รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell : Comparison of pregnancy rate after transferring fresh and frozen-thawed embryos.

โดย

นายรังสรรค์ พาลพ่าย

พฤษภาคม 2549

สัญญาเลขที่ RSA/14/2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell : Comparison of pregnancy rate after transferring fresh and frozen-thawed embryos.

โดย
นายรังสรรค์ พาลพ่าย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง หน้า

การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 มีวัตุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ และทดสอบอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับ ได้อัตราการเชื่อมเซลล์สำเร็จ 84.7% และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจนถึงระยะ blastocyst 31.8% หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst จำนวน 62 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 39 ตัว พบว่าหลังจากล้วงตรวจที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว (36%) มีโคตัวรับแท้งลูกเดี่ยวทั้งหมด 4 ตัว ระหว่าง 200-240 วันหลังเป็นสัด และมีแม่โคจำนวน 10 ตัว ที่ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด (26%) ในจำนวนนี้มีลูกโคคลอดออกมาทั้งหมด 11 ตัว เป็นการตั้งท้องลูกแฝด 1 ตัว ลูกโคโคลนนิ่ง 4 ตัวเสียชีวิตหลังคลอด มีลูกโคโคลนนิ่งมีชีวิตหลังคลอด 7 ตัวซึ่งมีการเจริญเติบโตปกติหลังคลอด จากการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคโคลนทั้ง 7 ตัวมีแถบ DNA เหมือนโคต้นแบบทุกประการและแตกต่างจากโคตัวรับ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคอเมริกันบราห์มันเพศผู้สามารถโปรแกรมตัวเองใหม่ได้ดีหลังนำไปทำโคลนนิ่ง และมีลูกโคโคลนนิ่งเกิดมามีชีวิตในอัตราสูง

การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของระยะของ hatching ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสต่อการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification และการเติม linoleic acid-albumin (LAA) ในน้ำยา IVC และ Ficoll ในน้ำยา vitrification จะเพิ่มการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งหรือไม่ ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ นำไข่ที่เชื่อมกับเซลล์ต้นแบบแล้วไปกระตุ้นด้วย ethanol และ cycloheximide-cytochalasin D (วัน 0) จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA นำตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงไว้ 7 วัน มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสัดส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่ออกมาจากชั้น zona และเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่อยู่ภายในชั้น zona นำตัวอ่อนไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification ในน้ำยา TCM199 + 20% FBS ที่มี 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose ที่เติมหรือไม่เติม 10% Ficoll โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะสำหรับแช่แข็ง ตรวจสอบการอยู่รอดหลังจากทำละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง การเติม LAA ลงในน้ำยา IVC และน้ำยาสำหรับทำ vitrification ที่ไม่เติม Ficoll จะได้อัตราอยู่รอดของกลุ่ม early-hatching blastocyst (77%) ไม่แตกต่างจากกลุ่ม middle- และ late-hatching blastocyst (74 และ 80%, ตามลำดับ) การเติม Ficoll ในน้ำยา vitrification ไม่ช่วยให้มีอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนโคลนนิ่ง

ระยะบลาสโตซีสเพิ่มขึ้น (54-68%) ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst ที่ผลิตในน้ำยาที่ไม่มี LAA จะรอดต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม late-hatching blastocyst (56% vs 80%, $p < 0.05$) การตั้งท้องจนคลอดลูกโคโคลนนิ่งออกมาพบได้เฉพาะการฝากตัวอ่อนสดให้ตัวรับเท่านั้น การทดลองนี้สรุปได้ว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ บลาสโตซีสไม่ว่าจะอยู่ในระยะ hatching ใดก็ตาม หากเลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA จะมีอัตรารอดหลังจากแช่แข็งเท่าเทียมกัน

การทดลองที่ 3 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการอยู่รอดหลังแช่แข็งโดยวิธี micro-drop ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa medium + 0.3% BSA นาน 7 วัน นำตัวอ่อนระยะ middle- และ late-hatching blastocyst ไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) โดยวิธี micro-drop ทำละลายตัวอ่อนโดยนำ micro-drop ไปไว้ใน 0.6 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาที และล้างใน 0.4 0.2 และ 0 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาทีในแต่ละครั้ง ตรวจสอบการอยู่รอดหลังจากทำละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง และนำตัวอ่อนไปย้อมแบบ differential ด้วย 75 µg/mL propidium iodide + 100 µg/mL Hoechst 33258 ความอยู่รอดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งในน้ำยา VS33 (86%) ต่ำกว่าในน้ำยา VS35 (94%) เล็กน้อย จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS33 และ VS35 มี 130±50 และ 128±30 ตามลำดับ โคตัวรับมีการตั้งท้องที่ 60 วันหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง 15.8 และ 11.8 % ตามลำดับ มีเพียงโคตัวรับที่ตั้งท้องจากตัวอ่อนสดได้คลอดลูกออกมา การทดลองนี้สรุปได้ว่าสามารถประสบความสำเร็จในการนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสนำไปทำ vitrification ในน้ำยา VS33 และ VS35 โดยวิธี micro-drop

Abstract

This project was divided into 3 experiments. In Experiment 1, the objective was to examined the efficiency of cloning American Brahman bull using ear fibroblast as donor cell and tested the pregnancy and calving rates after transferred cloned embryos to recipients. The fusion and blastocyst rates were 84.7 and 31.8 %, respectively. Sixty two cloned hatching blastocysts were transferred to 39 recipients resulting 14 (36%) recipients pregnant at 60 days. Four recipients aborted 4 fetuses during 200-240 days of pregnant. Ten recipients (26%) gave birth to 11 calves (1 twin calves), 4 calves died soon after birth whereas another 7 calves survived and had normal development after birth. The DNA microsatellite analysis showed that cloned calves and donor cells were the same pattern and obviously different from recipients. In conclusion, ear

fibroblasts of American Brahman bull can be reprogrammed after cloning and produced high rate of live calves born.

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

Experiment 3, The objective of this study was to compare the effects of concentration of EG and DMSO in the vitrification solution on the survival rate of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. Ear fibroblasts of female HF were used as donor cell. The embryos were cultured in mSOFaa medium + 0.3% BSA for 7 days. Cloned blastocysts at middle- and late-hatching were vitrified in VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) or VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) using micro-drop technique. Embryos were warmed by directly placed micro-drop into 0.6 M sucrose at 38° C for 5 min and washed in 0.4 , 0.2 and 0 M sucrose for 5 min in each step at at 38° C. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h and differential stained with 75 µg/mL propidium iodide + 100 µg/mL Hoechst

33258. The cryosurvival of blastocysts after cultured of VS33 (86%) were slightly lower than VS35 (94%). Cell numbers of vitrified blastocysts were 130±50 and 128±30 in VS33 and VS35, respectively. The pregnancy rate at days 60 of fresh and vitrified embryos were 15.8 and 11.8 %, respectively. Only pregnant recipients from fresh embryos gave birth to live calves. In conclusion, bovine cloned blastocysts were successfully vitrified by using micro-drop technique in VS33 and VS35.

Executive Summary

ทุนพัฒนานักวิจัย ปี 2545

(1 พฤศจิกายน 2545 – 31 ตุลาคม 2546)

ชื่อโครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell : Comparison of pregnancy rate after transferring fresh and frozen-thawed embryos.

ผู้วิจัย นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

ผลงานวิจัยที่ทำได้

1. ทำการทดลองโคลนนิ่งโคพันธุ์อเมริกันบราห์มัน โดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ ได้ลูกโคเกิดมามีชีวิตและสุขภาพแข็งแรงรวม 7 ตัว และยืนยันการเป็นลูกโคโคลนนิ่งด้วยการตรวจหา DNA microsatellite แล้ว ผลการทดลองนี้นับเป็นความสำเร็จได้ลูกโคโคลนนิ่งสายพันธุ์โคเนื้อจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกันมากที่สุดเท่าที่มีรายงานมาแล้ว

2. ทำการทดลองศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็ง และ hatching stage ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี LAA จะมีความทนทานต่อขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยจะขึ้นอยู่กับขนาดของ hatching stage และ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตรารอดหลังการแช่แข็งและละลาย อัตราการั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่แตกต่างกัน โคตัวรับที่อุ้มท้องตัวอ่อนสดได้คลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนโคตัวรับที่อุ้มท้องตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งลูกก่อนครบกำหนดคลอด

3.ทำการทดลองศึกษาการแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop จากการทดลองพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ในน้ำยา VS33 และ VS35 ตัวอ่อนมีอัตรารอดหลังละลายสูง และการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่ตัวรับ แต่มีเฉพาะตัวรับที่

ฝากตัวอ่อนสดเท่านั้นที่สามารถคลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวรับที่ฝากตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งทั้งหมด

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

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

2. manuscript กำลังเขียนเพื่อส่งไปตีพิมพ์

Suteevun-Phermthai, T., Curshoue, C., Muenthaisong, S., Tian, X.C and **Parnpai, R.** 2006. Is IGF2R a course of abnormality in clones?

3. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ 3 เรื่อง

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod.Fert.Dev.* 16: 174.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai. R.** 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference.* Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.

Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai. R.** 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.

4. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับชาติ 3 เรื่อง

ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไชสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจากVitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไชสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไชสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

5. รางวัลที่ได้รับซึ่งเป็นผลจากการทำวิจัยเรื่องนี้

1.รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมทอ็ปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก

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

3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการดีเด่น ด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 1 การโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันและการย้ายฝากตัวอ่อน

บทนำ

ปัจจุบันมีสัตว์หลายชนิดที่เกิดมาจากการทำโคลนนิ่ง ได้แก่ แกะ (Wilmut และคณะ, 1997) โค (Cibelli และคณะ, 1998, Kato และคณะ, 1998) แพะ (Baguisi และคณะ, 1999) หนูถีบจักร (Wakayama และคณะ, 1998) สุกร (Polejaeva และคณะ, 2000, Onishi และคณะ, 2000) แมว (Shin และคณะ, 2002, Yin และคณะ, 2005) กระต่าย (Chesne และคณะ, 2002) ม้า (Galli และคณะ, 2003) หนูขาว (Zhou และคณะ, 2003) สุนัข (Lee และคณะ, 2005) และเฟอร์เร็ต (Li และคณะ, 2006) เป็นต้น เนื่องจากความสำเร็จของการโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิดดังกล่าวทำให้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจในการศึกษาเรื่องต่างๆ แตกแขนงออกไปมากขึ้น เช่นการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบก่อนที่จะนำมาทำโคลนนิ่ง การนำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากการโคลนนิ่งมาผลิตเซลล์ต้นกำเนิด การทำโคลนนิ่งเพื่อใช้ในการรักษาโรคทางการแพทย์ การทำโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เป็นต้น

มีรายงานการโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ชนิดต่างๆ ในร่างกายและสามารถผลิตลูกโคจากการโคลนนิ่งได้ อาทิเช่น เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนดัดแปลงพันธุกรรม (Cibelli และคณะ, 1998; Zakharchenko และคณะ, 2001) เซลล์คิวมูลัส (Kato และคณะ, 1998) เซลล์บุท่อนำไข่ (Kato และคณะ, 1998) เซลล์เม็ดเลือดขาว (Galli และคณะ, 1999) เซลล์แกรนูโลซ่า (Wells และคณะ, 1999) เซลล์บุต่อมน้ำนม (Zakharchenko และคณะ, 1999a) เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู (Parnpai และคณะ, 2000) สำหรับการโคลนนิ่งแกะดอลลี่นั้น Wilmut และคณะ (1997) เลี้ยงเซลล์เต้านมในน้ำยาที่มีปริมาณซีรัมน้อยเพื่อที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0 แต่ในการโคลนนิ่งโคนั้น Cibelli และคณะ (1998) ได้ใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะ G1 เป็นเซลล์ต้นแบบซึ่งหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่แม่ตัวรับก็ประสบความสำเร็จได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา และหลังจากตรวจอายุของลูกโคโคลนนิ่งโดยใช้วิธีตรวจความยาวของ telomere พบว่าลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดมาจากการใช้เซลล์ร่างกายที่อยู่ในระยะ G1 เซลล์สามารถที่จะย้อนกลับมามีอายุเท่ากับลูกโคที่มีการเจริญเติบโตตามปกติ (Kato และคณะ, 2000)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มจำนวนโคเนื้อ สายพันธุ์อเมริกันบราห์มัน ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมโดยใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่ง และอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากเชื่อมเซลล์โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 ที่ผลิตโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) การเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะเลี้ยงในน้ำยา Alpha minimal essential medium (α-MEM) ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) น้ำยา *in vitro* maturation medium (IVM) ที่ใช้ในการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วประกอบด้วย TCM199 ที่เติม 10% FBS, 50 IU/mL hCG (Chorulon®; Intervet, Boxmeer, Netherlands), 0.02 AU/mL FSH (Antrin®; Denka Phamaceuticals, Tokyo, Japan) และ 1 μg/mL estradiol 17β. การกำจัดนิวเคลียสออกและการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วย ethanol จะใช้น้ำยา Emcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) เป็นน้ำยาหลัก การเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าจะใช้น้ำยา Zimmermann fusion medium (ZFM) น้ำยาที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนจะใช้ modified synthetic oviduct fluid with amino acids (mSOFaa) ที่เติม 0.3% fatty acid-free BSA (Sigma, A6003)

2. การผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง

2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นหนังใบหูโคเนื้อพันธุ์อเมริกันบราห์มันเพศผู้ชื่อตูมตาม จำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 0.5 ซม. และเก็บไว้ในน้ำยา modified Dulbeco's phosphate buffer saline (mDPBS) ที่อุณหภูมิ 4°C ระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาเลาะกระดูกอ่อนออกจากหนังใบหู และตัดหนังใบหูออกเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปวางเรียงไว้ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (Nunc, Roskilde, Denmark) และปิดทับด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยา α-MEM ที่มี 10% FBS ปริมาณ 5 mL ลงในจานเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงนาน 8-10 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C 5%CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกจากหนังใบหูจะถูกนำไปขยายการเลี้ยง (passages) โดยการเติม 0.25% Trypsin-EDTA แล้วเก็บเซลล์ที่ได้นำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (Nunc) ขนาด 25 ลบ.ซม. ในน้ำยา α-MEM ที่มี 10% FBS เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูจะถูกนำไปแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เมื่อขยายการเลี้ยงไปแล้ว 3 ครั้ง เซลล์ที่ถูกละลายออกมาจะนำไปเลี้ยงในน้ำยา α-MEM ที่มี 10% FBS และใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่ง โดยจะใช้เป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งถึง passages ที่ 8 เซลล์ต้นแบบจะถูกทำเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดย 0.25%Trypsin-EDTA แล้วนำไปใส่ในน้ำยา Emcare holding เพื่อใช้ในขั้นตอนการฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกไปแล้วต่อไป

2.2 การเตรียมไซโตพลาส

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์และเก็บไว้ใน 0.9% NaCl ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มขนาด 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 mL เจาะดูดไข่

จากรังไข่โดยเลือกเฉพาะถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3–6 มม. และนำไข่ที่ได้มาล้าง 4 ครั้งในน้ำยา mDPBS ที่เติม 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP) และคัดเฉพาะ cumulus-oocyte complexes (COCs) เท่านั้นไปเลี้ยงในน้ำยา IVM โดยเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/ 100 μL และปิดทับ หยดน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 in air ที่ 38.5°C นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะนำไข่ออกมาย่อยเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกไป โดยใช้ปิเปตแก้วที่ยืดให้ปลายมีขนาดเล็กดูดไข่เข้าออกในน้ำยาที่มี 0.2% hyarulonidase จากนั้นนำไข่ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสมาล้าง 5 ครั้งในน้ำยา Emcare holding และเลือกเฉพาะไข่ที่มี 1st polar body มาวางไว้ในน้ำยาที่มี 5 μg/mL cytochalasin B และนำไปกำจัดนิวเคลียสออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (กำลังขยาย 200 เท่า) โดยใช้ micromanipulator โดยจัดให้ตำแหน่ง 1st polar body อยู่ที่ตำแหน่ง 12 นาฬิกา จากนั้นใช้เข็มแก้วตัด zona pellucida ที่อยู่เหนือ 1st polar body จากนั้นกดให้ 1st polar body และไซโตพลาสซึม (10%) หลุดออกมาจาก zona pellucida จากนั้นนำไข่ที่กำจัดนิวเคลียสแล้วมาล้าง 5 ครั้งในน้ำยา Emcare holding และรอจนกระทั่งฉีดเซลล์ต้นแบบ

2.3 การฉีด เชื่อมเซลล์ต้นแบบและการเลี้ยงตัวอ่อน

ใช้ micromanipulator ฉีดเซลล์ต้นแบบเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 14-16 μm จะถูกปล่อยเข้าไปที่บริเวณ perivitelline space ของไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไปวางไว้ในน้ำยา ZFM การเชื่อมเซลล์ต้นแบบและไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกแล้วเข้าด้วยกันจะใช้ fusion electrode โดยปล่อยไฟฟ้ากระแสตรง 2 ครั้ง (2.4 kV/cm นาน 15 μs; electrodes ทั้งสองห่างกัน 110 μm) โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 หลังจากทำการเชื่อมเซลล์แล้ว 1 ชั่วโมงจึงจะบันทึกว่ามีการเชื่อมสำเร็จเท่าไร จากนั้นนำเฉพาะไข่ที่เชื่อมเซลล์สำเร็จไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวในน้ำยา Emcare holding ที่มี 7% ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa + 10% FBS ที่มี 10 μg/mL cycloheximide + 1.25 μg/mL Cytochalasin D โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa medium ที่มี 0.3% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 μL) จากนั้นตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์จะถูกนำไปเลี้ยงร่วมกับท่อนำไข่โค (bovine oviductal epithelial cells) ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 μL) จะเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 μL และน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

2.4 การย้ายฝากตัวอ่อน

จะนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7-8 วันไปย้ายฝากสู่ตัวรับโดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยจะย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยจะนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกด้านที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โคที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและที่เป็นสัดตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดทำได้โดยการฉีด 500 μg ของ $PGF_{2\alpha}$ analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) และจะตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอุลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้อง และจะล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

2.5 การตรวจ DNA ลูกโคโคลนนิ่ง

การสกัด DNA จากเลือดของโคต้นแบบ ลูกโคโคลนนิ่ง และโคตัวรับจะใช้ชุดสกัด "Perfect gDNA blood mini, for human and animal blood" จากบริษัท Eppendorf การตรวจ DNA microsatellite จะใช้ Primer 2 ชุด คือ MGTG 4B (5' GAGCAGCTTCTTTCTTTCTCATCTT-3') มี PCR product ขนาด 134-164 bp ส่วนชุดที่สองคือ TGLA 126 (5' TTGGTCTCTATTCTCTG AATATTCC-3') มี PCR product ขนาด 106-137 bp และใช้ PCR cycle ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นจะเริ่มเข้า cycle ที่ 1 โดยเริ่มเข้าขบวนการ denaturation ที่ 95°C นาน 1 นาที ที่ annealing step 46°C นาน 1 นาที extention ที่ 72°C นาน 1.30 นาที จะทำทั้งหมด 40 cycles ในรอบสุดท้ายจะคงอุณหภูมิที่ 72°C ออกไปอีก 5 นาที จากนั้น PCR product ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาแยกหาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย 6% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จากนั้นจึงนำ gel ที่ได้มาย้อม silver staining จากนั้นทำการเปรียบเทียบแถบ DNA ที่ปรากฏระหว่างโคต้นแบบ ลูกโคโคลนนิ่งและแม่โคตัวรับ

