บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1

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

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

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

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA

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

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

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

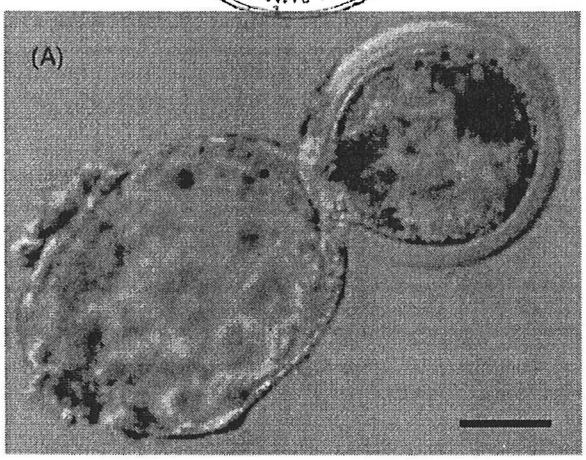
[a]ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$

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

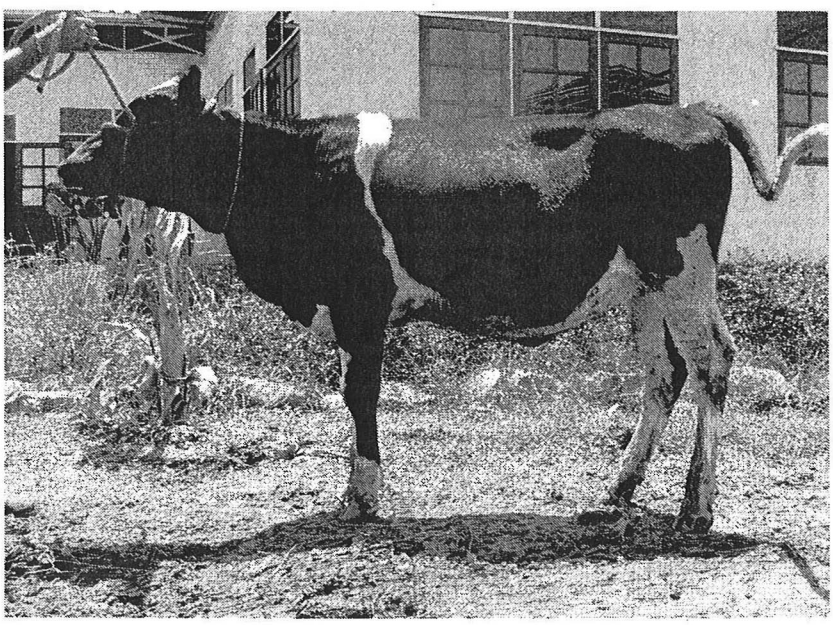
[x]ภายใน Row เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P<0.05$

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย



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



ภาพที่ 3 ลูกโคโคลนนิ่งเพศเมียที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด ผลิตจากการใช้เซลล์ใบหูโคนมพันธุ์ดีเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 6 ก.ย. 2553
เลขทะเบียน 229469

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งและตัวอ่อนสด

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

[a] ตัวรับทุกตัวตั้งท้องลูกตัวเดียว

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

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

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

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 1

จากผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้ Cryotop พบว่าให้อัตรารอดสูง ในปัจจุบันมีการคิดค้นอุปกรณ์ที่ใช้เป็นภาชนะสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนและไข่สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยวิธี vitrification หลายชนิด อาทิเช่น electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) OPS (Vajta และคณะ, 1998) nylon loop (Lane และคณะ, 1999) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ซึ่งอุปกรณ์ทั้งหมดออกแบบมาเพื่อทำให้ปริมาณน้ำยา vitrification เหลือน้อยที่สุดก่อนที่จะถูกนำไปไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เกิดการถ่ายเทอุณหภูมิได้เร็วที่สุด มีการศึกษาทดลองเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์หลายชนิด เช่น โคและแกะระยะ morula และ blastocyst (Kelly และคณะ, 2004) ระหว่าง OPS และ Cryotop ตัวอ่อนกระต่ายระยะ pronuclear (Hochi และคณะ, 2004) 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) เป็นนักวิทยาสตร์กลุ่มแรกที่รายงานการใช้ Cryotop ในการแช่แข็ง โดยวิธี vitrification ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant (CPA) ในน้ำยา vitrification ที่น้อยลง (30%) แต่ส่วนประกอบของน้ำยา vitrification ที่ใช้ในการทดลองนี้มีส่วนประกอบเหมือนในการทดลองที่ใช้ OPS คือมี 40% CPA (Vajta และคณะ, 1998)

