รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือเพื่อสร้าง humanized mice เพื่อเตรียมใช้ในการทดสอบวัคซีนเอดส์ในระดับก่อนการทดสอบในมนุษย์

Isolation of human hematopoietic stem cells from cord blood to construct humanized mice for HIV vaccine in Pre-clinical testing

คณะผู้วิจัย

ดร.สุณี ศิริวิชยกุล[1]

อ.ดร.เอกชัย พรหมเพชร[2]

นายภัทรวัจน์ ตันติวรสิทธิ์[1]

สพ.ญ. ดร.นิธิรา อนัคกุล[3]

ศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม[1]

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2]ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[3]ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

- ศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม และ ผศ.น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ ในโครงการวิจัยนี้

- ภาควิชาอายุรศาสตร์ และ Chula-VRC คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

- ภาควิชาสูติศาสตร์นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บเลือดจากสายสะดือ

- สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2558

ดร.สุณี ศิริวิชยกุล และคณะ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

บทคัดย่อ

ในความพยายามที่จะหาสัตว์ทดลองที่จะใช้ทดสอบวัคซีนเพื่อให้ได้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใกล้เคียงกับคนที่สุดนั้น humanized mice model เป็นทางเลือกที่สามารถให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใกล้เคียงกับการตอบสนองในคนมากที่สุด กล่าวคือ humanized mice เป็นหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคน (CD34+ human hematopoietic stem cells) ที่แยกได้จากเลือดที่เจาะจากสายสะดือทารกแรกคลอด เพื่อให้เซลล์ต้นกำเนิดของคนไปเจริญเติบโตเป็นเซลล์ที่รับผิดชอบต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น lymphocytes และ macrophages ในหนู โดยถือว่าการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดประสบความสำเร็จ ต่อเมื่อสามารถตรวจพบเซลล์ที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของคนได้มากกว่า 20% เมื่อเจาะเลือดหนูมาตรวจ จากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 200,000 เซลล์แก่ลูกหนูแรกคลอดอายุระหว่าง 3-5 วัน จำนวน 57 ตัว พบว่ามีลูกหนูเพียง 13/57 (22.8%) ที่มีเซลล์ภูมิคุ้มกันของคนอยู่มากกว่า 20% แต่มีเพียง 8 ตัวที่รอดชีวิตอยู่จนสามารถนำมาทดสอบวัคซีนได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเซลล์ภูมิคุ้มกันของคนอยู่ที่ 56.7% (24.5), range 22.9-89.2% ก่อนที่จะมีการฉีดวัคซีน หนู 6 ตัวได้รับ Asian mosaic HIV DNA vaccine โดยการฉีดเข้ากล้ามและตามด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electroporator) ในปริมาณ 100 ไมโครกรัม 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ และทำการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากฉีดเข็มที่ 3 ครบ 1 สัปดาห์ ในขณะที่หนูอีก 2 ตัวเป็น negative control ซึ่งถูกฉีดด้วย plasmid vector (pCMVkan) การศึกษานี้ตรวจการตอบสนองทางด้านแอนติบอดีด้วยวิธี western blot เพื่อดูว่าหนูมีการสร้าง anti-gp41, anti-gp120 หรือ anti-gp160 หรือไม่ ซึ่งผลของการทดลอง พบว่าหนูไม่มีการสร้างแอนติบอดีดังกล่าวเลย คณะผู้วิจัยตรวจการตอบสนองทางด้านเซลล์ด้วยวิธี ELISpot โดยกระตุ้นเซลล์ด้วย pooled peptides ของ HIV-1 CRF01_AE และ HIV-1 B พบว่า มีหนู 1 ตัว ที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE ที่ 90.7 SPC (spot forming cells)/10^6 splenocytes และตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 B pooled peptides ที่ 153.3 SPC/10^6 splenocytes และหนู 1 ตัว มีเพียงการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 B pooled peptides ที่ 85.3 SPC/10^6 splenocytes โดยที่ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE pooled peptides ผลการศึกษาแสดงว่า humanized mice model นี้สามารถนำมาใช้ทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนในระดับ pre-clinical ได้ แต่ขบวนการผลิต humanized mice จะต้องได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากกว่านี้

Abstract

Humanized mouse model is an alternative attempt to find a suitable animal model for vaccine testing that closely mimics the immune response in human. Humanized mice are engrafted with CD34+ human hematopoietic stem cells (HSCs) isolated from human cord blood. HSCs will then proliferate and differentiate to immune cells, i.e., lymphocytes and macrophage in mice. The engraftment is considered successful if higher than 20% human immune cells are detected in mice. Thirteen out of fifty-seven (22.8%) 3-5 day old new born mice were successfully engrafted with 200,000 HSCs but only 8 survived long enough to allow for HIV DNA vaccine testing. Mean and standard deviation (SD) of engrafted cells were 56.7% (24.5) with range from 22.9-89.2% before vaccination. Among these 8 mice, 6 were immunized intramuscularly followed by electroporation with 100 μg Asian mosaic HIV envelope DNA vaccine (mosaic 1-3) 3 times, once every 2 weeks. The other 2 mice served as negative controls, being immunized with plasmid vector (pCMVkan). All mice were sacrificed 1 week after the last immunization. For humoral immune response, none of the mice produced anti-gp41, anti-gp120 or anti-gp160 as determined by Western blot. ELISpot assay was used to measure cell-mediated immune response. One mouse responded to both HIV-1 CRF01_AE and HIV-1 B stimulation at 90.7 SPC (spot forming units)/10^6 splenocytes and 153.3 SFU/10^6 splenocytes, respectively. Another mouse responded to only HIV-1 B stimulation at 85.3 SFU/10^6 splenocytes without any response to HIV-1 CRF01_AE stimulation. Our study indicates that humanized mouse model can be used in pre-clinical testing of vaccine intended for human use. However, method of producing humanized mice needs to be improved further.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ---------- I
บทคัดย่อ (ไทย) ---------- II
บทคัดย่อ (English) ---------- III
สารบัญเรื่อง (Table of Contents) ---------- IV
สารบัญตาราง (List of Table) ---------- V
สารบัญภาพ (List of Illustrations) ---------- VI
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations) ---------- VII

บทนำ ---------- 1
เนื้อเรื่อง ---------- 4
วิจารณ์ผลการทดลอง ---------- 11
สรุปและเสนอแนะ ---------- 13
บรรณานุกรม ---------- 13
ภาคผนวก ---------- 16
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด ---------- 17

สารบัญตาราง (List of Table)

ตารางที่ 1 สรุปปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human CD45+ cells) ที่พบในหนูก่อนฉีด HIV DNA vaccine (before immunization) และปริมาณ human CD45+, CD4+ และ CD8+ cells ในหนูที่ถูก sacrified (Termination) ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างในเลือดและในม้าม (spleen)---------หน้า 9

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ CD34+ cells จากตัวอย่างที่ 1---------- หน้า 6

รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ CD34+ cells จากตัวอย่างที่ 1---------- หน้า 6

รูปที่ 3 กลุ่มของเซลล์ตัวอ่อนของ CD34+ cells หลังจากเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง------ หน้า 7

รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์การย้อมเซลล์ด้วย anti-human CD45 (เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน) และ anti- mouse CD45 (เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู) หลังปลูกถ่ายด้วยเซลล์ต้นกำเนิด 8 สัปดาห์----------หน้า 8

List of Abbreviations

HLA	: Human Leukocyte Antigen
HSCs	: Hematopoietic Stem Cells
rads	: dose of radiation
NSG	: NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$
IMDM	: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
IL-3	: Interleukin 3
IL-6	: Interleukin 6
CSF	: Colony Stimulating Factor
Anti-gp41	: anti-glycoprotein 41
Anti-gp120	: anti-glycoprotein 120
Anti-gp160	: anti-glycoprotein 160
ELISpot	: Enzyme-Linked Immunospot
SFU	: Spot Forming Units
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
CRF	: Circulating Recombinant Form
Env	: envelope
GVHD	: Graft Versus Host Disease
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
IL-4	: Interleukin 4
BAFF	: B cell activating factor belong to the TNF family
TNF	: Tumor necrosis factor