ผลการทดลอง

หลังการโคลนนิ่งโดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 ได้อัตราการเชื่อมเซลล์สำเร็จ 84.7% และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจนถึงระยะ blastocyst 31.8% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

Fused (%)	Embryos cultured	Cleaved (%)	8-cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
464/548 (84.7)	451	393/451 (87.1)	292/451 (64.7)	173/393 (44.0)	125/393 (31.8)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst จำนวน 62 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 39 ตัว (ตารางที่ 2) พบว่าหลังจากล้วงตรวจที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว (36%) มีโคตัวรับแท้งลูกเดี่ยวทั้งหมด 4 ตัว ระหว่าง 200-240 วันหลังเป็นสัด และมีแม่โคจำนวน 10 ตัว ที่ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด (26%) พบว่ามีแม่โคที่ตั้งท้องลูกแฝด 1 ตัว (ตารางที่ 3) โคตัวรับคลอดลูกตัวแรกตามธรรมชาติออกมา 1 ตัวในวันที่ 25 ตุลาคม 2546 มีน้ำหนักแรกเกิด 32.5 กก. มีสุขภาพแข็งแรงดีได้รับการตั้งชื่อว่า ตูมตาม 2 โคตัวรับหมายเลข CB 17 ครบกำหนดคลอดแต่ยังไม่มีอาการพร้อมคลอดจึงทำการผ่าตัดทำคลอดซึ่งได้ลูกโคออกมามีชีวิตอยู่ได้ 15 นาทีก็เสียชีวิต หลังจากที่แม่โคตัวรับคลอดลูกทั้งหมดมีการเจาะเลือดลูกโคที่มีชีวิตทั้งหมด 7 ตัว (ตูมตาม

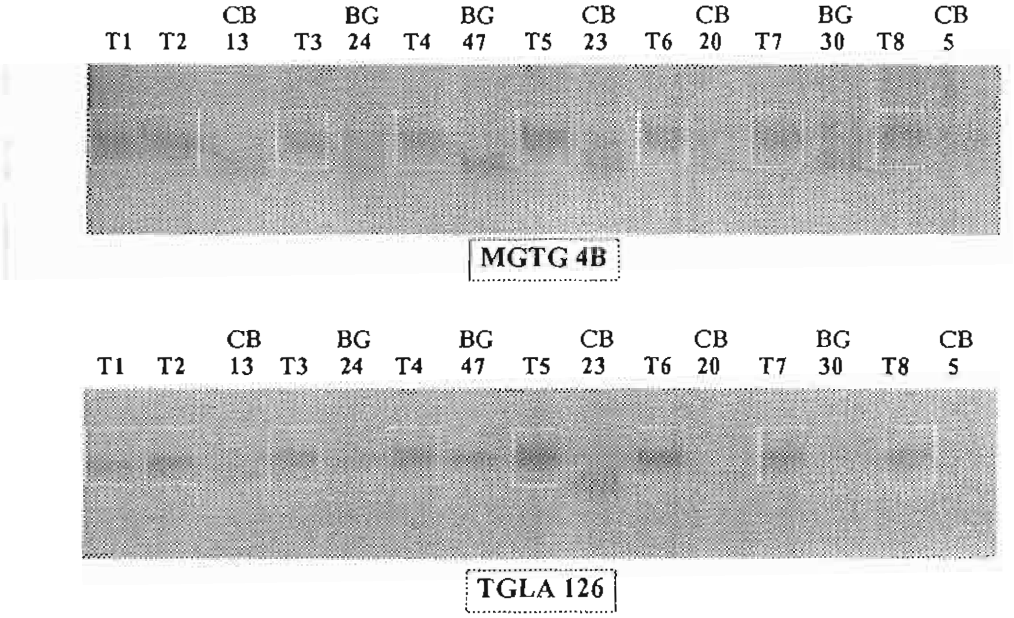
2-8) และแม่โคตัวรับมาตรวจวิเคราะห์ DNA microsatellite พบว่าตูมตามและลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัวมี DNA เหมือนกันทุกประการและแตกต่างจาก DNA ของแม่โคตัวรับ (รูปที่ 1) ลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัว (รูปที่ 2) มีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 41.21 กก. โดยลูกโคโคลนนิ่งตูมตามตัวแรก (ตูมตาม 2) ที่คลอดออกมามีน้ำหนักแรกเกิดน้อยที่สุด (32.5 กก.) และลูกโคโคลนนิ่งตูมตามตัวที่ 4 (ตูมตาม 5) มีน้ำหนักแรกเกิดสูงที่สุด (46 กก.) เมื่อเทียบกับลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัว

ตารางที่ 2 ผลการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7-8 วัน สู่แม่โคตัวรับ

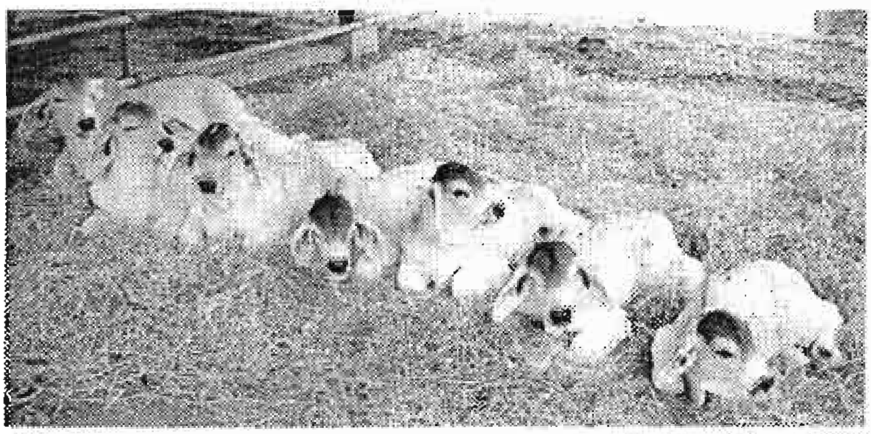
จำนวนตัวรับ	จำนวนตัวอ่อน/ตัวรับ	จำนวนตัวรับตั้งท้อง (%)						จำนวนตัวรับคลอดลูก (%)
		60 วัน	180 วัน	200 วัน	220 วัน	240 วัน	260 วัน	
39	62/39 (1.6)	14 (36%)	14 (36%)	13 (33%)	12 (31%)	11 (28%)	10 (26%)	10 (26%)

ตารางที่ 3 รายละเอียดการคลอด น้ำหนักแรกเกิด ของลูกโคโคลนนิ่ง

หมายเลขตัวรับ	ว.ด.ป. คลอด	ระยะเวลาตั้งท้อง (วัน)	ชนิดของการคลอด	นน. แรกเกิด (กิโลกรัม)	สถานภาพหลังคลอด	สถานภาพปัจจุบัน
CB 13	25 ต.ค. 2546	276	ธรรมชาติ	32.5	มีชีวิต	มีชีวิต
CB 17	26 ต.ค. 2546	281	ผ่าตัด	45.5	ตาย 15 นาที หลังคลอด	-
BG 24	25 พ.ย. 2546	276	ธรรมชาติ	45.0	มีชีวิต	มีชีวิต
BG 47	30 พ.ย. 2546	276	ธรรมชาติ	44.5	มีชีวิต	มีชีวิต
CB 52	11 ธ.ค. 2546	281	ธรรมชาติ	44.0	ตาย 20 ชั่วโมง หลังคลอด	-
CB 69	12 ธ.ค. 2546	272	ธรรมชาติ	19.0	ตาย 5 นาที หลังคลอด	-
			ธรรมชาติ	25.0	ตาย 15 นาที หลังคลอด	-
CB 23	24 ธ.ค. 2546	283	ธรรมชาติ	46.0	มีชีวิต	มีชีวิต
CB 20	28 ธ.ค. 2546	290	ธรรมชาติ	40.0	มีชีวิต	มีชีวิต
BG 30	5 ม.ค. 2547	292	ธรรมชาติ	42.5	มีชีวิต	มีชีวิต
CB 5	7 ม.ค. 2547	286	ธรรมชาติ	38.0	มีชีวิต	มีชีวิต



รูปที่ 1 ผลการตรวจ DNA microsatellite ลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัวเทียบกับตูมตามโคต้นแบบและแม่โคตัวรับ โดย T1 คือ DNA ที่ได้จากตูมตามโคต้นแบบ; T2-T8 คือ DNA ของลูกโคโคลนนิ่งตูมตามตัวแรกจนถึงตัวที่ 7 ที่มีชีวิต; CB และ BG ตามด้วยตัวเลขคือหมายเลขประจำตัวแม่โคตัวรับ



