บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การทำปฏิสนธิในหลอดแก้วและการโคลนนิ่งในโคจำเป็นต้องใช้โอโอไซท์หรือไข่โคในการทำตามปกติ เราได้โอโอไซท์โคจากการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์แล้วนำมาเจาะดูดไข่อ่อนเพื่อนำไปเลี้ยงในหลอดแก้วให้เป็นไข่สุก ในบ้านเรามีจำนวนโคเพศเมียเข้าโรงฆ่าสัตว์น้อยทำให้ได้รังไข่ในแต่ละวันไม่มาก บางครั้งไม่เพียงพอต่อการทดลองในแต่ละวัน และในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้ในการทดลองโคลนนิ่งและปฏิสนธิในหลอดแก้วมาก่อน ดังนั้นจึงยังไม่มีรายงานว่าควรที่จะใช้น้ำยาแช่แข็งแบบใดที่จะทำให้โอโอไซท์โคที่แช่แข็ง สามารถนำมาทำโคลนนิ่งหรือปฏิสนธิในหลอดแก้วและสามารถพัฒนาต่อไปจนได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคไว้ใช้ทดลองในเวลาที่เหมาะสมในอนาคต

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หลังจากรายงานความสำเร็จของการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Vitrification (Rall และ Fahy, 1985) ได้มีการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการแช่แข็งไข่ มีการพัฒนาภาชนะบรรจุไข่เพื่อเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิให้เร็วที่สุด เช่น Electron microscope grids (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ, 1997) Hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ, 2000) Solid-surface vitrification (SSV,Dinnyes และคณะ, 2000) Droplets vitrification (Papis และคณะ, 2000) Nylon loop (Lane และคณะ, 2001), Flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ, 2002) Martino และคณะ (1996) รายงานความสำเร็จครั้งแรกในการแช่แข็งไข่โคโดยใช้ Electron microscope grids นำโอโอไซท์ที่แช่แข็งมาทำละลายแล้วเข้าปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าตัวอ่อนที่ผลิตได้สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ บลาสโตซีสได้ มีรายงานว่าสามารถแช่แข็งโอโอไซท์โคระยะ GV ได้สำเร็จและละลายออกมาผลิตตัวอ่อนได้โดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว (Isachenko และคณะ, 2001; Matsumoto และคณะ, 2001) Men และคณะ (2002) ทำการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ GV และ MII แล้วพบว่าโอโอไซท์ที่ระยะ MII จะมีอัตรารอดหลังละลายสูงกว่าโอโอไซท์ระยะ GV นอกจากนี้โอโอไซท์จากกลุ่ม GV ยังมีการพัฒนาหลังจากปฏิสนธิในหลอดแก้วน้อยกว่าโอโอไซท์กลุ่ม MII อีกด้วย มีการทดลองนำโอโอไซท์ที่แช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วเพื่อผลิตตัวอ่อนจำนวนมากอาทิเช่น ในปี 2000 Papis และคณะ แช่แข็งโอโอไซท์โคระยะ MII โดยใช้วิธี Droplets vitrification แล้วนำมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว สามารถได้ตัวอ่อนเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส 29.7% Chang และคณะ (2004)

ใช้วิธีเดียวกันกับ Papis และคณะ (2000) ในการแช่แข็งโอโอไซท์โคแล้วละลายมาปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่าสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ 26% ซึ่งข้อมูลมีค่าใกล้เคียงกันกับข้อมูลของ Papis และคณะ (2000) ต่อมาในปี 2004 Inaba และคณะ นำโอโอไซท์โคที่แช่แข็งและละลายมาปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่าสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ 28% มีการทดลองนำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากโอโอไซท์ที่แช่แข็งไปย้ายฝากให้แก่โคตัวรับพบว่าสามารถผลิตลูกโคได้ อาทิเช่น ในปี 1998 Vajta และคณะ ทดลองแช่แข็งโอโอไซท์โครระยะ MII และตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีส โดยใช้ OPS หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ทั้งที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็งให้ตัวรับพบว่าได้ลูกโคเกิด 3 ตัว ในปี 2000 Papis และคณะ นำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากโอโอไซท์แช่แข็งไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับ 4 ตัว พบว่ามีแม่โคตั้งท้อง 2 ตัว แท้งวันที่ 135 ของการตั้งท้อง 1 ตัวและคลอด 1 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงดี อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการทำยังค่อนข้างจำกัด อัตราความอยู่รอดยังต่ำมาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ผลสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรายงานโดย Illmensee and Hope (1981) ด้วยการโคลนนิ่งหนูถีบจักรโดยใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบฉีดเข้าในโอโอไซท์ที่ดูดนิวเคลียสออก จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว แล้วนำไปย้ายฝากให้หนูตัวรับจนได้ลูกเกิดมา ความสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งในปศุสัตว์จนได้ลูกแกะ (Willadsen, 1986); ลูกโค (Prather และคณะ, 1987)และ ลูกสุกร (Prather และคณะ, 1989) จากความสำเร็จเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายต่างพยายามวิจัย เพื่อพัฒนาเทคนิคการทำโคลนนิ่งโดยเฉพาะในโคซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทั้งด้านเนื้อและนม จนในที่สุดสามารถทำโคลนนิ่งโคเชิงการค้าได้ (Bondioli และคณะ, 1990; Bondioli, 1993; Stice and Keefer, 1993) ประมาณกันว่าจำนวนลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาทั่วโลกจนถึงปี 2538 มีอยู่ระหว่าง 1,000 ถึง 2,000 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตในบริษัทเอกชนแถบอเมริกาเหนือ (Seidel, 1995) ซึ่งทั้งหมดนี้ยังคงใช้เซลล์จากตัวอ่อน เป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งเดือนมีนาคม 2540 ได้มีรายงานการเกิดของลูกแกะดอลลีจากการโคลนนิ่ง ด้วยเซลล์จากต่อมน้ำนมของแกะโตเต็มวัย (Wilmut และคณะ, 1997) นับจากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ต่างพยายามทำโคลนนิ่งในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบจนประสบความสำเร็จในหนูถีบจักร (Wakayama และคณะ, 1998) โค (Kato และคณะ, 1998; Cibelli และคณะ, 1998; Vignon, และคณะ , 1999; Wells และคณะ, 1999; Zakhartchenko และคณะ, 1999) แพะ (Baguisi และคณะ, 1999; Reggio และคณะ, 2001; Keefer และคณะ, 2002) สุกร (Onishi และคณะ, 2000; Polejaeva และคณะ, 2000) แมว (Shin และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนนิ่งกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์ใบหูและเซลล์แกรนนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ (รังสรรค์ และคณะ 2543b; Parnpai และคณะ, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003) ในประเทศไทย ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และทีมงานได้ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์แบรงกัสเป็นเซลล์

ต้นแบบจนได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาในวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์และรายที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2544 นับเป็นความสำเร็จของการโคลนนิ่งโคพันธุ์บราห์มันรายแรกของโลก (รังสรรค์ และคณะ 2543a; Parnpai และคณะ, 2000; http://www.vet.chula.ac.th) นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา 7 ตัวจากเซลล์ใบหูโคตัวเดียวกัน ตั้งแต่วันที่ 25 ตุลาคม 2546 เป็นต้นมา (รังสรรค์ และคณะ, 2547) แต่ความสำเร็จเหล่านี้ใช้โอโอไซท์สดในการทำโคลนนิ่ง ยังไม่มีรายงานความสำเร็จการทำโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์แช่แข็ง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อทำโคลนนิ่ง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างธนาคารโอโอไซท์โค
2. เพื่อให้ได้วิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งโอโอไซท์
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจากการปฏิสนธิในหลอดแก้วที่ผลิตโดยใช้โอโอไซท์สดและโอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว
4. เพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจากการโคลนนิ่งที่ผลิตโดยใช้โอโอไซท์สดและโอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองจะใช้โอโอไซท์ระยะ MII มาแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV) และการแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ต่ออัตรารอดหลังจากละลาย หลังจากละลายโอโอไซท์แล้วจะคัดเลือกเฉพาะโอโอไซท์ที่มีลักษณะปกติมาใช้ในการทดลองโคลนนิ่งและปฏิสนธิในหลอดแก้ว และบันทึกการพัฒนาของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง นอกจากนี้จะนำโอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมาทำเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับเพื่อทำโคลนนิ่งและศึกษาอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่เจริญเข้าสู่ระยะต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลเพื่อทำเป็นธนาคารโอโอไซท์โคพันธุ์ดีไว้ใช้ในอนาคต
2. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปแก้ปัญหาในการวิจัยการทำโคลนนิ่ง ที่บางครั้งมีปริมาณโอโอไซท์สดไม่เพียงพอในการทดลอง ก็สามารถนำโอโอไซท์แช่แข็งละลายออกมาใช้ได้

3. นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ

4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้เผยแพร่เทคโนโลยีสู่เกษตร และพัฒนาเข้าสู่การค้าต่อไปในอนาคต