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การทดสอบวัคซีนสำหรับโรคติดเชื้อต่างๆ ต้องผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยเริ่มจากสัตว์เล็ก เช่น หนูหรือกระต่าย ไปจนถึงสัตว์ใหญ่เช่นลิง (non-human primates) ก่อนที่จะสามารถทำการทดสอบในคนได้ ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งคือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองเหล่านี้ยังไม่สามารถตอบคำถามสำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในคนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากระบบ HLA (Human Leukocyte Antigen) ที่แตกต่างกันระหว่างสัตว์ทดลองกับคน ราคาของลิง (non-human primates) ก็ค่อนข้างสูงมาก ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญอีกประการหนึ่งของการทดสอบวัคซีน การใช้ humanized mice ดูเหมือนจะเป็นทางออกวิธีหนึ่งที่จะแก้อุปสรรคดังกล่าว กล่าวคือ humanized mice จะเป็นหนูที่ไม่มีเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของตัวเอง แต่ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคนเข้าสู่ตัวหนู การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจึงมาจากการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันของคน และราคาต่อตัวรวมทั้งค่าเลี้ยงดูก็ถูกกว่าลิง มีการใช้ humanized mice ในการทดสอบต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น โรคมะเร็ง (human malignancies), โรคติดเชื้อ การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดของคน (human hematopoietic lymphoid systems) และการศึกษาประสิทธิภาพของยาและวัคซีน เป็นต้น

การเตรียม humanized mice สามารถทำได้โดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคน (CD34+ human hematopoietic stem cells, HSCs) ซึ่งแยกได้จากเลือดที่เจาะจากสายสะดือ (cord blood) ของคนเข้าสู่หนู Rag2-/-gc-/- ซึ่งเป็นหนูที่ไม่มี mature lymphocytes และ NK cells ทาง intrahepatic มีผู้รายงานผลการเปรียบเทียบระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมจาก fresh หรือ frozen cord blood ในหนู พบว่า การใช้ fresh cord blood จะให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีกว่า คณะผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะใช้ fresh cord blood ในการเตรียม CD34+ human hematopoietic stem cells เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายเข้าสู่หนูสำหรับใช้ทดสอบ HIV DNA vaccine และวัคซีนอื่นๆ เช่น house dust mite allergy vaccine, dengue vaccine ในอนาคต (อาจใช้ cryopreserved cord blood ที่ขอจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยในกรณีที่หาผู้บริจาค fresh cord blood ไม่ได้จริงๆ) โครงการการเก็บ cord blood นี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **เลขที่ 537/55** เรียบร้อยแล้ว ส่วนโครงการ "การแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือเพื่อเตรียม humanized mice เพื่อใช้ในการทดสอบวัคซีนเอดส์ในระดับ Pre-clinical" ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการเลี้ยง การใช้ และการผลิตสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย **เลขที่โครงการ** 1473005 โดยในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยจะใช้ humanized mice ในการทดสอบ HIV DNA vaccine ก่อน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเตรียม humanized mice model โดยการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือ (cord blood) และปลูกถ่ายเข้าสู่หนู Rag2-/- gc-/- เพื่อใช้ในการทดสอบวัคซีนในระดับ Pre-clinical
2. เพื่อทดสอบ HIV DNA vaccine (โดยสามารถเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลการทดสอบในลิงที่ดำเนินการไปแล้ว)

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็นการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากสายสะดือเพื่อการเตรียม humanized mice เพื่อใช้ในการทดสอบ HIV DNA vaccine

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในการทดสอบวัคซีนเพื่อดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง อาจได้ผลหรือข้อสรุปที่ไม่ชัดเจนหรือไม่ถูกต้องตามที่ควรจะเป็นเช่นเดียวกับการทดสอบในคน เนื่องจากสัตว์ทดลองเช่น หนูหรือลิงมีเซลล์ที่รับรู้และตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune cells) ที่ต่างจากคน และมีโมเลกุลที่รับรู้สิ่งแปลกปลอม (human leukocyte antigen, HLA) ที่แตกต่างกัน ทำให้รับรู้สิ่งแปลกปลอมได้ไม่เหมือนกัน ส่งผลให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน อย่างเช่นการทดสอบ HIV vaccine ในหนูหรือในลิงซึ่งให้ผลการทดสอบดี แต่กลับให้ผลการทดสอบที่ไม่ดีในคน แต่เนื่องจากการทดสอบวัคซีนต่างๆ ดังกล่าวต้องผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อดูความปลอดภัยก่อนที่จะสามารถทดสอบในคนได้ การสร้าง humanized mice จึงเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจาก humanized mice ได้รับการปลูกถ่าย immune cells ของคน จึงทำให้ได้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใกล้เคียงหรือเปรียบเสมือนกับการทดสอบในคน

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การใช้ humanized mice มีข้อได้เปรียบกว่าการทดสอบในหนูทดลองทั่วๆ ไปคือ humanized mice จะได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคนเข้าไป การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจึงมาจากการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันของคน[1] มีการใช้ humanized mice ในการทดสอบต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น โรคมะเร็ง (human malignancies)[2-3], โรคติดเชื้อ[4-6] การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดของคน (human hematopoietic lymphoid systems)[7-9] และการศึกษาประสิทธิภาพของยาและวัคซีน[10-11] เป็นต้น

การเตรียม humanized mice สามารถทำได้โดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคน (CD34+ human hematopoietic stem cells, HSCs) ซึ่งแยกได้จาก cord blood เข้าสู่หนู Rag2-/-gc-/- ซึ่งเป็นหนูที่ไม่มี mature lymphocytes และ NK cells[12] ทาง intrahepatic มีผู้รายงานผลการเปรียบเทียบระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่เตรียมจาก fresh หรือ frozen cord blood ในหนู พบว่า การใช้ fresh cord blood จะให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีกว่า[13]

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ humanized mice เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนเอดส์ ซึ่งอาจนำไปสู่การศึกษาวิจัยวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น วัคซีนไข้เลือดออก (Dengue vaccine), หรือวัคซีนป้องกันภูมิแพ้ไรฝุ่น (House dust mite allergy vaccine) รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับ โรคมะเร็ง เป็นต้น

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

(1) ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ผู้สนใจการทดสอบวัคซีนใน humanized mice เช่น Dengue, leptospirosis, allergy vaccine

(2) เสนอผลการวิจัยต่อกลุ่มนักวิจัยทั่วไปที่สนใจ

(3) ตีพิมพ์ผลการวิจัย ในวารสารเกี่ยวกับวัคซีน

เนื้อเรื่อง (Main Body) Materials & Methods, Results ฯลฯ

<u>วัสดุ และวิธีการ</u>

ขอตัวอย่าง cord blood จากหญิงตั้งครรภ์ประมาณ 20 ราย เพื่อใช้ในการเตรียม CD34+ human hematopoietic stem cells โดยจะขอบริจาคจากหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากท้องคลอด (เลือกการผ่าท้องคลอด) ที่แผนกสูติศาสตร์นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีการลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยเป็นหลักฐาน (โครงการนี้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 537/55) เมื่อแยกเป็น CD34+ human hematopoietic stem cells โดยใช้ positive magnetic selection (CD34+MicroBead-Kit, STEMCELL Technologies) แล้วก็นำไปปลูกถ่ายเข้าสู่หนู Rag2-/-gc-/- ที่เป็นหนูแรกเกิดอายุไม่เกิน 5 วัน ทาง intrahepatic หลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดประมาณ 6-8 สัปดาห์ ก็เจาะเลือดหนู humanized mice เพื่อตรวจดูว่าเซลล์ lymphocytes เป็นเซลล์จากคนหรือไม่ ถ้าใช่ก็สามารถใช้หนูในการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนต่อไป