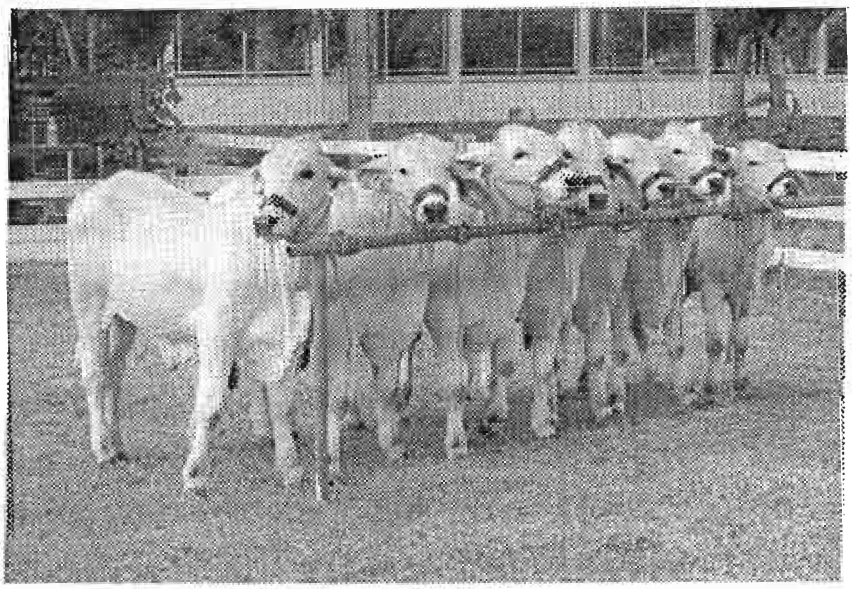
รูปที่ 2 ลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัว ถ่ายรูปขณะมีอายุได้ 1-2 เดือน

จากข้อมูลการเจริญเติบโตขณะยังไม่หย่านมของลูกโคโคลนนิ่งในระยะ 6 เดือน (ตารางที่ 4) พบว่าลูกโคโคลนนิ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 920 กรัม/วัน ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์บราห์มันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง (730 กรัม/วัน) อัตราการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งในระยะก่อนหย่านมพบว่าขึ้นกับความสามารถในการผลิตน้ำนมของแม่ตัวรับ แม่ตัวรับของตูมตาม 5 มีปริมาณน้ำนมน้อยกว่าแม่ตัวรับตัวอื่นๆ ทำให้

อัตราการเจริญเติบโตของตูมตาม 5 น้อยกว่าตูมตามตัวอื่น เมื่อลูกโคอายุ 11-12 เดือน (รูปที่ 3) ลูกโคโคลนนิ่งมีสุขภาพแข็งแรงทุกตัว

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งตั้งแต่เกิดจนถึงอายุ 6 เดือน

โคโคลนนิ่ง	น้ำหนัก (กก.)							อัตราการเจริญเติบโต (กก./วัน)
	เกิด	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	
ตูมตาม 2	32.5	61.0	104.5	136.5	170.0	198.5	227.0	1.08
ตูมตาม 3	45.0	78.5	109.5	147.0	176.5	210.0	229.0	1.02
ตูมตาม 4	44.5	61.0	91.0	140.0	140.0	181.5	201.0	0.86
ตูมตาม 5	46.0	59.5	81.5	115.0	115.0	129.0	146.0	0.55
ตูมตาม 6	40.0	67.5	96.5	157.0	157.0	184.5	202.0	0.90
ตูมตาม 7	42.5	78.5	107.5	159.0	159.0	183.0	206.0	0.90
ตูมตาม 8	38.0	89.5	118.0	186.0	186.0	210.0	240.0	1.12
น.น. เฉลี่ย	41.2	70.7	101.2	148.6	157.6	185.2	207.2	0.92



รูปที่ 3 ลูกโคโคลนนิ่งตูมตามทั้ง 7 ตัว ถ่ายรูปขณะมีอายุได้ 11-12 เดือน

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F1 ที่ผลิตโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ผลการทดลองที่ไม่ต่างจากเครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ (รังสรรค์ และคณะ, 2543) และสามารถผลิตลูกโคโคลนนิ่งคลอดออกมามีชีวิตรอดได้ถึง 7 ตัว จากผลการการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อพันธุ์ดีเยี่ยม มีโคตัวรับตั้งท้องจนถึง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมาและมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill และคณะ, 2000)

ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ต้นแบบในระยะ G1 ซึ่งแตกต่างจากการโคลนนิ่งแกะดอลลี่ซึ่งใช้เซลล์ต้นแบบในระยะ G0 จากรายงานของ Wilmut และคณะ (1997) พบว่าเซลล์ต้นแบบควรอยู่ในระยะ G0 เพื่อให้เซลล์ต้นแบบเกิดการ reprogram ที่สมบูรณ์ แต่ในการทดลองของ Parnpai และคณะ (2000) พบว่าเซลล์ต้นแบบที่อยู่ในระยะ G0 หรือเซลล์ระยะG1 (cycling stage) มีอัตราการเจริญสู่ระยะ blastocyst ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Hill และคณะ (1999) และ Zakhartchenko และคณะ (1999) พบว่าเซลล์ในระยะ cycling stage มีอัตราการเจริญสู่ระยะ blastocyst สูงกว่าเซลล์ระยะ G0

น้ำหนักแรกเกิดของลูกโคโคลนนิ่งดูมตามพบว่ามีน้ำหนักค่อนข้างมาก โดยมีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 41.21 กก. วัวพันธุ์อเมริกันบราห์มันจะมีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 30 กก. (http://www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db_directory/ruminant/lg_rum/cattle/cattle_braman.htm) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในหลอดแก้วและตัวอ่อนโคลนนิ่ง จะมีแนวโน้มที่จะมีน้ำหนักแรกเกิดมากกว่าตัวอ่อนตามธรรมชาติ (Behboodi และคณะ, 1995; Garry และคณะ, 1996; Wilson และคณะ, 1995) ในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องพบว่าแม่ตัวรับมีอัตราการแท้งที่สูง มีการศึกษาพบว่าสาเหตุที่เกิดการแท้งในระยะเวลาดังกล่าว สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของการสร้างรกของลูกสัตว์โคลนนิ่ง เช่น Hydroallantois, Edema, มีปริมาณและขนาดของ Cotyledons ที่ผิดปกติ (Hill และคณะ, 1999, 2000, 2001; De Sousa และคณะ, 2000; Stice และคณะ, 1996; Wells และคณะ, 1999) ซึ่งในลูกโคปกติจะมีปริมาณ Cotyledons 70-120 อัน และมีขนาดตั้งแต่ 5-8 ซม (Kennedy and Miller, 1993) มีการศึกษาพบว่า 24% ของการตายของลูกสัตว์โคลนนิ่งหลังคลอดเกิดจากความผิดปกติของระบบกล้ามเนื้อค้ำจุนร่างกาย (musculoskeletal system) ซึ่งรวมทั้งความผิดปกติของเส้นเอ็นที่ยึดรั้งระหว่างข้อต่อ หลังจากการเจาะตรวจเลือดของโคโคลนนิ่งอายุ 2 ปี เปรียบเทียบกับโคปกติพบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของโคโคลนนิ่ง (Wells และคณะ, 2004) มีรายงานตรวจพบว่าความผิดปกติที่พบได้ในโคโคลนนิ่งคือความผิดปกติของต่อมไทมัส (Renard และคณะ, 1999) การศึกษาในหนูถีบจักรโคลนนิ่งพบว่าระบบภูมิคุ้มกันจะต่ำกว่าหนูปกติ (Ogonuki และคณะ, 2002) แต่ในโคโคลนนิ่งไม่มีรายงานความผิดปกติลักษณะดังกล่าว (Lanza และคณะ, 2001) และมีการทดลองพบว่ามีความผิดปกติของขบวนการ reprogramming ส่งผลให้เกิด

ความผิดปกติต่อขบวนการ DNA methylation ซึ่งมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อน และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนส์, X-chromosome inactivation, genomic imprinting, chromatin modification ซึ่งมีผลต่อขบวนการสร้างรกและการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของตัวอ่อน และเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งและตายของโคโคลนนิ่ง (Li และคณะ, 1992; Okano และคณะ, 1999)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การโคลนนิ่งสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนและคงไว้ซึ่งสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้สามารถผลิตลูกโคโคลนนิ่งตูมตามได้ 7 ตัว นอกจากนี้ยังมีโคตัวรับที่ตั้งท้อง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่เคยมีรายงานมา และมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill และคณะ, 2000) ดังนั้นเทคโนโลยีโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อพันธุ์ดีเยี่ยมโดยกำหนดพันธุกรรมได้ตามต้องการ

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็ง และ hatching stage ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