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

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

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

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

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

ในการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาจนกระทั่งตัวอ่อนพัฒนาจนออกจาก zona pellucida หลังจากละลาย เนื่องจากตัวอ่อนที่ได้จะนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับทั้งที่เป็นโคสาวและแม่โค 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 น้อยกว่าปกติและพบว่า 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 การเปลี่ยนแปลงขนาด

ของอวัยวะภายในที่ผิดปกติไป และเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนในครรภ์ตายและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา (Farin และคณะ, 2001)

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

ผลการทดลองที่ 2

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

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

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

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

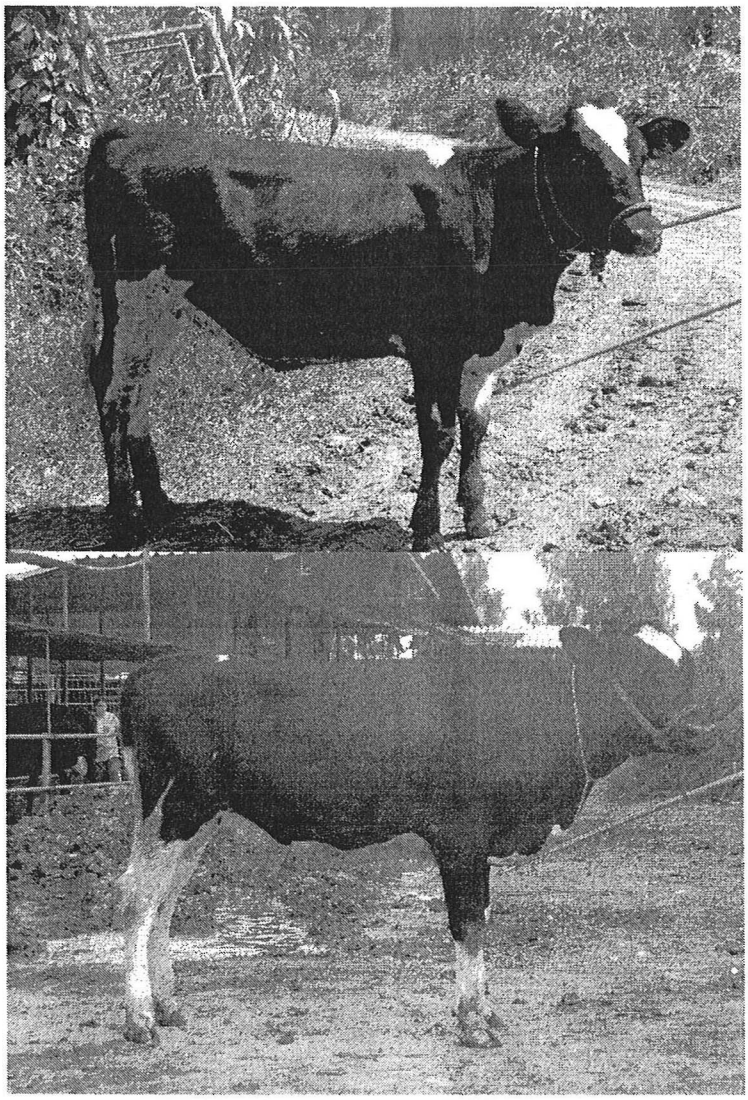
ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ TE และ ICM และอัตราส่วนของ TE และ ICM ของตัวอ่อนโคลนนิ่งโครระยะ hatching blastocyst

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

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

ตารางที่ 6 อัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสดและตัวอ่อนแช่แข็งระยะ hatching blastocyst

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



ภาพที่ 4 ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

วิจารณ์ผลการทดลองที่ 2

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

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

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

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

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