<u>การแยกเซลล์ต้นกำเนิด (CD34+ cells) จากเลือดที่เจาะจากสายสะดือ</u>

เมื่อได้เลือดจากสายสะดือแล้ว ก็นำมาแยกเซลล์ต้นกำเนิดตามขั้นตอนดังนี้

- ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใช้ red cell lysis buffer
- แยก CD34+ cells โดยใช้ anti-human CD34 antibody ที่อยู่บน magnetic beads โดยอาศัยหลักการ positive magnetic selection โดยใช้ CD34+MicroBead-Kit (HetaSep, magnet, EasySep human cord blood CD34 positive selection kit, STEMCELL Technologies) เพื่อแยก CD34+ human hematopoietic stem cells (HSCs) จากนั้นนำไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้แท่งแม่เหล็กแล้วปั่นล้าง CD34+ cells ที่ได้
- เมื่อได้ CD34+ cells แล้วก็นำมาย้อมอีกครั้งด้วย anti-human CD34-APC แล้วไปตรวจวัดด้วยเครื่อง Flow Cytometry เพื่อวิเคราะห์ว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ (purity) เพียงใด (ต้องได้มากกว่า 90 % จึงจะนำมาใช้ในการปลูกถ่าย)
- จากนั้นนำ CD34+ cells ไปเลี้ยงใน IMDM supplemented with 10 % FBS, IL-3, IL-6, CSF เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เจริญเติบโตดีแล้วก็สามารถนำไปปลูกถ่ายเข้าสู่หนูต่อไป

การเตรียมหนูที่ใช้ทดลอง

ตามที่ได้เสนอในตอนแรกว่าจะใช้หนู Rag2-/-gc-/- นั้น ปรากฏว่ามีอุปสรรคที่เกิดจากการผสมพันธุ์หนู โดยที่หนูไม่ตั้งท้องในช่วงแรก ส่วนช่วงหลังที่ดูเหมือนตั้งท้องแล้วนั้น ปรากฏว่าพบแต่เลือดที่อยู่บนวัสดุรองนอน ซึ่งไม่แน่ใจว่าเกิดจากการที่หนูแท้ง หรือหนูคลอดแล้วแต่แม่หนูกินลูกหนู และพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่สั่งมาก็อายุมากเกินกว่าที่จะสามารถให้ลูกหนูที่มีคุณภาพดีได้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้หนู NSG (NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$) แทนหนู Rag2-/-gc-/- เนื่องจากหนู NSG สามารถทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคนได้ในลูกหนู (new born) ที่มีอายุ 3-5 วันหรือลูกหนูที่มีอายุ 6-8 สัปดาห์ แต่หนูต้องได้รับการฉีด busulfan ซึ่งเป็น cytotoxic drug เพื่อให้ทำลายเซลล์ภูมิคุ้มกันที่อาจหลงเหลือในหนูให้หมดก่อน ก่อนที่จะมีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด, เลี้ยงได้ง่ายกว่า อีกทั้งมีราคาย่อมเยากว่า และสามารถให้ลูกหนูต่อหนึ่งคลอกมากกว่าหนู Rag2-/-gc-/- ด้วย

ปัญหาอีกอย่างหนึ่งคือ ในกรณีหนู Rag2-/-gc-/- ก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ต้องมีการฉายแสงหนูก่อน (350 rads) ซึ่งทางศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่มีเครื่องฉายแสงสำหรับสัตว์ทดลองดังกล่าว ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ติดต่อขอใช้เครื่องฉายแสงที่ใช้กับคนที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไว้แล้ว ซึ่งต้องปรับปริมาณแสงให้พอเหมาะที่จะใช้กับสัตว์ แต่ก็ติดปัญหาที่การขนส่งหนูไป-กลับ ระหว่างศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ ยังมีปัญหาที่อาจตามมาอีกคือ หากนำลูกหนูออกมาฉายแสง กลิ่นของลูกหนูอาจเปลี่ยนไปซึ่งจะทำให้แม่หนูไม่ยอมรับกลับเข้าคลอก อาจทำให้ลูกหนูอดนมและตายได้ เนื่องจากอยู่ในอายุที่ยังไม่หย่านม ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้หนู NSG แทน[12, 14] โดยถ้าปลูกถ่ายในลูกหนูอายุ 3-5 วัน จะฉีดเข้าทาง intrahepatic เลยโดยที่ไม่ต้องนำลูกหนูมาฉายแสงก่อน แต่ถ้าใช้หนูอายุ 6-8 สัปดาห์ ก็จะฉีด busulfan ก่อนการปลูกถ่าย 2 วัน[15]

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (CD34+ cells) ของคนเข้าสู่หนู

เมื่อได้เซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการกระตุ้นดังกล่าวข้างต้นแล้ว ได้นำเซลล์มาฉีดหนู NSG โดยฉีดตัวละ 200,000 เซลล์ ผ่านทาง intrahepatic (newborn) หรือ intravenous (busulfan-treated adult)

การแยกระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนและเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู

หลังจากฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าสู่หนูแล้ว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีการเจาะเลือดหนูมาตรวจดูเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย monoclonal antibody ชนิด anti-human CD45 และ anti-mouse

CD45 ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescence dye) ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer

การทดสอบ HIV DNA vaccine

หนูที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human CD45+ cells) ปลูกถ่ายอยู่ตั้งแต่ 20% ขึ้นไป จะได้รับการฉีดด้วย Asian mosaic HIV envelope DNA (mosaic 1-3) รวมกันในปริมาณ 100 µg ต่อเข็ม ทาง intramuscular route ตามด้วย electroporation โดยฉีดทั้งหมด 3 เข็ม แต่ละเข็มห่างกัน 14 วัน (day 0, 14 และ 28) หนูจะถูกเจาะเลือดและแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามเพื่อตรวจดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังจากฉีดเข็มที่ 3 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (day 35)

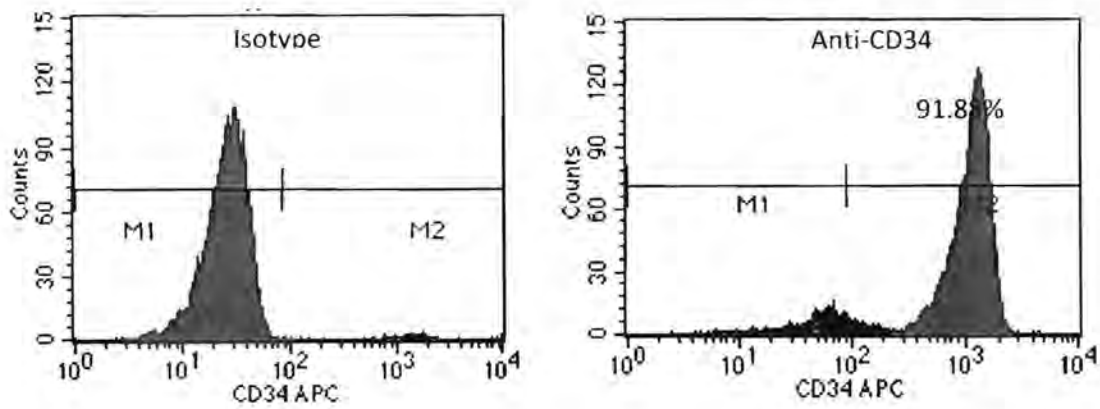
การตรวจดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

- การตรวจดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดี โดยใช้วิธี western blot เพื่อดูว่ามีการสร้าง anti-gp 41 หรือ anti-gp120 หรือ anti-gp160 หรือไม่
- การตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์ โดยวิธี ELISpopt โดยการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามของหนู แล้วนำมากระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE และ HIV-1 B pooled peptides ในหลุมแยกกัน

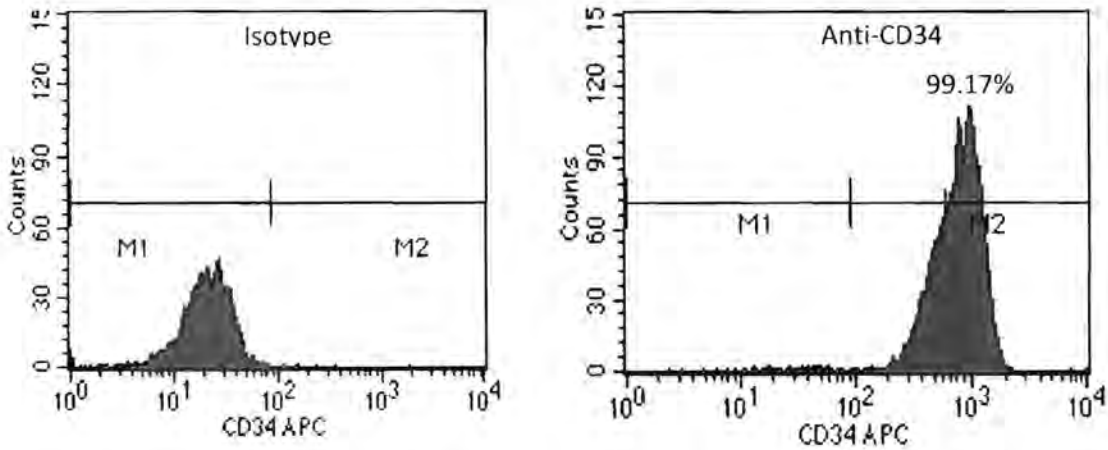
ผลการทดสอบ

(1) ผลการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดที่เจาะจากสายสะดือ

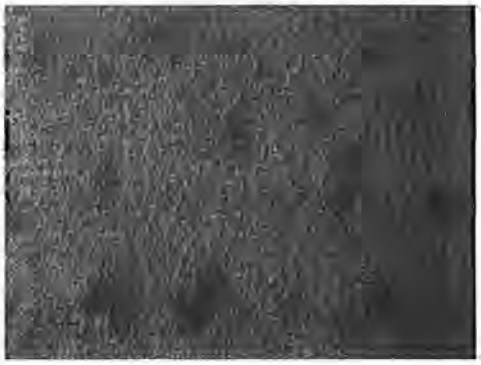
จากการแยกเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มา 2 รายแรก พบว่าเซลล์ CD34+ cells ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ 91% ในตัวอย่างที่ 1 และ 99% ในตัวอย่างที่ 2 (ดังแสดงใน**รูปที่ 1** และ**รูปที่ 2** ตามลำดับ) และเมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้ไปเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าเซลล์ดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดีโดยเห็นได้จากการที่มีเซลล์ตัวอ่อนเกิดขึ้น (**รูปที่ 3**) ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการแยกเซลล์โดยวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพดี



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ CD34+ cells จากตัวอย่างที่ 1



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ CD34+ cells จากตัวอย่างที่ 2



รูปที่ 3 กลุ่มของเซลล์ตัวอ่อนของ CD34+ cells หลังจากเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(2) ***ผลการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในหนู NSG***

เมื่อได้เซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการกระตุ้นดังกล่าวข้างต้นแล้ว ได้นำเซลล์มาฉีดหนู NSG โดยฉีดตัวละ 200,000 เซลล์ โดยแบ่งการฉีดหนูเป็น 2 แบบคือ

<u>แบบที่1</u> ฉีดในหนูแรกคลอดอายุ 3-5 วัน (ต้องไม่เกิน 5 วัน) โดยฉีดเข้าตับ (intrahepatic route)

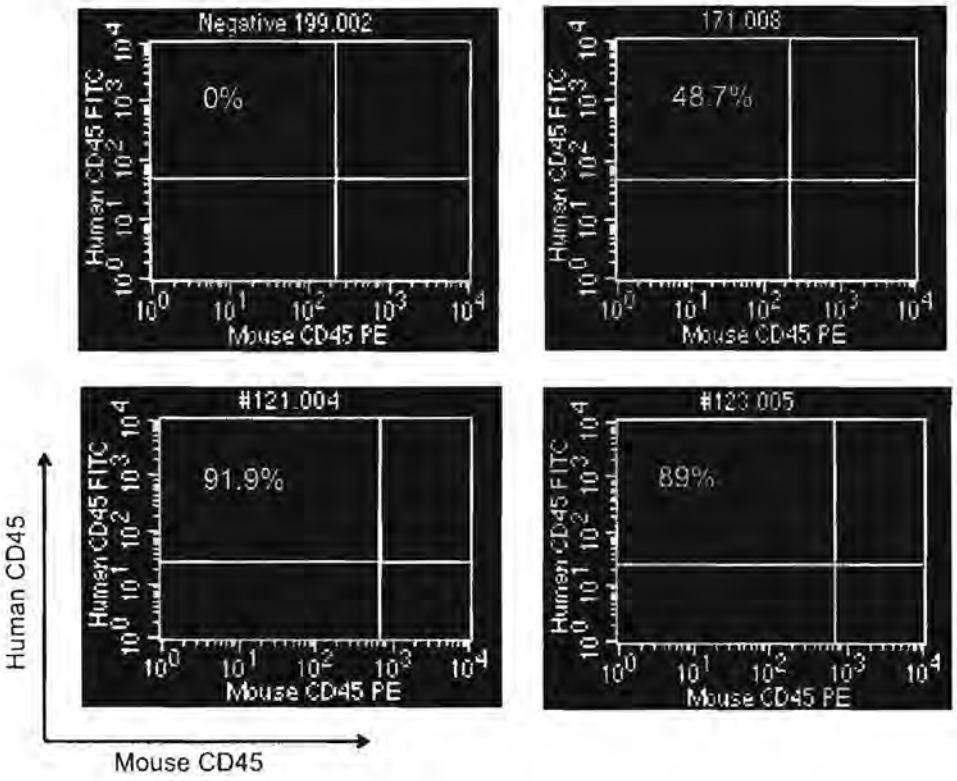
<u>แบบที่2</u> ฉีดในลูกหนูที่มีอายุประมาณ 8 สัปดาห์ ซึ่งก่อนที่จะฉีดเซลล์ต้นกำเนิด 2 วัน หนูต้องได้รับการฉีด busulfan ซึ่งเป็น cytotoxic drug ก่อน (โดยฉีด 2 วันติดกัน) เพื่อทำลายเซลล์ภูมิคุ้มกันของหนูที่อาจหลงเหลืออยู่ก่อนทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคน

โดยผู้วิจัยได้ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในลูกหนู NSG ที่มีอายุประมาณ 3-5 วัน จำนวน 57 ตัว และปลูกถ่ายในลูกหนูอายุประมาณ 2 เดือนจำนวน 78 ตัว และหนูจะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจดูว่ามีเซลล์ภูมิคุ้มกันของคน (human CD45+ cells) อยู่หรือไม่ หลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ไปแล้ว 8 สัปดาห์ โดยต้องมีเซลล์คนอยู่มากกว่า 20% จึงจะถือว่าการปลูกถ่ายสำเร็จพบว่า

- ลูกหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ขณะที่อายุประมาณ 3-5 วันจำนวน 57 ตัว มีลูกหนูจำนวน 13/57 (22.8%) ที่มีเซลล์ภูมิคุ้มกันของคนอยู่ และในจำนวน 13 ตัวนี้ก็ตายไป 5 ตัว จึงเหลือลูกหนูที่จะสามารถนำมาทดสอบวัคซีนได้เพียง 8 ตัว โดยมีค่าเฉลี่ยเซลล์ภูมิคุ้มกันของคนอยู่ที่ 56.7% (24.5) range 22.9-89.2% (**ตารางที่ 1**) ก่อนการฉีดวัคซีน

รูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเจาะเลือดหนูหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเป็นเวลา 8 สัปดาห์มาตรวจดูว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปลูกถ่ายอยู่หรือไม่ พบว่าหนูเบอร์ 199 ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปลูกถ่ายอยู่ (ไม่มีเซลล์อยู่ใน quadrant ที่ 1) ส่วนหนูเบอร์ 171, 121 และ 123 มีเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปลูกถ่ายอยู่ (มีเซลล์อยู่ใน quadrant ที่ 1) ในปริมาณ 48.7%, 91.9% และ 89% ตามลำดับ

- ลูกหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ขณะที่อายุประมาณ 8 สัปดาห์ โดยได้รับ busulfan ก่อนการปลูกถ่าย จำนวน 78 ตัว ไม่พบว่ามีเซลล์ของคนอยู่เลย



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์การย้อมเซลล์ด้วย anti-human CD45 (เซลล์เม็ดเลือดขาวของคน) และ anti-mouse CD45 (เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนู) หลังปลูกถายด้วยเซลล์ต้นกำเนิด 8 สัปดาห์

ตารางที่ 1 สรุปปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (human CD45+ cells) ที่พบในหนูก่อนฉีด HIV DNA vaccine (before immunization) และปริมาณ human CD45+, CD4+ และ CD8+ cells ในหนูที่ถูก sacrificed (Termination) ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างในเลือดและในม้าม (spleen)

	Before immunization			Termination (blood/spleen)				
mouse#	%hCD45	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	%hCD45	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	%CD19+	%CD20+
120	40.7	16.6	7	26.9/24.1	40.4/32.0	9.2/9.1	34.7/17.5	1.7/1.8
124	63.5	26	31.3					
168	74.6	59	21	17.9/48.0	41.0/50.6	34.9/28.8	18.0/8.2	1.0/1.4
171	48.7	25	14	6.2/36.0	34.7/55.7	17.3/21.6	18.2/7.0	1.4/1.1
175	89.2	58.4	15.5	15.6/35.9	27.5/54.3	19.8/24.0	21.6/7.4	0.8/1.2
176	22.9	18.8	1.6	4.0/nd	15.8/nd	7.8/nd	20.5/nd	1.0/nd
174	82.5	71.6	8.8	17.2/36.8	40.1/63.1	18.9/19.0	23.3/6.3	1.1/0.5
169	31.4	30.6	13.6	1.9/nd	21.0/nd	12.2/nd	24.6/nd	1.7/nd

NB: หนู # 120, 124, 168, 171, 175, 176 ฉีดด้วย Asian mosaic HIV env DNA vaccine (mosaic 1-3) 3 เข็ม (เข็มละ 100 µg) ทุก 14 วัน

หนู # 124 ตายหลังจากฉีดวัคซีนเข็มที่ 3

หนู # 174 , 169 ฉีดด้วย empty plasmid เพื่อเป็น negative controls

nd = splenocytes เหลือไม่พอที่จะนำมาย้อมดูชนิดของเซลล์

(3) ***ผลการทดสอบ HIV DNA vaccine***

- การตรวจดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดี โดยใช้วิธี western blot ไม่พบว่ามีการสร้าง anti-gp 41 หรือ anti-gp120 หรือ anti-gp160
- ผลการทดสอบการตรวจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์ โดยวิธี ELISpopt โดยการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามของหนู แล้วนำมากระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE หรือ HIV-1 B pooled

peptides ในหลุมแยกกัน พบว่า มีหนู 1 ตัว (#168) ที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE ที่ 90.67 SFU (spot forming units)/10^6 splenocytes และตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 B pooled peptides ที่ 153.33 SFU/10^6 splenocytes และหนู 1 ตัว (#171) ที่มีเพียงการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 B pooled peptides ที่ 85.33 SFU/10^6 splenocytes โดยที่ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE pooled peptides แสดงว่า humanized mice model นี้สามารถใช้ทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของคน (human hematopoietic stem cells, HSCs) เข้าสู่ลูกหนู NSG อายุ 3-5 วันได้โดยที่ไม่ต้องนำลูกหนูไปฉายแสงก่อน แต่อัตราการปลูกถ่ายที่สำเร็จยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากอัตราการปลูกถ่ายในลูกหนูอายุ 3-5 วันในงานวิจัยนี้อยู่ที่ 13/57 (22.8 %) โดยที่อัตราการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่มีผู้ทำวิจัยไว้แล้วอยู่ที่ประมาณ 33.3 % สาเหตุที่อัตราความสำเร็จสูงกว่าอาจเป็นเพราะมีการฉายแสงลูกหนูก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งวิธีการฉายแสงดังกล่าวไม่สามารถทำได้ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในขณะที่อัตราการปลูกถ่ายในหนูอายุ 8 สัปดาห์จำนวน 78 ตัวซึ่งต้องได้รับการฉีด busulfan ก่อนการปลูกถ่ายนั้น ไม่ประสบผลสำเร็จเลย

ชนิดของหนูที่ใช้เป็นตัวแปรอีกตัวหนึ่งซึ่งทำให้งานวิจัยไม่เป็นไปตามที่คาด ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าได้จัดซื้อหนู Rag2-/-gc-/- ซึ่งเป็นหนูที่ใช้ในงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ซึ่งให้ผลการปลูกถ่ายที่ 33.3 % แต่เนื่องจากข้อจำกัดของสถานที่เลี้ยงซึ่งต้องเป็น specific germ free (SGF) condition ในขณะที่นำเข้าหนู และหนูมีภาวะเครียดจากการขนส่ง และหนูไม่ท้องรวมถึงท้องแล้วแม่หนูกินลูกหนู ทำให้ไม่สามารถใช้หนู Rag2-/-gc-/- ที่สั่งเข้ามาได้ จึงต้องสั่งหนู NSG เข้ามาทดแทนในที่สุด นอกจากชนิดของหนูที่ใช้แล้ว ปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด เช่น ช่องทางที่ใช้ฉีดเซลล์ต้นกำเนิด (route of injection), อายุของหนู, แหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิด (เช่นเป็น fresh หรือ frozen HSCs) และแหล่งของรังสีที่ใช้ ฉายแสง (irradiation sources)[14] เป็นต้น

นอกจากนี้ ก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดหนูในหนู Rag2-/-gc-/- ต้องมีการฉายแสงหนูก่อน (350 rads) ซึ่งทางศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่มีเครื่องฉายแสงสำหรับสัตว์ทดลองดังกล่าว ซึ่งทาง

คณะผู้วิจัยได้ติดต่อขอใช้เครื่องฉายแสงที่ใช้กับคนที่คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไว้แล้ว ซึ่งต้องปรับปริมาณแสงให้พอเหมาะที่จะใช้กับสัตว์ และก็ติดปัญหาที่การขนส่งหนูไป-กลับ ระหว่างศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ ยังมีปัญหาที่อาจตามมาอีกคือ หากนำลูกหนูออกมาฉายแสง กลิ่นของลูกหนูอาจเปลี่ยนไปซึ่งจะทำให้แม่หนูไม่ยอมรับกลับเข้าคลอก อาจทำให้ลูกหนูอดนมและตายได้ เนื่องจากอยู่ในอายุที่ยังไม่หย่านม ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้หนู NSG แทน[12]

ส่วนหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในขณะที่มีอายุระหว่าง 3-5 วันนั้น มีอยู่ 5 ตัวที่ตายไป ซึ่งอาจเกิดจากภาวะ graft versus host disease (GVHD) ยกตัวอย่างหนู #123 ที่มีปริมาณ human CD45+ cells 89% ที่ 6 สัปดาห์หลังการปลูกถ่าย ผลการตรวจทางพยาธิ (pathologic study) รายงานว่า "*Representative sections of kidney, spleen, lung, liver, stomach and heart were examined. The tissues were severely autolysed. The liver had multifocal necrosis, mild vacuolation of hepatocytes and moderate infiltrates of lymphocytes and macrophages in the portal areas. There were multifocal aggregates lymphocytes and macrophages in the lung. There were also multifocal macrophage aggregates in the spleen. No other significant changes were observed.*" **(ตามแนบในภาคผนวก)**

จากผลการฉีด Asian mosaic HIV envelope DNA vaccine พบว่ามีหนู 1 ตัวที่ให้การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE pooled peptide (90.67 SFU/10^6 splenocytes) ในขณะที่มีหนู 2 ตัวที่ให้การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย HIV-1 B pooled peptide (153.33 และ 85.33 SFU/10^6 splenocytes) ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า HIV-1 B pooled peptide มี immunogenicity ดีกว่า HIV-1 CRF01_AE pooled peptide จึงสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า [ผลการทดสอบในลิง non-human primate ของคณะผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างระหว่างการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE หรือ HIV-1 B pooled peptide โดย mean (SD) จากลิง 5 ตัวเมื่อกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE หรือ HIV-1 B pooled peptide เท่ากับ 189.6 (155.6) หรือ 212.8 (153.7) ตามลำดับ โดยที่ผลการกระตุ้นด้วย HIV-1 CRF01_AE หรือ HIV-1 B pooled peptide ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)] อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถใช้ humanized mice เป็นโมเดลของคนในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในคนได้ แต่ต้องมีการพัฒนาประสิทธิภาพของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดให้ดีกว่านี้ เพื่อให้ได้ humanized mice ที่มี

เซลล์ของคนเจริญเติบโตอยู่ในเปอร์เซนต์ที่มากกว่านี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังต้องพัฒนาให้การอยู่รอดของ humanized mice ดีขึ้นกว่านี้ (พยายามให้เกิด graft versus host disease ให้น้อยที่สุด) เพื่อให้ได้ปริมาณหนูเพื่อใช้ในการทดลองมากขึ้น

สรุปและเสนอแนะ

สรุปว่า humanized mouse model สามารถใช้ทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ แต่ขั้นตอนตั้งแต่การเลี้ยงหนู การฉายแสงหนู (ซึ่งควรจะเป็นเครื่องฉายแสงสำหรับหนูโดยเฉพาะ) ก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนั้น ควรมีพร้อมอยู่ในสถานที่ทำงานวิจัยเดียวกัน เพื่อความสะดวกและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของงานวิจัย (สำหรับเครื่องฉายแสงนั้น อาจมีความจำเป็นน้อยลง หากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในลูกหนูอายุ 3-5 วันโดยที่ไม่ต้องฉายแสงลูกหนูก่อนได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากกว่านี้) ซึ่งจากผลการวิจัยในโครงการนี้ จะเห็นว่าหนูให้การตอบสนองแบบ cell-mediated immune response เท่านั้น โดยที่ไม่มีการตอบสนองทางแอนติบอดีเลย สำหรับงานวิจัยที่ต้องการการตอบสนองทางด้านแอนติบอดีด้วย อาจเพิ่มการฉีด human GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), human IL-4 หรือ human BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของ B cell[16]

นอกจากนี้ humanized mouse model นี้ สามารถนำไปใช้ได้กับการทดสอบวัคซีนอื่นๆ

<u>บรรณานุกรม (Bibliography)</u>

1. Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL. Humanized mouse models to study human diseases. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010; 17 : 120-125.
2. Wege AK, Ernst W, Eckl J, et al. Humanized tumor mice-A new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy. Int J Cancer 2011; 129 : 2194-2206.
3. Nomura T, Nakajima H, Hongyo T, et al. Induction of cancer, actinic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 1997; 57 : 2081-2084.

4. Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. Nat Med 2006; 12 : 1316-1322.
5. Sun Z, Denton PW, Estes JD, et al. Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. J Exp Med 2007; 204 : 7.5-714.
6. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. Nat Rev Immunol 2007; 7 : 118-130.
7. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells. J Immunol 2005; 174 : 6477-6489.
8. Yahata T, Ando K, Nakamura Y, et al. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. J Immunol 2002; 169 : 204-209.
9. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain (null) mice. Blood 2005; 106 : 1565-1573.
10. Macchiarini F, Manz MG, Palucka AK, et al. Humanized mice : are we there yet? J Exp Med 2005; 202 : 1307-1311.
11. Koo GC, Hasan A, O'Reilly RJ. Use of humanized severe combined immunodeficient mice for human vaccine development. Expert Rev Vaccines 2009; 8 : 113-120.
12. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 2002; 100 : 3175-3182.
13. Scholbach J, Schulz A, westphal F, et al. Comparison of hematopoietic stem cells derived from fresh and cryopreserved whole cord blood in the generation of humanized mice. PLoS ONE 2012; 7 :e46772.
14. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. Cellular & Molecular Immunology 2012; 9: 208-214.
15. Hayakawa J, Hsieh MM, Uchida N, Phang O, Tisdale JF. Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-*Scid IL2Rg*^{null} mice. Stem Cells 2009; 27: 175-182.

16. Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. J Exp Med 1999; 189: 1747-1756.

ภาคผนวก (Appendix) ผลพยาธิสภาพของหนู #123

โรงพยาบาลสัตว์เล็ก

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 02-218-9715, 02-218-9751

HN: 5908902

ใบรายงานผลตรวจ / Lab Report Form

11. Necropsy

Order No: L5909220021

ส่งมาจากแผนก: Pathology Division Veterinarian สพ.ญ.ณหทัย แจ้งผลกลับ: ปรกติ

VN No: V5909220142 วันที่ 22/09/2016	ชื่อสัตว์เลี้ยง sample ประเภท exotic
เจ้าของ/Owner ศูนย์สัตว์ทดลอง	พันธุ์/breeds Guinea Pig เกิด / /2016
phone 0892138282 022189430	เพศ/sex ไม่ทราบ ทำหมัน ไม่ทราบ แพ้ยา

History:

Clinical Diagnosis: Found dead

มีความประสงค์จะรับผลทาง Email: prompetchara@gmail.com Fax:

Address:

Died Unk Euthanasia method

Date of Death* 9/20/16 12:00 AM

Macroscopic findings

The carcass was severely autolytic

Gross diagnosis*

No significant changes.

Comment

Sample collected date* 22/09/2016 08:59 ยอดเงิน 500 บาท

Reported By* สพ.ญ. แคทรียา จันทน์ขาว/DR.Katriya Chankow:DVM

Lab Consult By รศ.น.สพ.ดร. ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์/Assoc. Prof. Dr. Theerayuth Kaewamatawong

Microscopic findings

Representative sections of kidney, spleen, lung, liver, stomach and heart were examined. The tissues were severely autolysed. The liver had multifocal necrosis, mild vacuolation of hepatocytes and moderate infiltrates of lymphocytes and macrophages in the portal areas. There were multifocal aggregates lymphocytes and macrophages in the lung. There were also multifocal macrophage aggregates in the spleen. No other significant changes were observed

Final diagnosis*

Moderate lymphohistiocytic periportal hepatitis

Moderate chronic multifocal pneumonia

Moderate multifocal histiocytic splenitis

Comment

Sample collected date* 22/09/2016 08:59 ยอดเงิน 500 บาท

Reported By* สพ.ญ. แคทรียา จันทน์ขาว/DR.Katriya Chankow:DVM

Lab Consult By รศ.น.สพ.ดร. ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์/Assoc. Prof. Dr. Theerayuth Kaewamatawong

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.สุณี ศิริวิชยกุล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Sunee Sirivichayakul, Ph.D.

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100800838592

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4579
   โทรสาร. 0-652-3100 E-mail: ssunee@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	2528
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2546

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: HIV Molecular and Immunology

ผลงานตีพิมพ์ (คัดมา 10 เรื่องจากทั้งหมด 78 เรื่อง)

1. **Sirivichayakul S**, Thantiworasit P, Chatkulkawin P, Buranapraditkun S, Munier ML, Kelleher AD, Ruxrungtham K. Immunogenicity assay validation for an HIV vaccine trial : High IFNγ(+)/IL-2(+) CD8(+) T cells background in healthy Thais. Vaccine 2011; 29 : 6002-6007.
2. Buranapraditkun S, Hempel U, Pitakpolrat P, Allgaier RL, Thantivorasit P, Lorenzen SI, **Sirivichayakul S**, Hidebrand WH, Altfeld M, Brander C, Walker BD, Phanuphak P, Hansasuta P, Rowland-Jones SL, Allen TM, Ruxrungtham K. A novel immunodominant CD8+ T cell response restricted by a common HLA-C allele targets a conserved region of gag HIV-1 clade CRF01_AE infected Thais. PLoS One 2011;
3. Bunupuradah T, Ananworanich J, Chetchotisakd P, Kantipong P, Jirajariyavej S, **Sirivichayakul S**, Munsakul W, Prasithsirikul W, Sungkanuparph S, Bowonwattanuwong C, Kinbuayaem V, Petoumenos K, Hirschel B, Bhakeecheep S, Ruxrungtham K. Etravirine and rilpivirine resistance in HIV-1 subtype CRF01_AE-infected adults failing non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based regimens. Antivir Ther 2011; 16 : 1113-1121.
4. Le Nguyen H, Pitakpolrat P, **Sirivichayakul S**, Delaugerre C, Ruxrungtham K. Minority HIV-1 resistant variants in recent infection and in patients who failed first-line antiretroviral therapy with no detectable resistance-associatd mutations in Thailand. J Med Virol 2012; 84 : 713-720.
5. Rutvisuttinunt W, **Sirivichayakul S**, Oota S, Assawadarachai V, Poltavee K, Savadsuk H, Pattanachaiwit S, Chaemchuen S, Arroyo MA, Paris RM, Michael NL, Kim JH, Ruxrungtham K, Souza MD, Phanuphak P, Tovanabutra S. Two unique recombinant forms identified in incident HIV type 1 infections in Thai blood donors. AIDS Res Hum Retroviruses 2012; 28 : 1703-1711.
6. Phanuphak P, **Sirivichayakul S**, Jiamsakul A, Sungkanuparph S, Kumarasamy N, Lee MP, Sirisanthana T, Kantipong P, Lee C, Kamarulzaman A, Mustafa M, Ditangco R, Merati T, Ratanasuwan W, Singtoroj T, Kantor R. Transmitted drug resistance and antiretroviral treatment outcomes in non-subtype B HIV-1 infected patients in South East Asia. J Acquir Immune Defic Syndr 2014; 66 : 74-79.
7. **Sirivichayakul S**, Kantor R, DeLong AK, Wongkunya R, Mekprasan S, Ruxrungtham K, Sohn AH, Phanuphak P. Transmitted HIV drug resistance at the Thai Red Cross Anonymous Clinic in

Bangkok: results from three consecutive years of annual surveillance. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 1146-1149.

8. Ananworanich J, **Sirivichayakul S,** Pinyakorn S, Crowell TA, Trichavaroj R, Weerayingyong J, Chomchey N, Fletcher JL, van Griensven F, Phanuphak P, Robb ML, Michael NL, Kim JH, Phanuphak N. High prevalence of transmitted drug resistance in acute HIV-infected Thai men who have sex with men. J Acquir Immune Defic Syndr 2015; 68: 481-485.
9. Teeranaipong P, **Sirivichayakul S**, Mekprasan S, Ohata PJ, Avihingsanon A, Ruxrungtham K, Putcharoen O. Role of Rilpivirine and Etravirine in Efavirenz and Nevirapine-based regimens failure in resource-limited country: a cross-sectional study. PLoS One 2016; 11: e154221.
10. Ruxrungtham K, **Sirivichayakul S**, Buranapraditkun S, Krause W. Alemtuzumab-induced elimination of HIV-1-infected immune cells. J Virus Erad 2016; 2: 12-18.

CURRICULUM VITAE

NAME : Eakachai Prompetchara, Ph.D.

ADDRESS : Department of Biochemistry and Microbiology
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Phone : +66-2218-8378
E-mail : eakachai.p@chula.ac.th

DATE OF BIRTH : September 26, 1983

CITIZENSHIP : Thai

UNIVERSITY EDUCATION :

2003-2006	Bachelor of Science (Medical Technology), Honors Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand
2007-2013	Ph.D., Interdisciplinary of Biomedical Sciences Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ACADEMIC ATTENDANCE AND TRAINING

June 2007	Training participant in "Good Clinical Laboratory Practice Training Workshop" Bangkok, Thailand
October 2008	Attendance in "2nd International Conference on Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic fever" Phuket, Thailand
December 2008	Training participant in "Training on the Use of Laboratory Animals for Scientific Purposes" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
October 2010-2014	Attendance in "Protein expression and Purification Workshop" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
October 2012	Attendance in "Abbas's Advanced Course in Basic and Clinical Immunology" Bangkok, Thailand
October 2012	Attendance in "Research Training Program in Biomedical Science" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

August 2013	Training participant in "Training for working in Biosafety Level 2 & 3 Laboratory" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
November 2013 - May 2014	Laboratory training in "Humanized mice production, characterization, manipulation and management" Brigham Young University, Utah, United States
October 2015	Training participant in "Vaccine Development Workshop" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
November 2015	Training participant in "Training on the Use of Laboratory Animals for Scientific Purposes" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
May 2016	Training participant in "Training for working in Biosafety Level 3 Laboratory" Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

CONFERENCE

April 2007	31st Annual Meeting of Medical Technologist Association of Thailand, Bangkok, Thailand (Poster Presentation)
November 2012	Singapore International Conference on Dengue and Emerging Infections, Singapore (Poster Presentation)
April 2013	RGJ-Ph.D. Congress XIV, Pattaya, Thailand
June 2013	52nd Annual Scientific Conference, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. (Oral Presentation, Awarded)
September 2015	4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria (Poster presentation)

SCHOLARSHIP and AWARD

2009-2013	Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, The Thailand Research Fund
April 2013	Outstanding Poster Presentation Award RGJ-Ph.D. Congress XIV, Pattaya, Thailand
June 2013	Awarded, Oral Presentation.

	52nd Annual Scientific Conference, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
2014-2015	Post-doctoral Fellow Scholarship, Chulalongkorn University
February 2016	Dissertation Award, National Research Council of Thailand

CAREER HISTORY

2014-2016	Post-doctoral Fellow, supervised by Professor Kiat Ruxrungtham, M.D. and Assistant Professor Chutitorn Ketloy, Ph.D., we are working on research and development of tetravalent dengue vaccines and humanized mice model
2016-current	Instructor, Department of Biochemistry and Microbiology Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

TOPICS OF INTEREST

- Immunology, Virology and Molecular biology
- Manipulation and development of dengue vaccines (DNA-based, recombinant protein, viral-like particle)
- Animal study for vaccine immunogenicity testing

PRACTICAL EXPERIENCE

- **Molecular techniques**
  - DNA and RNA studies including PCR, RT-PCR, DNA sequencing, quantitative real-time-PCR
  - DNA Cloning, DNA vaccine design and construction
  - Protein studies including *in vitro* expression of recombinant protein in *E. coli* Yeast, and mammalian cells
- **Cell Culture Techniques**
  - Mammalian and insect cell culture
  - PBMCs isolation and culture
  - Viral propagation and quantification
  - Viral isolation from clinical specimen
  - Isolation and culture of human haematopoietic stem cells

- **Immunological Techniques**
    - ELISA, ELISpot, Immunoblot analysis, Intracellular Cytokine Staining (ICS), Immunofluorescence (IF)
    - Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)
- **Animal Studies (Animal user ID: U1-00160-2558)**
    - Mice immunization: intramuscular, intradermal, subcutaneous, Needle-free injection, *in vivo* electroporation and bleeding
    - Humanized production, characterization and manipulation

PUBLICATIONS

1. Pinya Pulsawat, Patrawadee Pitakpolrat, **Eakachai Prompetchara**, Theerayuth Kaewamatawong, Navapon Techakriengkrai, Sunee Sirivichayakul, Supranee Buranapraditkun, Drew Hannaman, Kiat Ruxrungtham, Alain Jacquet. Optimization of a Der p 2-based prophylactic DNA vaccine against house dust mite allergy. Immunol Lett. 2013 Mar;151(1-2):23-30.
2. Araya Radtanakatikanon, Juthatip Keawcharoen, Nataya Charoenvisal, Yong Poovorawan, **Eakachai Prompetchara**, Ryoji Yamaguchi, Somporn Techangamsuwan. Genotypic lineages and restriction fragment length polymorphism of canine distemper virus isolates in Thailand. Veterinary Microbiology. 2013; 166 76-83.
3. **Eakachai Prompetchara**, Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, Nopporn Sittisombut Kiat Ruxrungtham. Induction of Neutralizing Antibody Response against Four Dengue Viruses in Mice by Intramuscular Electroporation of Tetravalent DNA Vaccines. PloS one. 2014;9(6):e92643.
4. **Eakachai Prompetchara** Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, Nopporn Sittisombut and Kiat Ruxrungtham. The immunogenicity of tetravalent dengue DNA vaccine in mice pre-exposed to Japanese encephalitis or Dengue virus antigens. Asian Pac J Allergy Immunol. 2015; Sep;33(3):182-8.

5. Chutitorn Ketloy, Poonsook Keelapang, **Eakachai Prompetchara**, Amporn Suphatrakul, Eiji Konishi, Nopporn Sittisombu, Kiat Ruxrungtham. Various strategies to improve neutralizing antibody induction by codon optimized consensus-based *prM* and *E* dengue virus type 2 (DENV-2) DNA vaccine. Asian Pac J Allergy Immunol. 2016; In press.
6. Siwaporn Boonyasuppayakorn, Aphinya Suroengrit, Pimsiri Srivarangkul, Wanchalerm Yuttithamnon, Saran Pankaew, Thanaphon Saelee, **Eakachai Prompetchara**, Saran Salakij, Parvapan Bhattarakosol. **Simplified dengue virus microwell plaque assay using an automated quantification program.** J Virol Methods. 2016 Nov;237:25-31.

CURRICULUM VITAE

NAME : PATTARAWAT THANTIWORASIT

ADDRESS : Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
Thailand.
Phone : 66-2-2564579
FAX : 66-2-6523100
E-mail : pattarawat.th@gmail.com

DATE OF BIRTH : May 31, 1982

MATERITAL STATUS : Married

CITIZENSHIP : Thai

UNIVERSITY EDUCATION :

2000 2003	Bachelor of Science (Medical Technology) Faculty of Medical Technology Huachiew Chalermprakiet University
2009-2012	Master of Sceince (Medical Science) Faculty of Medicine Chulalongkorn University

CURRENT POSITION :

2004-Present	Scientist Immunology Laboratory, Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

FELLOSHIP AWARDE AND CONFERENCE ATTENDED

Jul 11-16, 2004	XV International AIDS conference,IPACT Muang Thong Thani Convertion Center, Nonthaburi, Thailand
Aug 22-24, 2005	Good clinical Laboratory practice Training. Bangkok, Thailand
Jan 19, 2006	PBMCs Workshop, Queen Sirikit National Convertion Center, Bangkok, Thailand
Oct 25-28, 2006	Scientific Meeting, Aek-pailin River Kwai Hotel, Wangdong, Muang Kanchanaburi
Dec 24-26, 2008	Training on the Use of Laboratory Animals for Sciencetific purposes, Chulalongkorn University, Thailand
Sep 23, 2009	The Semi-Annual Meeting of The Allergy, Asthma and Immunology Society of Thailand. Landmark Hotel, Sukhumvit, Bangkok, Thailand
Mar 1-2, 2012	The 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress (AGRC) and the 1st Forum of the Deans of ASEAN Plus Three Graduate Schools.International Convdrtion Center, The Empress Hotel, Chiangmai
Oct 19-20, 2012	Abbas's Advance Course in Basic and Clinical Immunology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Jun 4-6, 2013	Training on the Use of Laboratory Animals for Sciencetific purposes, Chulalongkorn University, Thailand
Mar 23-27, 2015	4th ASEAN Cytometry Workshop & 1st Southeast Asian Cytometry Metting. Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand
Jan 19, 2017	Laboratory: Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) 19th Bangkok International Symposium on HIV Medicine, Queen Sirikit National Convertion Center, Bangkok, Thailand

CURRICULUM VITAE

NAME: Nitira Anakkul

NATIONALITY: Thai

GENDER: Female

ADDRESS: Chulalongkorn University Laboratory Animal Center
Henri Dunang Rd. Bangkok 10330, Thailand
Tel +6622189540, +66894890794
Fax: +6622189430
E-mail: nitira.a@chula.ac.th, noon_doradora@hotmail.com

EDUCATIONAL BACKGROUND

LEVEL	YEAR	PLACE	(DEGREE)
Bachelor degree	2008	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand)	D.V.M (1st class honour)
Doctorate degree	2013	Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand)	Ph.D. (Theriogenology)

EMPLOYMENT

2014-Present: Veterinarian (PhD),
Chulalongkorn University Laboratory Animal Center
Henri Dunang Rd. Bangkok 10330, Thailand

TRAINING

- "Externship program at University Laboratory Animal Resources, The Ohio State University and QTest Lab, LLC. (Private contract research organization)" 1-27 Julu 2016
- "Charles River Short Course on Animal Care and Use" Rhode Island, USA, 27-30 June 2016
- "Charles River Short Course-Malaysia"- One day of classroom instruction in laboratory animal science, Kuala Lumpur, Malaysia, November 10th, 2014

- "Workshop on Embryo Transfer" by The Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, USA, May 19-22, 2014
- "Workshop on the Cryopreservation of Mouse Germplasm" by The Jackson Laboratory in Bar Harbor, Maine, USA, May 14-16, 2014
- The training about "In vitro production, manipulation and preservation of bovine embryos and biotechnology techniques" at Reproduction and Development Biology Group, AgResearch, Ltd, Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand, April 8th - July 3rd, 2013
- The training about "Embryo transfer and cryopreservation in sheep" at Castella Research Proprietary Limited, Melbourne, Australia, February 23rd - March 30th, 2013
- The training about "Embryo transfer in sheep" at Inner Mongolia Sinau Genetics Co., Ltd., Hohhot, Inner Mongolia, People's Republic of China, September 4th - November 3rd, 2011
- The training about "In vitro production, manipulation and preservation of Buffalo embryos for the conservation of its bio-diversity" at National Livestock Breeding Center (NLBC), Fukushima, Japan, September 7th - November 30th, 2010

PUBLICATION

Kanchana PUNYAWAI, **Nitira ANAKKUL**, Kanokwan SRIRATTANA, Yoshio AIKAWA, Siwat SANGSRITAVONG, Takashi NAGAI, Kei IMAI and Rangsun PARNPAI. 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. J Reprod Dev. 61(5): 431–437.

Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Khunmanee, S., Diloksumpan, P., Berg, D.K., and Techakumphu, M. 2014. Sperm distribution and fertilization after unilateral and bilateral laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed goat semen. Theriogenology 82: 1137-1144.

Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Panyaboriban, S., Khunmanee, S., Thanomsuksinchai, N. and Techakumphu, M. 2013. Production of black goat using laparoscopic artificial insemination and embryo transfer. Thai J of Vet Med. 43(2): 259-263

Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Phutikanit N., Singlor, J. and Techakumphu, M. 2013. Glycerol concentration affects on quality and longevity of post-thaw goat semen. Thai J of Vet Med. 43(2): 179-186.

Anakkul, N., Suwimonteerabutr, J., Tharasanit, T., Panyaboriban, S., Khunmanee, S., Thanomsuksinchai, N. and Techakumphu, M. 2011. Effect of Equex STM Paste on the Quality and Motility Characteristics of Post Thawed Cryopreserved Goat Semen. Thai J. of Vet Med. 41(3): 345-351.