บทนำ

การแช่แข็งโดยวิธี vitrification เป็นวิธีการที่ใช้ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิตเพื่อที่จะเก็บรักษาไว้ใช้ในอนาคตได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำมากๆ (-196°C) ซึ่งวิธี vitrification นี้ Rall และ Fahy (1985) ได้คิดค้นขึ้นเพื่อที่จะแช่แข็งตัวอ่อนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นวิธีแช่แข็งที่ไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งโดยใช้สารที่มีความเข้มข้นดังนี้คือ 20.5% (w/v) DMSO, 15.5% (w/v) acetamide, 10% (w/v) 1,2 propanediol, 6% (w/v) polyethylene glycol โดย equilibrate ตัวอ่อนในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ cryoprotectant ในระดับ 25% ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นจึงย้ายมาไว้ในน้ำยาที่มีความเข้มข้น 50% ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วจึงย้ายไปไว้ที่ความเข้มข้น 100% ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นจึงทำ vitrification โดยจุ่มลงในไตรเจนเหลว ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 Massip และคณะเป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการทำ vitrification ตัวอ่อนโคและเป็นทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำ vitrification แล้วแม่โคตัวรับมีการตั้งท้อง วิธีการนี้จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นในระหว่างที่ลดอุณหภูมิ และจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำยาให้กลายเป็นของแข็งที่มีลักษณะใสคล้ายแก้ว แต่ยังคงรักษาคุณสมบัติของของเหลวไว้ได้แต่เปลี่ยนลักษณะทางกายภาพจากลักษณะของเหลวไปเป็นของแข็งเท่านั้น การไม่เกิดผลึกน้ำแข็งจะช่วยให้เซลล์ไม่ได้รับอันตรายที่มีสาเหตุมาจากผลึกน้ำแข็ง เคล็ดลับของการทำให้ vitrification solution ไม่เกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งอยู่ที่การลดอุณหภูมิของ vitrification solution ลงอย่างรวดเร็วและการใช้สารที่เป็น cryoprotectants ซึ่งจะช่วยให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็ง อัตราเร็วของการลดอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดน้ำแข็งที่ใสคล้ายแก้วได้ในน้ำบริสุทธิ์นั้นจะต้องลดอุณหภูมิลงด้วยอัตราเร็วอย่างน้อย 107°C/วินาที จึงจะทำให้เกิดปรากฏการณ์นี้ได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ vitrification solution ปริมาณที่น้อยๆ เพื่อที่จะทำให้เกิดการส่งผ่านอุณหภูมิ (heat transfer)ได้รวดเร็วที่สุด

ปัจจุบันมีการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยวิธี vitrification กันอย่างต่อเนื่องจนปัจจุบันมีการคิดค้นภาชนะและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการแช่แข็ง อาทิเช่น electron microscope grids (Martino และคณะ, 1996) open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ., 1997) cryoloop (Lane และคณะ., 1999) hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ., 2000) gel-loading tip (Tominaga and Hamada, 2001) และ flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ., 2002) ซึ่งสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ 1 เซลล์จนถึงระยะ blastocyst ได้

ตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีโคลนนิ่งจะมีรูที่บริเวณเปลือกไข่ (zona pellucida) ซึ่งเกิดจากขบวนการกำจัดนิวเคลียสออกจากไข่ ทำให้ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst เร็วกว่าตัวอ่อนที่ปฏิสนธิตามธรรมชาติหรือผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว ซึ่งจะมี zona pellucida ที่สมบูรณ์ ในปี 2000 Nguyen และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง โดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 250 μl เป็นภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อน โดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40) ซึ่งเป็นน้ำยาแช่แข็งที่มีรายงานมาแล้วโดย Kasai และคณะ (1990) ซึ่งใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากสูตรน้ำยาชนิดเดียวกัน Gong และคณะ (2004) ประสบความสำเร็จในการผลิตลูกโคโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี vitrification

มีการศึกษาพบว่าการการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีซีรั่ม จะทำให้ตัวอ่อนเกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์สูง แต่หากเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่ไม่มีซีรั่มจะช่วยให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีเนื่องจากมีปริมาณไขมันในเซลล์น้อย (Massip และคณะ, 1995; Yamashita และคณะ., 1999; Abe และคณะ., 2002) การใส่ unsaturated fatty acid-conjugated BSA (linoleic acid–albumin, LAA) ในน้ำยา IVM, IVF (Hochi และคณะ, 1999) และ IVC (Tominaga และคณะ, 2000; Hochi และคณะ, 1999; Imai และคณะ, 1997) จะช่วยให้ตัวอ่อนมีความทนทานต่อการแช่แข็งเพิ่มมากขึ้น

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ผลของ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน และ hatching stage ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้เหมือนในการทดลองที่ 1

2. การผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง

2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นหนังใบหูโคนมขาวดำเพศเมียจำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 0.5 ซม. และดำเนินการต่อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 การเตรียมไซโตพลาส

ดำเนินการเหมือนการทดลองที่ 1

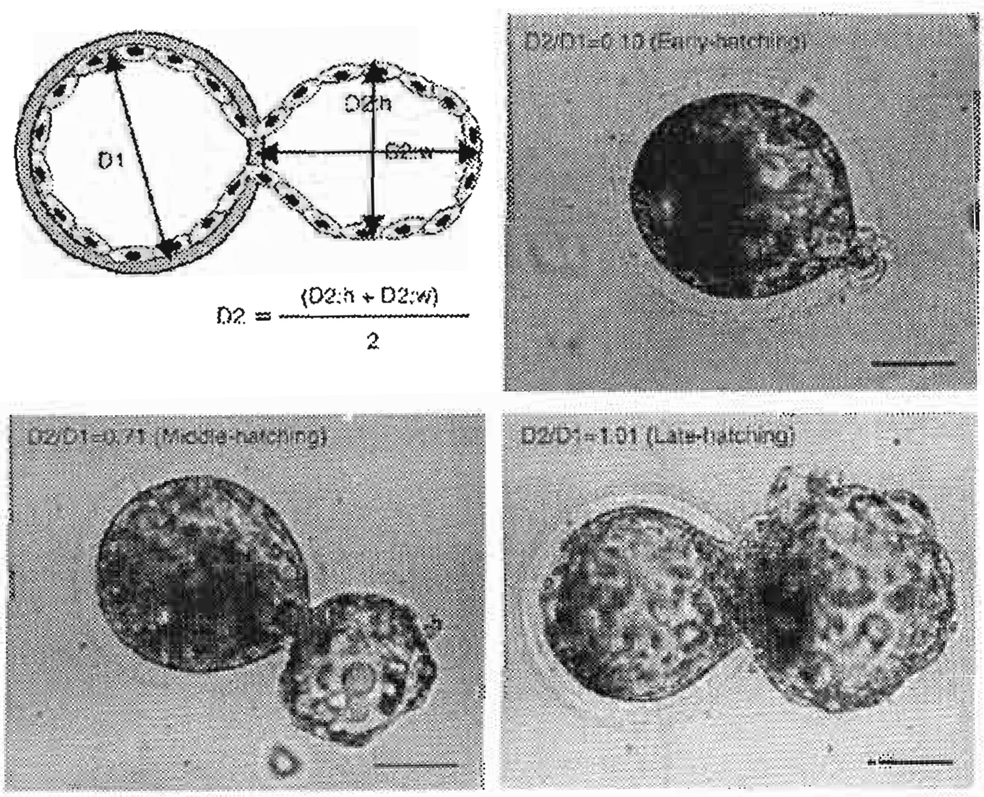
2.3 การฉีด เชื่อมเซลล์ต้นแบบและการเลี้ยงตัวอ่อน

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และหลังจากนำไข่ที่เชื่อมเซลล์สำเร็จแล้วจะนำไปกระตุ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa + 10% FBS ที่มี 10 μg/mL cycloheximide + 1.25 μg/mL cytochalasin D โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อน

ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 μL) จากนั้นคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 μL) จะเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 μl และเติมน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

2.4 หลักการคัดเลือกตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst เพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification

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



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

2.5 การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี MVC และการละลายตัวอ่อน

การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี MVC

ตัวอ่อนจะถูกนำไปไว้ในน้ำยา equilibration ซึ่งประกอบด้วย TCM199HEPES + 20% FBS (M199/FBS) ที่มี 10% (v/v) ethylene glycol (EG) + 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา vitrification ซึ่งประกอบด้วย M199/FBS ที่มี 20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose มีและไม่มี10% (w/v) Ficoll จากนั้นนำตัวอ่อน 1-3 ใบไปวางบนปลายของ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) โดยให้มีน้ำยา vitrification เหลืออยู่บน Cryotop ให้น้อยที่สุด (<1 μl) หลังจากตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification ครบ 30 วินาทีให้นำ Cryotop แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

การละลายตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากละลาย

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

2.6 การย้ายฝากตัวอ่อน

ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งและละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนจะถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วันโดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยจะย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยจะนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โค ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและที่เป็นสัดตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดทำได้โดยการฉีด 500 μg ของ $PGF_{2\alpha}$ analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) ตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ไม่ได้แช่แข็งจะถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับเช่นเดียวกัน (กลุ่มควบคุม) และจะตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอุลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้องและจะล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อยกลุ่มละ 3 ซ้ำ อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งจะวิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test ส่วนอัตราการตั้งท้องของแม่ตัวรับจะใช้ Fisher's exact probability test ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้โปรแกรม StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) ค่าความแตกต่างทางสถิติจะคิดที่ค่า $P < 0.05$

3. ผลการทดลอง

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

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

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

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA

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

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

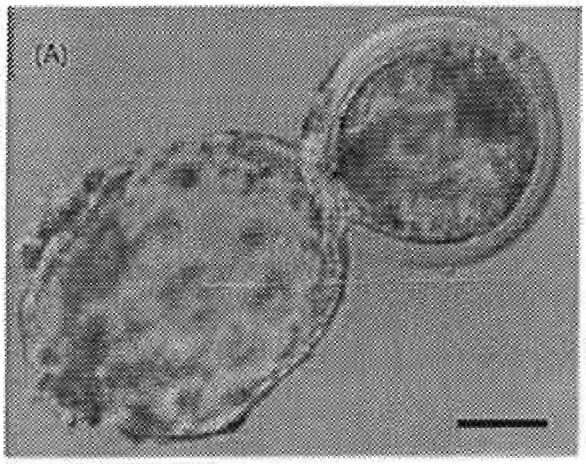
LAA during IVC	Ficoll in VS	No. survived/no. examined (%)			
		Hatching stage			
		Early	Middle	Late	รวม
+	-	23/30 (77)	20/27 (74)	24/30 (80)	67/87 (77)[a]
+	+	23/34 (68)	15/28 (54)	19/32 (59)	57/94 (61)[b]
-	-	15/27 (56)[x]	20/30 (67)[x,y]	28/35 (80)[y]	63/92 (68)[a,b]

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

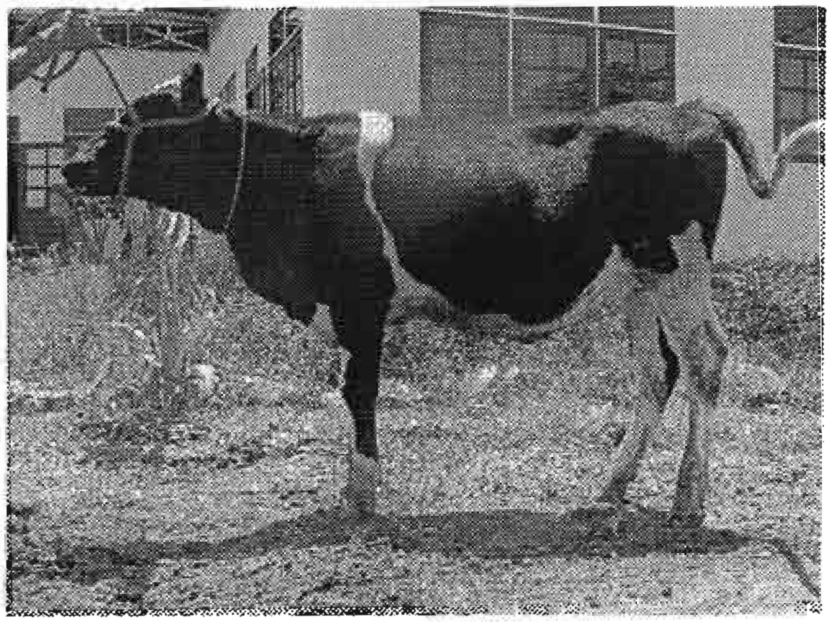
[b]ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$

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

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



รูปที่ 2 รูปตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน หลังจากแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง Scale bar = 50 μm



รูปที่ 3 ลูกโคโคลนนิ่ง 346-2 ที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งและตัวอ่อนสด

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

[a] ตัวรับทุกตัวตั้งท้องลูกตัวเดียว

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

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

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

วิจารณ์ผลการทดลอง

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

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

ยังคงมีรายงานเกี่ยวกับผลของการเติม LAA ลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วว่าสามารถเพิ่มอัตรารอดหลังการแช่แข็งโดยวิธี conventional freezing (Tominaga และคณะ, 2000; Hochi และคณะ, 1999; Imai และคณะ, 1997) ในการทดลองนี้พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในน้ำยาที่มี LAA จะช่วยทำให้ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst มีอัตรารอดมากขึ้น (ตารางที่ 2) การเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วจะไปเหนี่ยวนำให้เกิด intracellular lipid droplets (Yamashita และคณะ, 1999, Abe และคณะ, 2002) ซึ่งส่งผลให้ตัวอ่อนสุกร (Nagashima และคณะ, 1995) และโค (Ushijima และคณะ, 1999) มีความทนทานต่อการแช่แข็งลดน้อยลง นอกจากนี้คุณภาพของตัวอ่อนก็มีส่วนสำคัญที่เป็นสิ่งบ่งบอกถึงการพัฒนาและปริมาณเซลล์ตัวอ่อน ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA คุณภาพตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่ง LAA จะช่วยให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีขึ้นโดย LAA จะไปดัดแปลงส่วนประกอบของ lipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์เกิดได้ดีขึ้น ทำให้การแช่แข็งมีประสิทธิภาพดีขึ้นเนื่องจากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อย สำหรับในตัวอ่อนสุกรจะมีปริมาณของ lipid droplet ที่สูงในระยะแรกของการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนสุกรมีความทนต่อการแช่แข็งที่ค่อนข้างต่ำ (Nagashima และคณะ, 1995) จากการทดลองของ Hayashi และคณะ (1989) พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรระยะ expanded และ hatching blastocyst โดยวิธี conventional freezing หลังจากละลายตัวอ่อนสามารถพัฒนาต่อได้

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

ในการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาจนกระทั่งตัวอ่อนพัฒนาจนออกจาก zona pellucida หลังจากละลาย เนื่องจากตัวอ่อนที่ได้จะนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับทั้งที่เป็นโคสาวและแม่โค ซึ่งพบว่าหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งไม่มีโคตัวรับที่ตั้งท้องที่ 120 วัน ซึ่งสาเหตุการตั้งท้องไม่ครบจนกระทั่งคลอดอาจเกิดจากความผิดปกติของการสร้างรกของตัวอ่อนโคลนนิ่ง มีการศึกษาพบว่าในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องพบว่าแม่ตัวรับมีอัตราการแท้งที่สูง ซึ่งความผิดปกติที่มีรายงานในลูกโคโคลนนิ่งได้แก่ ความผิดปกติของการพัฒนาของรก ลูกโคโคลนนิ่งมีขนาดและน้ำหนักที่มากกว่าปกติ (large calf syndrome) ทำให้คลอดยาก และตายหลังคลอด (Cibelli และคณะ, 1998; Hill และคณะ, 1999; Wakayama และ Yanagimachi, 1999; Wells และคณะ, 1999; Hill และคณะ, 1999, 2001) และพบว่ารกของลูกโคโคลนนิ่งจะมีปริมาณ Placentome น้อยกว่าปกติ และพบว่า Placentome จะมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (Hill และคณะ, 1999) การพัฒนาที่ผิดปกติของรกอาจเกิดจากระบบเส้นเลือดที่ผิดปกติ หรืออิทธิพลของ epigenetic/imprinting gene ที่ผิดปกติ (Young และ Fairburn, 2000) imprinting gene มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต การพัฒนาของตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งรกด้วย ซึ่งมีหลายยีนส์ที่พบว่าเกิดการผ่าเหล่าหรือเกิดความผิดพลาดทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่งและรกผิดปกติ (Lau และคณะ, 1994; Guillemot และคณะ, 1994; Leighton และคณะ, 1995, 1996) สาเหตุดังกล่าวส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงขนาดของอวัยวะภายในที่ผิดปกติไป และเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนในครรภ์ตายและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา (Farin และคณะ, 2001)

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

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี LAA จะมีความทนทานต่อขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยจะขึ้นอยู่กับขนาดของ hatching stage และ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตรารอดหลังการแช่แข็งและละลาย

การทดลองที่ 3 การแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop

บทนำ

Rall และ Fahy (1985) เป็นทีมนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกของโลกที่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูโดยวิธี vitrification แล้วย้ายฝากให้แม่ตัวรับและมีลูกหนูเกิดขึ้น จากนั้นปี 1987 ก็ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยวิธี vitrification (Massip และคณะ, 1987) และมีการคิดค้นภาชนะบรรจุตัวอ่อนและวิธีการที่ใช้แช่แข็งขึ้นมากมาย เช่น electron microscope grids (Martinoและคณะ, 1996) open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ, 1997) cryoloop (Lane และคณะ, 1999) hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ, 2000) gel-loading tip (Tominaga and Hamada, 2001) และ flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ, 2002) การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification นี้ยังประสบความสำเร็จในคนอีกด้วยโดยมีเด็กที่เกิดจากตัวอ่อนแช่แข็งแล้ว (Mukaida และคณะ, 2001) การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนจะแช่แข็งและละลาย เพื่อดูการพัฒนาว่าหลังจากแช่แข็งในน้ำยาแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งสูง จะมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนหรือไม่ ในปี 1999 Park และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนโคระยะ blastocyst โดยใช้ electron microscope grids หลังจากละลายพบว่าที่ 24 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อนรอดทั้งหมด ที่ 48 ชั่วโมง ตัวอ่อนรอด 73% และตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนออกจาก zona pellucida ได้ 67.8% ในปี 2004 Kelly และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนระยะ blastocyst โดยใช้ Cryotop หลังจากละลายพบว่ามีลักษณะภายนอกปกติ 97% และพัฒนาจนกระทั่งออกจาก zona pellucida 67% และนอกจากนี้ยังมีการทดลองนำตัวอ่อนที่แช่แข็งและละลายแล้วไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับเพื่อดูอัตราการตั้งท้องและการคลอด ในปี 1996 Saha และคณะ ทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโค 5 ตัวอ่อนในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ml แล้วย้ายฝากทันทีหลังจากละลายให้ตัวรับ 5 ตัว พบว่ามีตัวรับ 3 ตัวท้องจนคลอดและได้ลูกโคเกิดมา 3 ตัว ต่อมา Vajta และคณะ (1998) ทดลองแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคโดยใช้ OPS หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนระยะ blastocyst ให้แม่ตัวรับได้ลูกโคเกิด 3 ตัว และมีสุขภาพแข็งแรงดี ในปี 2000 Pugh และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนโคระยะ morula และ blastocyst โดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 0.25 ml หลังละลายพบว่าตัวอ่อนระยะ morula มีอัตรารอดที่ 24 ชั่วโมงหลังละลายน้อยกว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (24% และ 75% ตามลำดับ) และที่ 48 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อนระยะ blastocyst พัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้มากกว่าตัวอ่อนระยะ morula (15% และ 59% ตามลำดับ) หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนพบว่าอัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากที่ 90 วันของตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน (50% และ 55% ตามลำดับ)

การแช่แข็งแบบ vitrification โดยวิธี micro-drop รายงานครั้งแรกโดย Papis และคณะ (1999) โดยแช่แข็งไข่โคและนำมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วซึ่งพบว่าตัวอ่อนสามารถแบ่งตัวได้ถึง

76% และเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ blastocyst 30% อย่างไรก็ตามการแช่แข็งแบบ vitrification โดย micro-drop ยังไม่มีรายงานมาก่อนในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

ปัจจุบันยังคงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยวิธี vitrification มาอย่างต่อเนื่อง (Nguyen และคณะ, 2000; French และคณะ, 2001; Tecirlioglu และคณะ, 2003; Gong และคณะ, 2004; Laowtammathron และคณะ, 2005) ในขั้นตอนการโคลนนิ่งจะต้องกำจัดนิวเคลียสออก ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวจะทำให้ zona pellucida เกิดรูขึ้น ดังนั้นตัวอ่อนโคลนนิ่งจะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วกว่าตัวอ่อนตามธรรมชาติซึ่งมี zona pellucida ที่สมบูรณ์ มีการทดลองในปี 2005 โดย Laowtammathron และคณะ ทดลองผลกระทบของขนาดของตัวอ่อนที่ยื่นออกนอก zona pellucida ในระยะ hatching blastocyst พบว่าขนาดของตัวอ่อนที่ยื่นออกจาก zona pellucida ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ในปี 2000 Nguyen และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 250 μl เป็นภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อน โดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40) ซึ่งเป็นน้ำยาแช่แข็งที่มีรายงานมาแล้วโดย Kasai และคณะ (1990) ซึ่งใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากสูตรน้ำยาชนิดเดียวกัน Gong และคณะ (2004) ประสบความสำเร็จในการผลิตลูกโคโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี vitrification อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้วิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst

วิธีการทดลอง

สารเคมี วิธีการโคลนนิ่ง การเลี้ยงตัวอ่อน เหมือนในการทดลองที่ 1 ส่วนเซลล์ต้นแบบเป็นตัวเดียวกับการทดลองที่ 2

1. การแช่แข็งตัวอ่อน

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

2. การละลายตัวอ่อน

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

3. การย้อมสีตัวอ่อน

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

4. การย้ายฝากตัวอ่อน

เหมือนในการทดลองที่ 1 โดยตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 และละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนจะถูกย้ายฝากสู่ตัวรับแบบไม่ผ่าตัด

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งจะวิเคราะห์โดยการหาค่าความแตกต่างทางสถิติจะใช้วิธี ANOVA โดยใช้โปรแกรม SAS โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

ผลแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน โดยวิธี micro-drop แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยอัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 พบว่าตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มรอดทั้งหมดหลังละลายที่ชั่วโมงที่ 0 ตัวอ่อนหลังจากละลายออกมาจะถูกนำมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS35 มีอัตรารอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 (86% vs 94% ตามลำดับ) แต่หลังจากนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่าง

ตารางที่ 1 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching balstocyst หลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 หรือ VS35

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

หลังจากตัวอ่อนถูกละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนบางส่วนจากทั้งสองกลุ่มจะถูกนำมาย้อม TE และ ICM เพื่อดูจำนวนเซลล์ของตัวอ่อน หลังจากย้อมเซลล์แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนจากน้ำยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราส่วนของจำนวน ICM:TE เซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS35 มีมากกว่า VS33 (1:3.9 และ 1:3.2 ตามลำดับ)

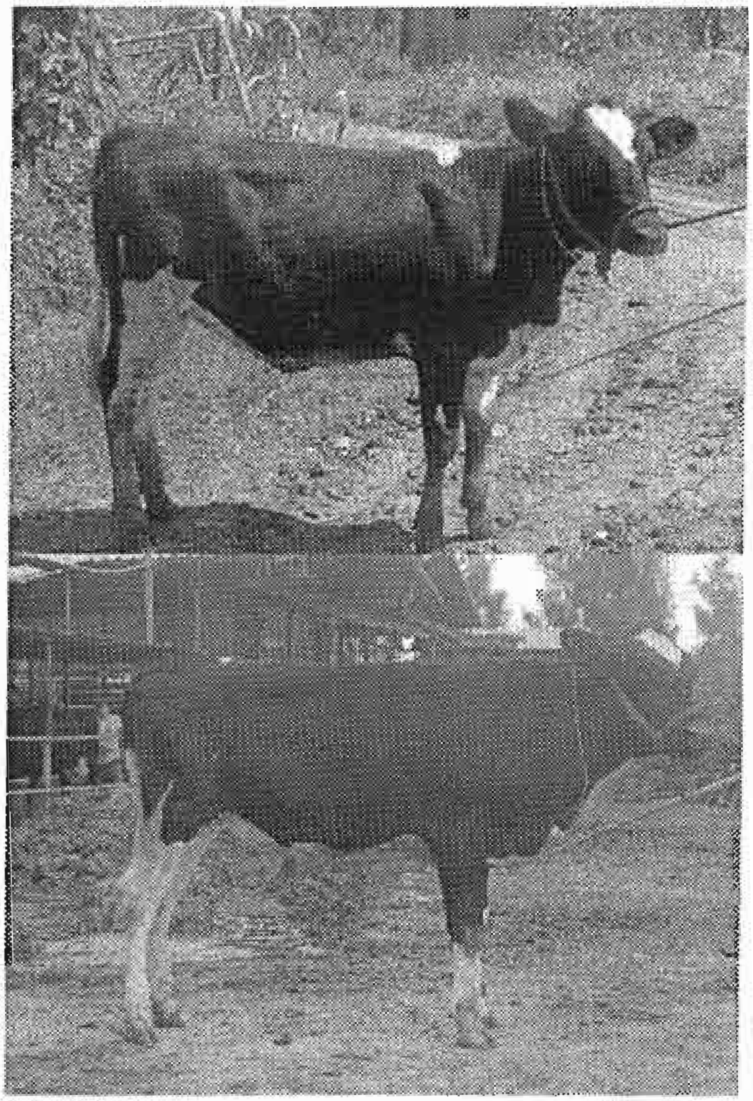
ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ TE และ ICM และอัตราส่วนของ TE และ ICM ของตัวอ่อนโคลนนิ่งโคระยะ hatching blastocyst

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

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน จำนวน 39 ตัวอ่อนสู่ตัวรับ 19 ตัว พบว่าที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีตัวรับตั้งท้องจำนวน 3 ตัว (15.8%) ตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็งในน้ำยา VS33 จำนวน 30 ตัวอ่อนถูกย้ายฝากสู่ตัวรับ 17 ตัว พบว่ามีตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว (11.8%) (ตารางที่ 3) โดยอัตราการตั้งท้องระหว่างตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โคตัวรับตัวอ่อนสดคลอดลูก 2 ตัว มีสุขภาพแข็งแรง (รูปที่ 1) ส่วนโคตัวรับตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งหมดทั้ง 2 ตัว

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสดและตัวอ่อนแช่แข็งระยะ hatching blastocyst

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



รูปที่ 1 ลูกโคโคลนนิ่ง 346-3 (บน) และ 346-4 (ล่าง) ที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการแช่แข็งตัวอ่อนในโคโดยวิธี vitrification เพื่อการค้ายังไม่แพร่หลายเมื่อเทียบกับการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี conventional freezing (Hasler, 2003; Vajta, 2000) ตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 มีอัตรารอดสูงกว่าในน้ำยา VS35 เนื่องจากน้ำยา VS35 มีความเป็นพิษสูงกว่าน้ำยา VS33 ทำให้ตัวอ่อนมีอัตรารอดน้อยกว่าในกลุ่ม VS33 ซึ่งอัตรารอดของตัวอ่อนในการทดลองนี้สูงกว่าการแช่แข็งโดยใช้ OPS (Kelly และคณะ, 2004) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตรารอดของตัวอ่อนนอกจากชนิดและความเป็นพิษของ cryoprotectant แล้ว อุณหภูมิขณะทำการทดลอง ชนิดของน้ำตาลที่ใส่ในน้ำยาแช่แข็ง ระยะของตัวอ่อน รวมทั้งเทคนิคที่ใช้ทำล้วนมีผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งทั้งสิ้น (Seidel, 2006) การ equilibrate ตัวอ่อนในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS33 และ VS35 นาน 3 นาที ตัวอ่อนที่อยู่ในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS35 จะได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของ cryoprotectant มากกว่า เนื่องจากในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS35 มีความเข้มข้นของ cryoprotectant สูงกว่า equilibration solution ของน้ำยา VS33 ทำให้ปริมาณของ cryoprotectant จะเข้าสู่ภายในเซลล์ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่อยู่ใน VS35 มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแบบ micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 จะให้อัตรารอดหลังละลายที่ค่อนข้างสูงที่ 24 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อน (94% และ 86% ตามลำดับ) แสดงว่าความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในVS33 และ VS35 ไม่มีผลต่อกระทบต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังจากละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง รวมทั้งไม่มีกระทบต่อจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ hatching blastocyst อีกด้วย

ในการทดลองนี้ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่แช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็ง เพื่อศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งต่ออัตราการตั้งท้อง จากการทดลองนี้พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งสู่ตัวรับไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องเมื่อเทียบกับตัวอ่อนสด ในปี 1997 มีการทดลองย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification และ conventional freezing ให้ตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (van Wagtendonk-de Leeuw และคณะ, 1997)

ในปี 2002 Lopatarova และคณะ ทดลองชะล้างตัวอ่อนจากโคตัวรับออกมาเพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ OPS และ conventional freezing จากผลการทดลองพบว่า อัตรารอดของตัวอ่อนจากการแช่แข็งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (OPS: 92.9% และ conventional freezing: 91.1%) โดยมีอัตรารอดใกล้กับการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่โคตัวรับพบว่าจะมีอัตราการแท้งที่ค่อนข้างสูงในช่วง 3 เดือนแรกซึ่งมักจะมีความผิดปกติที่เกิดจากการขบวนการ reprogramming ทำให้การแสดงออกของ gene ต่างๆ ผิดปกติซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งและตายหลังคลอดของลูกโคโคลนนิ่ง (Li และ

คณะ, 1992; Okano และคณะ, 1999; First และคณะ, 2002) การพัฒนาของรกของลูกอ่อนโคลนนิ่งจะช้ากว่ารกของลูกอ่อนตามธรรมชาติ และมีปริมาณเนื้อเยื่อ cuiboidal chorionic epithelium น้อยกว่าปกติเป็นสาเหตุให้การสร้างระบบหลอดเลือดและสายสะดือที่เชื่อมจากแม่ไปลูกพัฒนาได้ไม่ดี ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและการแลกเปลี่ยนของเสียระหว่างแม่และลูกเกิดได้ไม่ดี ส่งผลให้ตัวอ่อนขาดอาหารและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา นอกจากนี้หากขนาดของ placentome เล็กจะส่งผลให้มีพื้นที่สัมผัสการส่งผ่านของอาหารและของเสียเกิดได้น้อย หากปริมาณของ placentome มีน้อยจะทำให้การส่งผ่านของฮอร์โมนและ Growth factor ชนิดต่างๆ เช่น IGFs (insulin-like growth factors) ลดน้อยลง ซึ่งมีผลต่อขนาดของรก แต่ถ้ามีการแสดงออกในปริมาณมากจะทำให้รกมีขนาดและน้ำหนักมากผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000) นอกจากนี้พบว่า 30-40% ของลูกโคโคลนนิ่งจะมีขนาดและน้ำหนักตัวที่โตผิดปกติที่เรียกว่า large offspring syndrome (LOS) หรือ large calf syndrome (LCS) (Bondioli และคณะ, 1990; Keefer และคณะ, 1994; Wilson และคณะ, 1995) ซึ่งโรคนี้ไม่เกิดขึ้นในสัตว์ทุกชนิดแต่จะพบบ่อยในโคโคลนนิ่ง สาเหตุการเกิดโรคนี้อาจเกิดจากความผิดปกติของ epigenetic ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรกที่ผิดปกติทำให้ลูกอ่อนเกิดความผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000; De Sousa และคณะ, 2001) ลูกโคที่เป็น LOS มักจะเกิดปัญหาการคลอดยาก (dystocia) จึงต้องช่วยคลอดหรือผ่าตัดทำคลอด (Cesarean section) ส่วนใหญ่ลูกโคที่เป็นโรคนี้มักจะตายระหว่างคลอดหรือหลังคลอด จึงจำเป็นต้องมีการดูแลอย่างใกล้ชิดหลังคลอด เนื่องจากลูกโคโคลนนิ่งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการตายหลังคลอดสูงถึง 9-50% นอกจากนี้พบว่าจะมีการตอบสนองต่อการดูดนม (suckling reflex) ต่ำทำให้ลูกโคได้รับนมน้ำเหลืองในปริมาณไม่เพียงพอ และมักจะมีปัญหาเกี่ยวกับ ขบวนการ metabolism และ respiratory acidosis มีระดับ insulin ในเลือดสูง มีลักษณะ hypothyroidism ขนาดของ thyroid grand มีขนาดโตผิดปกติ เกิดภาวะ hypoxemia, hypoglycemia, lung fibrosis, ตับแข็ง (Firstและคณะ, 2002)

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ในน้ำยา VS33 และ VS35 ตัวอ่อนมีอัตรารอดหลังละลายสูง และการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่ตัวรับ แต่มีเฉพาะตัวรับที่ฝากตัวอ่อนสดเท่านั้นที่สามารถคลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวรับที่ฝากตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบร บลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์.** 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. pp. 79-85.

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

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

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W., Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.** 17:456-461.

Behboodi, E., Anderson, G.B., Bondurant, R.H., Cargill,S.L., Kreuscher, B.R., Medrano, J.F., Murray, J.D. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*–derived bovine embryos. **Theriogenology** 44:227–232.

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

Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat. Biotechnol.** 4:366-369.

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

De Sousa, P.A., Walker, S.K., King, T.J., Young, L.E., Harkness, L., Ritchie, W.A., Travers, A., Ferrier, P., Wilmut, I. 2000. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep. **Theriogenology** 53:214.

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

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

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

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

French, A.J., Hall, V.J., Korfiatis, N.A., Ruddock, N.T., Vajta, G., Lewis, I.M., Trounson, A.O. 2001. Viability of cloned bovine embryos following OPS vitrification. **Theriogenology** 57:413.

Galli, C., Duchi, R., Moor, R.M. 1999. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning** 1:161-170.

Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. 2003. Pregnancy: A cloned fole born to its dam twin. **Nature** 424:635.

Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P., Odde, K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology** 45:141–152.

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

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

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

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

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

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

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

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

Hochi, S., Kimura, K., Hanada, A. 1999. Effect of linoleic acid–albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology** 52:497–504.

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

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

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

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

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

Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, H., Tsudera, T., Sakurai, T., Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **J. Reprod. Fertil**.89:91–97.

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

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

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

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J.Y., Doquchi, H., Yasue H., Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** 282:2095–2098.

Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J. Reprod. Fertil.** 120:231–237.

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

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

Kennedy, P.C. and Miller, R.B. 1993. The female genital system. In **Pathology of Domestic Animals**. K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, and N. Palmer, eds. (Harcourt, Brace, Jovanovich, San Diego) pp. 390–391.

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

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

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Faber, D., Sweeney, R.W., Henderson, B., Nevala, W., West, M.D., Wettstein, P.J. (2001). Cloned cattle can be healthy and normal. **Science** 294:1893–1894.

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

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

Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. **Nature** 436: 641.

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

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

Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell** 69:915–926.

Liebermann, J., Tucker, M., Graham, J., Han, T., Davis, A., Levy, M. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronucleate zygotes using the flexipet denuding pipette (FDP). **Reprod. Bio Medicine Online** 4:146–150.

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

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

Massip, A., Van Der Zwalmen, P., Scheffen, B., Ectors, F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. **Cryo-Letters** 7:270-273.

Massip, A., Van Der Zwalmen, P., Ectors, F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology** 27:69-79.

Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Hum. Reprod.** 10:3004–3011.

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

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., Takahashi, K. 2001. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. **Fertil. Steril.** 76:618–623.

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

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

Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, Y., Satoh, M., Nishida, A., Ogura, A. 2002. Early death of mice cloned from somatic cells. **Nat. Genet.** 30:253–254.

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

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science** 18:1188-1190.

Park, S.P., Kim, E.Y., Kim, D.I., Park, N.H., Won, Y.S., Yoon, S.H., Chung, K.S., Lim, J.H. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. **Hum. Reprod.** 14: 2838-2843.

Papis, K., Shimizu, M., Izaike, Y. 1999. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology** 51:173.

Parnpai, R., Tasripoo, K., Kamonpatana, M. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. **Theriogenology** 53:239.

Parnpai, R., Tasripoo, K., Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. **Theriogenology** 57:443.

Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., and Campbell, K.H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** 407:86-90.

Pugh, P.A., Tervit, H.R., Niemann, H., 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. **Anim. Reprod. Sci.** 58:9–22.

Rall, W. F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** 313:573-575.

Renard, J.P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P., Vignon, X. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet** 353:1489–1491.

Saha, S., Otoi., T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., Suzuki, T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology** 33:291-299.

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

Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature** 415:859.

Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L., Matthews, L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol. Reprod.** 54:100–110.

Stice, S.L., Robl, J.M., Ponce de Leon, F.A., Jerry, J., Golueke, P.G., Cibelli, J.B., Kare, J.J. 1998. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology** 49:129–138.

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

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

Tominaga, K. and Hamada, Y. 2001. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Reprod. Dev.** 47:267-273

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

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

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

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

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

Vanderzwalmen, P, Bertin, G., Debauche, C.H., Standaert, V., and Schoysman, R. 2000. *In vitro* survival of metaphase II oocytes and blastocysts after vitrification in an Hemi Straw (HS) system. **Fertil. Steril.** 74:215.

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

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. 1998. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature** 394:369-374.

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

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

Wells, D.N. Forsyth, J.T., McMillan, V., Oback, B. 2004. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells** 6:101-110.

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

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

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

Yin, X. J., Lee, H. S., Lee, Y.H., Seo, Y.I., Jeon, S.J., Choi, E.G., Cho, S.G., Min, W., Kang, S.K., Hwang, W.S., and Kong, I.K. 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. **Reproduction** 129: 245–249.

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

Zakartchenko, V., Alberio, R., Stojkovic, M. 1999. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. **Mol. Reprod. Dev.** 54:264-272.

Zakartchenko, V., Mueller, S.S., Alberio, R. 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and adult fibroblasts. **Mol. Reprod. Dev.** 60:362-369.

Zhou, Q., Jean-Paul Renard, Friec, G.L., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science** 302:1179.

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

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

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

2. ส่ง manuscript ไปตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

Suteevun-Phermthai, T., Curshoue, C., Muenthaisong, S., Tian, X.C and **Parnpai, R.** 2006. Is IGF2R a course of abnormality in clones? Submitted to *Biology of Reproduction*

3. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ 3 เรื่อง

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai,** R. 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod.Fert.Dev.* 16: 174.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai. R.** 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference.* Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.

Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai. R.** 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.

4. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับชาติ 3 เรื่อง

ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจากVitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

5. รางวัลที่ได้รับซึ่งเป็นผลจากการทำวิจัยเรื่องนี้

1.รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมทอัปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก

2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการดีเด่น ด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก