai Society for Reproductive Medicine

5.5.7. Thai Society for Animal Reproduction

5.5.8. Thai Society for Gametes and Embryo Research

5.5.9. Society for Stem Cell Research

6. ประวัติการทำงาน:

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

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

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

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

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

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

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

9. ผลงานตีพิมพ์ย้อนหลัง 7 ปี

2020

Yuanyuan Liang, Ton Yoisungnern, Yanni Huang, **Rangsun Parnpai,*** 2020. Effects of Lcarnitine on embryo development of vitrified swamp buffalooocytes following in vitro fertilization. ***Livestock Sci.*** doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103933

2019

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

Wachira Panta, Sumeth Imsoonthornruksa, Ton Yoisungnern, Sanong Suksaweang, Mariena Ketudat-Cairns and **Rangsun Parnpai.*** 2019. Enhanced hepatogenic differentiation of human Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells by using three-step protocol. ***Int. J. Mol. Sci.*** 20: 3016; doi:10.3390/ijms20123016.

2018

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

Liang, Y. and **Parnpai, R.*** 2018. Effect of vitrification procedures on the subsequent development of *in vitro* matured swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. ***Anim. Sci. J.*** DOI: 10.1111/asj.13044

Licia Colli, Marco Milanesi, Elia Vajana, Daniela Iamartino, Lorenzo Bomba, Francesco Puglisi, Marcello Del Corvo, Ezequiel L. Nicolazzi, Sahar S. E. Ahmed, Jesus R. V. Herrera, Libertado Cruz, Shujun Zhang , Aixin Liang, Guohua Hua,Liguo Yang, Xingjie Hao, Fuyuan Zuo, Song-Jia Lai , Shuilian Wang, Ruyu Liu, Yundeng Gong, Mahdi Mokhber, Yongjiang

Mao, Feng Guan, Augustin Vlaic, Bogdan Vlaic, Luigi Ramunno, Gianfranco Cosenza, Ali Ahmad, Ihsan Soysal, Emel Ö. Ünal, Mariena Ketudat-Cairns, José F. Garcia, Yuri T. Utsunomiya, Pietro S. Baruselli, Maria E. J. Amaral, **Rangsun Parnpai,** Marcela G. Drummond, Peter Galbusera, James Burton, Eileen Hoal 31, Yulnawati Yusnizar, Cece Sumantr, Bianca Moioli, Alessio Valentini, Alessandra Stella, John L. Williams and Paolo Ajmone-Marsan. 2018. New Insights on Water Buffalo Genomic Diversity and Post-Domestication Migration Routes From Medium Density SNP Chip Data. ***Frontiers Genetics.*** 9: 53: 1-17.

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

2017

Ye, D., Heraud, P., **Parnpai, R.*** and Li, T. 2017. Reversal of experimental liver damage after transplantation of stem-derived cells detected by FTIR spectroscopy. ***Stem Cell Intl.*** 4585169

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of storage tube material and resveratrol during liquid storage of matured bovine oocytes on subsequent development. ***Acta Veterinaria Hungarica*** 65: 546–555.

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2017. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12892.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2017. Survival and developmental competence of bovine embryos at different developmental stages and separated blastomeres after vitrification in different solutions. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/asj.12890

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

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

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

2016

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

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

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

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

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

2015

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

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

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

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

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

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

2014

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2013

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

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

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

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

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

2012

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

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

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., Parnpai, R.*, Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat

embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14: 79-87.

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

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

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

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

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

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

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

2011

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

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

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

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

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

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ "ตูมตาม" โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน"ตูมตาม"เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

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

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

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

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

11.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.4. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

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

11.6. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.7. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.8. ศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

12. การจดสิทธิบัติ

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี