ปัจจุบันสัตว์ตระกูลแมวป่ากำลังอยู่ในสภาวะใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งเทคโนโลยีการช่วยการเจริญพันธุ์พื้นฐาน ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ในกลุ่มใกล้สูญพันธุ์ได้ เนื่องจากขาดแคลนตัวสัตว์ที่จะใช้นำมาเข้ากระบวนการผสมพันธุ์ ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรก เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งในหลอดแก้ว และอัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับ จากผลการทดลองพบว่า น้ำยาที่นำมาใช้เลี้ยงไข่ระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง โดยไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา EHM ให้อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา 199H อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (33.3% และ 18.1% ตามลำดับ) การเลี้ยงตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งแบบไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของแมวบ้านให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนไม่แตกต่างกันทางสถิติ (44.4% และ 38.0% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้านหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา ทั้งการเลี้ยงแบบไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของแมวบ้าน (28.6% และ 32.6% ตามลำดับ) จากการใช้ไข่ของแมวบ้านและโค เป็นไซโตพลาสผู้รับสำหรับการทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ในสัตว์ตระกูลแมวพบว่าตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งและตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งด้วยไข่โค (34.4% กับ 29.6% และ 8.6% ตามลำดับ) และยังพบว่าตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งด้วยไข่โคหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา (15.2%) เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งให้กับแมวบ้านตัวรับ ได้แมวบ้านตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว (16.7%) โดยตัวแรกได้ทำการผ่าคลอดในวันที่ 69 ของการตั้งท้อง พบลูกแมวเสียชีวิตในครรภ์ โดยลูกแมวมีอวัยวะครบสมบูรณ์ แต่อวัยวะภายในช่องท้องอยู่นอกร่างกาย และแมวบ้านตัวรับตัวที่สองคลอดตามธรรมชาติในวันที่ 56 ของการตั้งท้อง ได้ลูกแมวเกิดมาทั้งหมด 6 ตัว มีเพียง 2 ตัวที่มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ตัวเสียชีวิตหลังคลอดที่ 24 ชั่วโมง และ 5 วันตามลำดับ ส่วนแมวบ้านตัวรับที่ถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้าน ไม่พบการแมวบ้านตัวรับตั้งท้อง การทดลองที่สองเป็นศึกษาการแสดงออกของยีนที่เชื่อว่ามีผลต่อกระบวนการ reprogramming (*Oct4 DNMT1 DNMT3a DNMT3b HAT1 และ HDAC*1) ในตัวอ่อนแมวบ้านตัวอ่อนแมวดาว และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้าน จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* และ *HAT1* ในตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวดาวโคลนนิ่ง มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายกับตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีการแสดงออกของ *Oct4* และ *HAT1* mRNA ต่ำ จนกระทั่งถึงระยะ 8 เซลล์ และค่อยๆแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งแสดงออกสูงที่สุดในระยะบลาสโตซีส ในทางตรงกันข้ามพบว่าตัวอ่อน

แมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์มีการแสดงออกของยีน *Oct4* และ *HAT1* ต่ำตลอดระยะของการเจริญเติบโตจนถึงระยะมอรูลา และไม่พบการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสในตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ การศึกษาการแสดงออกของยีน *HDAC1* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งพบว่ามีความแปรปรวนสูง และมีรูปแบบการแสดงที่ต่างไปกับตัวอ่อน IVF ส่วนระดับการแสดงออกของยีน *DNMT1* มีรูปแบบการแสดงออกที่ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะ 2 เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซีส ซึ่งตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่สูงกว่าตัวอ่อน IVF ตั้งแต่ระยะมอรูลาจนถึงระยะบลาสโตซีส จากการศึกษายังพบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกของ *DNMT3a* ต่ำที่สุดที่ระยะ 4 เซลล์ แล้วค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระยะบลาสโตซีส ซึ่งต่างกับตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งที่ในระยะ 4 เซลล์ ยังมีการแสดงออกสูงกว่าตัวอ่อน IVF จากนั้นค่อยๆ ลดลงจนถึงระยะมอรูลา และแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะบลาสโตซีส รูปแบบการแสดงออกของยีน *DNMT3b* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวทั้ง IVF และโคลนนิ่งมีความคล้ายคลึงกัน โดยมีการแสดงออกต่ำมากในระยะ 2 เซลล์จนถึงระยะมอรูลา จากนั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะบลาสโตซีส จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า น้ำยาที่ใช้เลี้ยงไข่ระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่อการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ไม่สามารถช่วยสนับสนุนให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อีกทั้งยังพบว่าไข่ของแมวบ้านและโคสามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ได้ถึงในระยะแรกของการพัฒนาตัวอ่อนเท่านั้น และนอกจากนี้ยังพบว่า แสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส และตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนที่เกี่ยวกับ การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการเติมหมู่อะซิติลบนโปรตีนฮีสโตน (histone acetylation) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจเกิดกระบวนการ reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์ ของเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งในสัตว์ตระกูลแมว จากการวิจัยนี้ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับ reprogramming ในสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งจะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์

The species of felid family classified as being threatened or endangered. The conventional assisted reproduction technique (ART) is inappropriate for producing endangered felid species, due to the lack of animals for breeding program. Interspecies cloning is a novel technology that may serve as a valuable model for study *in vitro* and *in vivo* development of cloned felid embryos. Two experiments were carried out in this research. The first experiment aimed to investigate the *in vitro* and *in vivo* development of cloned felid embryos. The results of this experiment indicated that the manipulation medium had an effect on the developmental rate of cloned domestic cat embryos. The EHM gave significantly greater blastocyst formation than that of 199H (37.3 vs 21.9%, respectively). There was no significant difference between the developments to blastocyst stage of non co-culture (44.4%) and co-culture (38.0%) of the cloned domestic cat embryos with domestic cat oviductal epithelial cells. Moreover, the non co-culture and co-culture systems could not support the development of interspecies cloned marbled cat embryo beyond morula stage (28.6 vs 32.6%, respectively). The development to blastocyst stage of intraspecies cloned domestic cat (39.8%) and bovine (30.9%) embryos was higher than that of interspecies cloned marbled cat with bovine oocytes (9.2%). The interspecies cloned domestic cat with bovine oocytes arrested development at morula stage (16.6%). The reconstructed cloned domestic cat embryos were transferred to recipients and 2 pregnancies were detected (16.7%). The first pregnant recipient delivered 1 still born kitten by C-section at 69 days of pregnancy. The kitten developed to term but had abdominal wall defect and evisceration of abdominal organs. Another recipient was naturally delivered 6 kittens at 56 days of pregnancy but only 2 had fully development. Both cloned kittens died 24 hours and 5 days post natal, respectively. However, the reconstructed cloned marbled cat embryos were transferred to recipients and the pregnancy was not detected. The second experiment, the transcription levels of genes believed to be crucial for reprogramming (*Oct4, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HAT1* and *HDAC1*) were investigated in cloned felid species, domestic, leopard and marbled cats. The results showed that transcription levels of *Oct4* and *HAT1* were low at an early development stage and dramatically increased at 8-cell to blastocyst stage in cloned domestic and leopard cats and IVF derived embryos. In contrast, transcription levels of *Oct4* and *HAT1* in interspecies cloned marbled cat embryos were low throughout the development up to the morula stage. Moreover, the interspecies cloned marbled cat embryos with low transcription level

of *Oct4* and *HAT1* could not develop into blastocyst. The development was arrested at the morula stage. The transcription levels of *HDAC1* of cloned felid embryos had altered an expression pattern compared to IVF derived embryos. The *DNMT1* transcript levels dramatically decreased throughout development of felid embryos. Cloned felid embryos showed higher transcript of the *DNMT1* gene than IVF derived embryos. For mRNA level of *DNMT3a*, it was found that IVF derived embryos rarely had any transcript at 4- to 8-cell stages and increased at morula up to blastocyst stage whereas the transcription levels decreased in an early development and increased again at the blastocyst stage of cloned felid embryos. The level of *DNMT3b* mRNA decreased from 2-cell to morula stages but became remarkably high at blastocyst stage. The results of this study demonstrated that the manipulation medium during the cloning process involved in the increased development to blastocyst stage of cloned felid embryos. However, the co-culture system of cloned felid embryos was not beneficial to the development. The domestic cat and bovine oocytes could support mitotic cleavage of felid nuclei only in the early stage of development. Then, the results of the second experiment clearly demonstrated that *Oct4* mRNA transcription levels in felid embryos had some effect on the *in vitro* development efficiency particularly at the blastocyst stage. The cloned felid embryos showed aberrant level of genes involved in DNA methylation and histone hypoacetylation and suggested that incomplete reprogramming of felid donor nuclei occur in cloned felid embryos. This research indicated that genome reprogramming in the felid species was abnormal which may not be enough for the establishment of embryonic totipotence. The improvement of nuclear transfer technique of felid species is needed, especially in the genome reprogramming to improve the efficiency of cloned felid embryos for the conservation of endangered felid species.