

ผลของเจนีสเตอินต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริออนกระทาญี่ปุ่น
Coturnix japonica



นายสิทธิพล อินทรพัฒน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

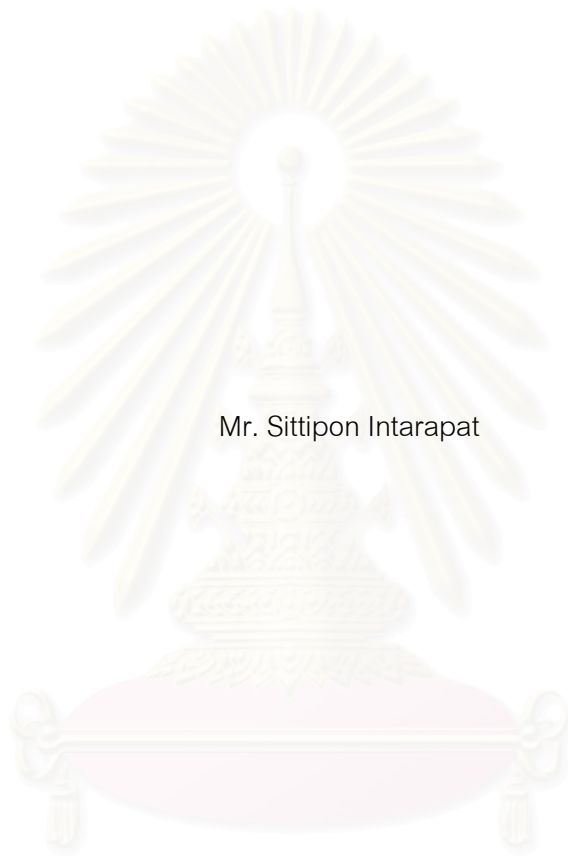
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2593-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF GENISTEIN ON GONADAL DEVELOPMENT IN JAPANESE QUAIL

Coturnix japonica EMBRYO



Mr. Sittipon Intarapat

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

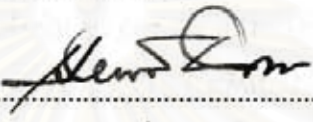
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

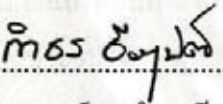
ISBN 974-53-2593-7

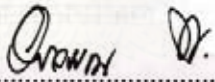
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของเจนีสเคอินต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใน
เอ็มบริโอของกระทาญี่ปุ่น *Coturnix japonica*
โดย นายสิทธิพล อินทรพัฒน์
สาขาวิชา สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรวรรณ สัตยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไสละสูต


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

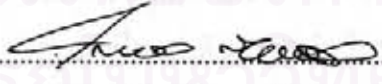

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัณฐ์ ธีรคุปต์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรวรรณ สัตยาลัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไสละสูต)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.นพดล กิตณะ)

สิทธิพล อินทรพัฒน์: ผลของเจนิสเตอินต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใน
 เอ็มบริโอของกระทาญี่ปุ่น *Coturnix japonica*. (EFFECT OF GENISTEIN ON
 GONADAL DEVELOPMENT IN JAPANESE QUAIL *Coturnix japonica* EMBRYO)
 อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.อรรวรรณ สัตยาลัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไคละสูต,
 125 หน้า. ISBN 974-53-2593-7

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอของกระทาญี่ปุ่นประกอบด้วยขั้นตอน
 ที่สำคัญ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (PGCs) มายังบริเวณที่จะเจริญ
 เป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges) การเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์
 สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมีย การเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
 เมื่อทำการฉีดเจนิสเตอินความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ โดยตรงในไข่ทางด้านป้าน
 ผ่านบริเวณไข่แดงก่อนการเข้าฟักพบว่า เจนิสเตอินทั้งสองความเข้มข้นทำให้จำนวน PGCs
 เคลื่อนที่มาจากยังบริเวณ genital ridges ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อ
 เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม เพอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นหมันของเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ
 เจนิสเตอิน 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ เท่ากับ 19% และ 23% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม การศึกษาผลของ
 เจนิสเตอินต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอเพศผู้โดยการนับ
 จำนวน estrogen receptor (ER)-immunostained cells บริเวณ germinal epithelium ของ
 อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้พบว่า เจนิสเตอินที่ระดับ 24 ไมโครกรัม/กรัม
 ไข่ ทำให้เปอร์เซ็นต์ของจำนวน ER-immunostained cells ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 ในขณะที่เอ็มบริโอเพศผู้ที่ได้รับเจนิสเตอินความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ ทำให้เปอร์เซ็นต์
 ของจำนวน ER-immunostained cells เพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ
 เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เจนิสเตอินทั้งสองความเข้มข้นยังมีผลต่อการ
 เติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริโอ โดยทำให้
 อัณฑะข้างซ้ายเกิด ovotestis และทำให้เกิดความผิดปกติของ Müllerian duct และ Wolffian
 duct การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่พบระดับความเข้มข้นของเจนิสเตอินที่ก่อให้เกิดความ
 ผิดปกติต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอของกระทาญี่ปุ่น

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572530723: MAJOR ZOOLOGY

KEY WORDS: *Coturnix japonica* / EMBRYO / GENISTEIN / GONADAL DEVELOPMENT / JAPANESE QUAIL

SITTIPON INTARAPAT: EFFECT OF GENISTEIN ON GONADAL DEVELOPMENT IN JAPANESE QUAIL *Coturnix japonica* EMBRYO. THESIS ADVISOR: ASST.PROF.Ph.D.ORAWAN SATAYALAI, THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.D.V.M.Ph.D.ACHARIYA SAILASUTA. 125 pp. ISBN 974-53-2593-7

Gonadal development of Japanese quail *Coturnix japonica* embryo comprises of three major events. Primordial germ cells (PGCs) migration, gonadal differentiation and gonadal growth and maturation. In this experiments, Genistein (16 and 24 $\mu\text{g/g}$ egg) was injected into the yolk via blunt end of unincubated eggs before incubation. Effect of genistein on PGCs migration was examined by counting number of PGCs that reached and implanted in the genital ridges compared with the control group. Both concentrations of genistein used, reduced the number of PGCs implanted in the genital ridges statistically significant ($p < 0.001$). The sterility rate was 19% and 23% of the PGCs number presented in the genital ridges induced by 16 and 24 μg of genistein/g egg, respectively. Effect of genistein on gonadal differentiation was evaluated by determined estrogen receptor (ER)-immunostained cells in germinal epithelium of male left gonad. Genistein at 24 $\mu\text{g/g}$ egg resulted in decreasing of the percentage of ER-immunostained cells in germinal epithelium being not significantly different compared to the control group. On the other hand, that of 16 $\mu\text{g/g}$ egg caused very slightly increasing in the percentage of ER-immunostained cells in germinal epithelium being also not significantly different compared to the control group. Genistein at 16 and 24 $\mu\text{g/g}$ egg effected embryonic gonad growth and maturation by inducing development of ovarian tissue in the cortex layer on the left testis of male embryo thus transforming the left testis to ovotestis. The gross appearance also demonstrated abnormality of Müllerian duct and Wolffian duct development in genistein treated embryo. In conclusion, this is the first report on the effective doses of genistein on gonadal development in Japanese quail embryo.

Department.....Biology.....Student's signature.....*Sittipon Intarapat*
 Field of study.....Zoology.....Advisor's signature.....*Orawan Satayalai*
 Academic year.....2005.....Co-advisor's signature.....*Achariya Sailasuta*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากไม่ได้รับความกรุณาจากผู้มีพระคุณดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรพรรณ สัตยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้โอกาสทางการศึกษา คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ตลอดจนประสบการณ์ที่สอนให้รู้จักการทำวิจัยและการเป็นนักวิจัยที่ดีต่อไปในอนาคต

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศละสุต สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำที่มีค่า ตลอดจนกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กำธร ธีรคุปต์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาเพื่อการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา คชเสนี ที่กรุณาให้คำสอนและกำลังใจที่ดีมาก ตลอดจนคำแนะนำเรื่องแหล่งทุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์วิธมา เมฆวิชัย ที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องแหล่งทุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และความปรารถนาดีที่มีให้ตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณเสรี สามัคภูมิพิมพ์ จากเสรีฟาร์ม จังหวัดนครปฐม ที่เอื้อเฟื้อไขนกกกระทาญี่ปุ่นสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณลักษณะาวดี ธาระวรรณ และ คุณผกาทิพย์ วะชุม จาก บริษัท บี.บี. เพชรฟู้ดส์ จำกัด ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการติดต่อเรื่องไขนกกกระทาญี่ปุ่น

ขอขอบคุณ คุณอมรศักดิ์ อ้อสุวรรณ สำหรับเครื่องมืออัตโนมัติเพื่อใช้พลิกไขนกกกระทาญี่ปุ่น และ คุณอัจฉริยา ไชยรัตน์ สำหรับความช่วยเหลือเรื่องเทคนิคทางด้านเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณ คุณพรทิพย์ ปรีชา คุณรัตนา ปานเรียนแสน คุณสุดาทิพย์ ชันฉัตร คุณอาคม เสงี่ยมเจริญชัย และ คุณสณชัย วรรณเทศ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการทำงาน

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ หมายเลขโครงการ CEB_M_20_2005

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ พี่ชาย ที่เป็นกำลังใจให้เสมอ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 สอบสวนเอกสาร.....	5
อนุกรมวิธานของนกกระทาญี่ปุ่น.....	5
นกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัย.....	5
ไข่นกกระทาญี่ปุ่น.....	6
เอ็มบริโอของนกกระทาญี่ปุ่น.....	6
การเจริญของระบบสืบพันธุ์นกกระทาญี่ปุ่น.....	7
การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์.....	8
เจนีสไตอื่น.....	28
โครงสร้างและการทำงานของเจนีสไตอื่น.....	28
ผลของเจนีสไตอื่นต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	29
ผลของเจนีสไตอื่นต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ปีก.....	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการศึกษา.....	32
แผนการทดลอง.....	32
เครื่องมือและอุปกรณ์.....	40
สารเคมี.....	42
วิธีดำเนินการทดลอง.....	43
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	51
การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอ นกกระทาญี่ปุ่น (<i>Coturnix japonica</i>).....	51
ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะ สร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges).....	54

ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้.....	61
ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้และเพศเมีย.....	66
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	78
การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น (<i>Coturnix japonica</i>).....	78
ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges).....	79
ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้.....	84
ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้และเพศเมีย.....	87
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	94
การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น (<i>Coturnix japonica</i>).....	94
ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges).....	95
ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้.....	95
ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้และเพศเมีย.....	96
ข้อเสนอแนะ.....	97
รายการอ้างอิง.....	100
ภาคผนวก.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	125

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. แสดงการจำแนกกลุ่มของ endocrine disruptors (EDs).....	1
2. จำนวนของ PGCs (mean \pm SEM) ที่บริเวณ genital ridges ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	55
3. ค่าดัชนีความเป็นหมัน (Index of Sterility : IS) ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	55
4. จำนวนของ ER-immunostained cells (mean \pm SEM) ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	62
5. ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียอายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิดความผิดปกติของ MDs ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	68
6. ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	74

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. เปรียบเทียบนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยเพศผู้ (ขวา) และเพศเมีย (ซ้าย).....	6
2. ความหลากหลายของลายบนเปลือกไข่นกกระทาญี่ปุ่น.....	6
3. ระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น.....	8
4. วิธีการเคลื่อนที่ของ Primordial germ cells (PGCs) ในเอ็มบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	9
5. จุดกำเนิดของ Primordial germ cells (PGCs) บริเวณ germinal crescent.....	11
6. แสดง PGCs ในระยะ passive และ active migration.....	15
7. การเคลื่อนที่ของ PGCs ของเอ็มบริโอไก่ในระยะต่างๆ.....	16
8. แสดง sexual differentiation ของ embryonic gonads.....	19
9. แสดงการเจริญของชั้น cortex และ medulla ของ embryonic gonad.....	20
10. แสดงการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่บนไตชุดที่สอง.....	20
11. กระบวนการ gonadal differentiation.....	21
12. การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่จำเพาะในการกำหนดเพศ.....	22
13. แสดงการสลายตัวของ accessory embryonic ducts.....	26
14. แสดงการเจริญของ Müllerian duct ของเอ็มบริโอในระยะที่ยังไม่กำหนดเพศ และ รูปแบบการสลายตัวของ Müllerian duct.....	27
15. เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีระหว่าง Genistein กับ 17β-Estradiol.....	29
16. แสดง ovarian antral follicles และ multi-oocyte follicle.....	30
17. ภาพตัดขวางเอ็มบริโอระยะ 72 ชั่วโมงแสดงบริเวณ genital ridge (วงรี) ที่ทำการนับ จำนวน PGCs.....	33
18. เครื่องมืออัตโนมัติเพื่อใช้พลิกไข่นกกระทา (Automatic rotating incubator).....	41
19. แสดงการฉีด genistein โดยตรงในไข่ (in ovo) ผ่านบริเวณที่เป็นไข่แดง (yolk) ในวันที่ยังไม่ได้เข้าฟัก.....	43
20. ระยะ PGCs migration แสดง PGCs ที่อยู่ใน dorsal aorta และที่ใกล้กับบริเวณที่ จะมีการเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นระยะ 48 ชั่วโมง.....	53
21. แสดง embryonic gonads ของนกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 6 วัน ซึ่งเป็นระยะยังไม่ สามารถแยกเพศจากลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ (indifferent gonads).....	53

ภาพประกอบ	หน้า
22. แสดง embryonic gonads ของนกกกระทาญี่ปุ่นระยะ gonadal differentiation อายุฟัก 8 วัน เป็นช่วงที่สามารถแยกเพศได้ (different gonads).....	53
23. แสดง embryonic gonad ของนกกกระทาญี่ปุ่นระยะ gonadal growth และ maturation อายุฟัก 15 วัน.....	53
24. จำนวน PGCs (mean \pm SEM) บริเวณ genital ridges ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21).....	56
25. ค่าดัชนีความเป็นหมัน (mean \pm SEM) ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21).....	56
26. ภาพตัดขวาง (cross section) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21).....	58
27. ภาพตัดขวาง (cross section) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) กลุ่มที่ย้อมด้วย WFA lectin (<i>Wisteria floribunda</i> Agglutinin).....	60
28. เปอร์เซ็นต์ของจำนวน ER-immunostained cells (mean \pm SEM) ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34).....	63
29. ภาพตัดขวาง (cross section) ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ (male left gonad) อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34).....	65
30. ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียอายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิดความผิดปกติของ MDs ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	69
31. ลักษณะทางกายวิภาคของ embryonic ducts ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศเมีย อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41).....	71
32. ลักษณะทางกายวิภาคของ embryonic ducts ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41).....	73
33. ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (<i>in ovo</i>) ก่อนการเข้าฟัก.....	75
34. ภาพตัดขวาง (cross section) ของอัณฑะข้างซ้าย (left testis) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41).....	77

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีสารเคมีหลายชนิดที่สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม สารเคมีเหล่านั้นอาจเป็นสารสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตหรืออาจเป็นสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นได้เอง กลุ่มของนักวิชาการได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของสารเคมีดังกล่าวว่า มีความเป็นไปได้สูงที่สิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับหรือสัมผัสกับสารเคมีเหล่านั้นแล้วจะส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Safe et al., 2000) สารเคมีดังกล่าวถูกเรียกกันในชื่อต่างๆ มากมาย เช่น endocrine disrupting chemicals (Colborn and Clements, 1992) endocrine disrupting contaminants (Guillette and Gunderson, 2001) environmental signals (Cheek et al., 1998) environmental hormones (Danzo, 1998) และ hormonally active agents (Knobil, 1999) แต่ชื่อที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ endocrine disruptors (Kavlock et al., 1996)

ได้มีผู้ให้คำจำกัดความของ endocrine disruptors (EDs) ไว้หลายความหมาย แต่ในปี ค.ศ.1997 หน่วยงาน Environmental Protection Agency (EPA) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ให้คำจำกัดความของ endocrine disruptors (EDs) ไว้ดังนี้ “สารจากแหล่งภายนอกที่สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ การคัดหลั่ง การขนส่ง การจับกับตัวรับ การแสดงออก หรือ การกำจัดของฮอร์โมนในร่างกายตามธรรมชาติที่มีหน้าที่รับผิดชอบในการรักษาภาวะอารมณ์ การสืบพันธุ์ การเจริญ และ พฤติกรรม” โดยกระบวนการที่ endocrine disruptors มีผลไปรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อและฮอร์โมนในร่างกายนั้น เรียกว่า “endocrine disruption” (McLachlan, 2001) นอกจากนี้ยังได้มีการจำแนก endocrine disruptors ไว้หลายกลุ่ม ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกกลุ่มของ endocrine disruptors (EDs)

กลุ่ม endocrine disruptors	ตัวอย่าง endocrine disruptors
Fungicides	Vinclozolin, Benzimidazole
Herbicides	Atrazine, Alachlor
Insecticides	Methoxychlor, <i>o,p'</i> DDT, Carbaryl
Metals	Tributyltin, Triphenyltin, Cadmium
Pharmaceuticals	Ethinylestradiol (EE ₂), Diethylstilbestrol (DES)
Phenols	Bisphenol A, Tetrabromobisphenol A
Soy products	Genistein, Daidzein

โดยทั่วไปสามารถพบ endocrine disruptors ได้มากมายหลายชนิด อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งกลุ่มของ endocrine disruptors ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม endocrine disruptors ที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น vinclozolin, atrazine, methoxychlor, tributyltin, ethynylestradiol และ bisphenol A กลุ่มที่สองคือ endocrine disruptors ที่ได้จากธรรมชาติ ในที่นี้มีเพียง genistein และ daidzein ที่เป็น endocrine disruptors ที่พบในพืชหลายชนิดและสามารถออกฤทธิ์คล้ายกันกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) (Kanno et al., 2002) สามารถแบ่งกลุ่ม phytoestrogens ออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ isoflavones, coumestans และ lignans (Turner and Sharpe, 1997) ใน 3 กลุ่มนี้ กลุ่ม isoflavones อันได้แก่ genistein และ daidzein นั้น เป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย (estrogenic effects) มากที่สุด (Lephart et al., 2002) โดยเฉพาะ genistein ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็น phenolic rings มีความสามารถที่จะจับกับ estrogen receptor แล้วออกฤทธิ์การทำงานเป็นตัวเสริมฤทธิ์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen agonist) หรือเป็นตัวต้านฤทธิ์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen antagonist) ได้ (Setchell, 1998) genistein พบมากในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลือง นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ genistein และ daidzein จำนวนมาก (King, 2002)

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญสำหรับใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงสัตว์สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงนกกกระทาญี่ปุ่นนั้น โปรตีนเป็นสารอาหารที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับนกกกระทาในระยะวางไข่ (Woodard et al., 1973) อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาโดยใช้ genistein เป็น endocrine disruptors ที่จะออกฤทธิ์ในเชิง estrogenic effects ต่อนกกกระทาญี่ปุ่นในระยะตัวเต็มวัยมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีข้อมูลอย่างเพียงพอและมีผู้ศึกษากันเป็นจำนวนมาก การศึกษาถึงผลของ genistein ต่อสัตว์ปีกส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้านพิษวิทยาการสืบพันธุ์ (reproductive toxicology) โดยศึกษาผลของ genistein ต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ (reproductive organs) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในระยะตัวเต็มวัย และเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาในกลุ่มสัตว์ปีกด้วยกันเองไม่ว่า ในนกกกระทาพันธุ์แคลิฟอร์เนีย (Leopold, 1976) ไนไก่ (Saito et al., 2001; Opalka et al., 2004) และในนกกกระทาญี่ปุ่น (Hanafy et al., 2004; Lin et al., 2004) ก็เป็นการศึกษาในระยะตัวเต็มวัยทั้งสิ้น อย่างไรก็ตามเอ็มบริโอของสัตว์ปีกมีความเสี่ยงที่จะได้รับผลกระทบจาก endocrine disruptors ที่สามารถออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้มากกว่าตัวเต็มวัย นอกจากนี้มีรายงานว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนยังมีผลต่อกระบวนการกำหนดเพศของเอ็มบริโอของสัตว์ปีก (Shibuya et al., 2004) ดังนั้น phytoestrogen จึงน่าจะมีผลกระทบต่อกระบวนการกำหนดเพศได้ ระบบสืบพันธุ์เป็นระบบที่มีความสำคัญระบบหนึ่งในการสืบต่อเนื่องของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันที่มี

ผลกระทบต่อระบบนี้ในสิ่งมีชีวิตได้ก็จะมีผลกระทบต่อการสืบต่อเนื่องในประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นด้วยเช่นกัน

เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นมีข้อดีและข้อได้เปรียบสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาผลของ endocrine disruptors ที่มีต่อการเจริญ (developmental toxicology) ได้แก่ ไข่มีขนาดเหมาะสม ไม่เล็กหรือใหญ่จนเกินไป (Berg et al., 1999) มีความสะดวกในการฟัก สามารถให้สารเคมีที่ต้องการศึกษาต่อตัวเอ็มบริโอได้โดยตรงในไข่ (Halldin et al., 2004; Halldin, 2005) นกกระทาวางไข่ทั้งปีจึงสามารถมีไข่ทำการทดลองได้โดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล (Berg et al., 1999; Halldin, 2005) ประกอบกับเอ็มบริโอมีขนาดเล็กใช้เวลาในการฟักน้อยกว่าเอ็มบริโอของไก่และใช้สารเคมีน้อยกว่าเอ็มบริโอไก่ (Berg et al., 1998) นอกจากนี้พบว่ามีผู้ศึกษาระบบต่อมไร้ท่อ ระบบประสาท และพฤติกรรมทางการสืบพันธุ์ไว้แล้วเป็นอย่างดี (Halldin et al., 1999; Ottinger et al., 2001; Ottinger et al., 2002; Halldin et al., 2004; Ottinger et al., 2005) และยังได้มีการแนะนำให้ใช้เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเป็นสัตว์ทดลองในการทดสอบความเป็นพิษของ endocrine disruptors ที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีก (reproduction toxicity test) อีกด้วย (OECD, 1984; EPA, 1996; OECD, 2000a; OECD, 2000b; Touart, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้เลือกให้เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเป็นสัตว์ทดลองในการศึกษาถึงผลของ genistein ที่มีต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal development)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของ genistein เมื่อให้กับเอ็มบริโอโดยตรงในไข่ (*in ovo*) ที่มีต่อกระบวนการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น (*Coturnix japonica*) ในเรื่องต่อไปนี้

1. ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges)
2. ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้
3. ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้และเพศเมีย

ขอบเขตการศึกษา

1. เปรียบเทียบผลของ genistein 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) ที่มีต่อจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells) ที่สามารถเคลื่อนที่มาฝังตัวในบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges) ในวันที่ 3 ของการฟัก
2. ศึกษาผลของ genistein 2 ความเข้มข้น ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของตัวรับต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้าย (left gonad) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ในวันที่ 8 ของการฟัก เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงปริมาณของตัวรับต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนกับการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
3. ติดตามผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal growth and maturation) ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับท่อของระบบสืบพันธุ์ในเอ็มบริโอทั้ง 2 เพศ โดยการศึกษาในระดับกายวิภาคและระดับเนื้อเยื่อในวันที่ 15 ของการฟัก

ห้องปฏิบัติการที่ทำการศึกษาคือ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลเชิงวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ปีก
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการตัดสินใจใช้ฮอร์โมนเพศหรือสารที่ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับฮอร์โมนเพศในการเปลี่ยนเพศนกกระทาญี่ปุ่นเพื่อเพิ่มผลผลิตไข่

บทที่ 2

สอบสวนเอกสาร

อนุกรมวิธานของนกกระทาญี่ปุ่น *Coturnix japonica*

นกกระทาญี่ปุ่นมีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Aves

Order Galliformes

Family Phasianidae

Genus *Coturnix*

Species *Coturnix japonica*

นกกระทาญี่ปุ่นคือนกกระทาที่มีการเลี้ยงเพื่อนำไขมาเป็นสินค้าในประเทศไทยซึ่งมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ Common quail, Stubble quail, Pharaoh's quail, Eastern quail, Asiatic quail, Japanese Grey quail, Red-throat quail, Japanese migratory quail, King quail และ Japanese King quail อย่างไรก็ตามยังมีนกกระทาอื่น ๆ อีกหลายชนิดเช่น Bob white quail (*Colinus virginianus*) และ California quail (*Lophortyx californica*) ซึ่งพบในทวีปอเมริกาเหนือ สำหรับนกกระทาที่พบหรือที่เอามาเลี้ยงในประเทศไทยคือ นกกระทาญี่ปุ่น หรือ Japanese quail (*Coturnix japonica*)

นกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัย

เพศผู้ : สามารถแยกนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยเพศผู้ออกจากเพศเมียได้เมื่อมีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ตัวเต็มวัยเพศผู้สังเกตได้จากลักษณะสีขนแบบ cinnamon-colored feathers ตรงบริเวณลำคอด้านบนและบริเวณอกด้านล่าง นอกจากนี้ Sanford (1957) รายงานว่า สามารถการแยกเพศนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยได้จากเสียงร้อง

เพศเมีย : ลักษณะสีขนของตัวเต็มวัยเพศเมียคล้ายกันกับเพศผู้ ยกเว้นสีขนที่บริเวณลำคอและอกด้านบนของเพศเมียจะยาวกว่า มีลักษณะเป็นจุด และมีสีขนที่จางกว่าเพศผู้มาก นอกจากนี้ยังมีลักษณะพิเศษของสีขนบริเวณอกคือมีสีเทาและมีแถบสีดำ



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยเพศผู้ (ขวา) และเพศเมีย (ซ้าย)

ไข่นกกระทาญี่ปุ่น

ลักษณะพิเศษของไข่นกกระทาญี่ปุ่นคือมีสีและลายบนเปลือกไข่ที่หลากหลาย รงควัตถุที่พบในเปลือกไข่ได้แก่ ooporphyrin และ biliverdin (Poole, 1965) องค์ประกอบของไข่นกกระทาญี่ปุ่นประกอบด้วย ไข่ขาว 47.4% ไข่แดง 31.9% รวมทั้งส่วนที่เป็นเยื่อใต้เปลือกไข่และเปลือกไข่อีก 20.7% (Mohmond and Coleman, 1967) น้ำหนักเฉลี่ยของไข่ประมาณ 10 กรัม ซึ่งเป็นประมาณ 8% ของน้ำหนักแม่ นก Woodard and Wilson (1963) รายงานว่า ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักไข่ ไข่แดงและเปลือกไข่บริเวณตรงกลางของไข่มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด



ภาพที่ 2 ความหลากหลายของลายบนเปลือกไข่นกกระทาญี่ปุ่น

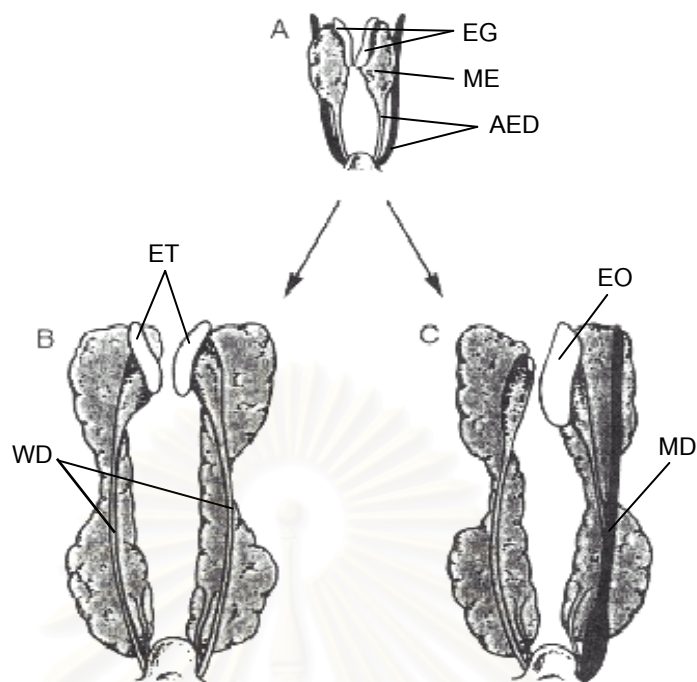
เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น

เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นใช้เวลาเจริญงอกงามในไข่ประมาณ 16 วัน จึงฟักเป็นตัว (Abbott, 1967) ซึ่งน้อยกว่าเอ็มบริโอไก่ที่ใช้ระยะเวลาในการเจริญ 21 วัน (Hamburger and Hamilton, 1951) Padgett and Ivey (1960) เป็นผู้เริ่มศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอย่างละเอียดตั้งแต่วันแรกที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิไปจนถึงระยะแรกฟักของเอ็มบริโอจึงได้

เสนอว่า นกกระทาญี่ปุ่นมีความน่าสนใจและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสัตว์ตัวแบบ (model animal) ในงานวิจัยทางชีววิทยาการสืบพันธุ์และการเจริญ เนื่องจากนกกระทาญี่ปุ่นเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วโดยใช้เวลาเพียง 6 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของเอ็มบริโอมักพบปัญหาการตายของเอ็มบริโอซึ่งพบมากในช่วง 3 วันแรกของการฟักและช่วงที่เอ็มบริโอใกล้จะฟักเป็นตัว ปัญหาการตายของเอ็มบริโอเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุเช่น เอ็มบริโอไม่สามารถสร้างอวัยวะที่สำคัญได้ เกิดความผิดปกติในการพลิกตัวของเอ็มบริโอ การนำสารอาหารจากไข่ขาวมาใช้ในการดูดซึมสารอาหารจากถุงไข่แดง และการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณแอลแลนทอยส์ (allantois)

การเจริญของระบบสืบพันธุ์นกกระทาญี่ปุ่น

การเจริญของระบบสืบพันธุ์เกิดในระยะเอ็มบริโอโดยประกอบด้วยส่วนที่เป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (embryonic gonads) ซึ่งทำหน้าที่หลักในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametes) และส่วนที่เป็นท่อของระบบสืบพันธุ์ (accessory embryonic ducts) ทำหน้าที่นำเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่แหล่งที่จะมีการปฏิสนธิ ในเอ็มบริโอเพศผู้อันทอะ (testes) ข้างซ้ายและขวามีขนาดเท่ากัน (symmetrical gonads) ในขณะที่เอ็มบริโอเพศเมียเฉพาะรังไข่ (ovary) ข้างซ้ายเท่านั้นที่มีการเจริญและผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้ (asymmetrical gonads) ส่วนรังไข่ข้างขวาสลายไปในระยะเอ็มบริโอ อันทอะประกอบด้วยท่อสร้างสเปิร์ม (seminiferous tubules) ขดอยู่ภายใน ภายในรังไข่ประกอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cells) ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์ไข่ ได้แก่ โอโอโกเนีย (oogonia) และโอโอไซต์ (oocyte) ระยะต่างๆ ท่อของระบบสืบพันธุ์ในเอ็มบริโอเพศผู้เรียกว่า “โวลเฟียน ดักส์ (Wolffian ducts)” ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากท่อของไตชุดที่สอง (mesonephric duct) โวลเฟียน ดักส์มีทั้งข้างขวาและข้างซ้ายเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงเป็นหลอดนำอสุจิ (vas deferens) ซึ่งจะเปิดออกสู่ทวารร่วม (cloaca) ส่วนท่อที่อยู่ทางด้านหน้าของไตชุดที่สองจะเปลี่ยนแปลงเป็นหลอดเก็บตัวอสุจิ (epididymis) (Lillie, 1919) สำหรับระบบท่อของระบบสืบพันธุ์ในเอ็มบริโอเพศเมียเรียกว่า “มุลเลอร์เรียน ดักส์ (Müllerian ducts)” ซึ่งเป็นท่อที่เกิดในขณะที่เอ็มบริโอมีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ มุลเลอร์เรียน ดักส์ในเอ็มบริโอสัตว์มีกระดูกสันหลังเพศผู้จะสลายตัวโดยอิทธิพลของฮอร์โมนเพศผู้ สำหรับในเพศเมีย มุลเลอร์เรียน ดักส์ยังคงอยู่และเปลี่ยนแปลงเป็นระบบท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ส่วนโวลเฟียน ดักส์ทั้งสองข้างจะสลายไป ในกลุ่มสัตว์ปีกมุลเลอร์เรียน ดักส์ข้างซ้ายเท่านั้นที่เจริญในระยะเอ็มบริโอและเปลี่ยนแปลงเป็นท่อนำไข่ (oviducts) เมื่อนกกระทาเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ มุลเลอร์เรียน ดักส์ข้างขวาสลายตัวตั้งแต่นะยะเอ็มบริโอเช่นเดียวกับรังไข่ข้างขวา (Romanoff, 1960)



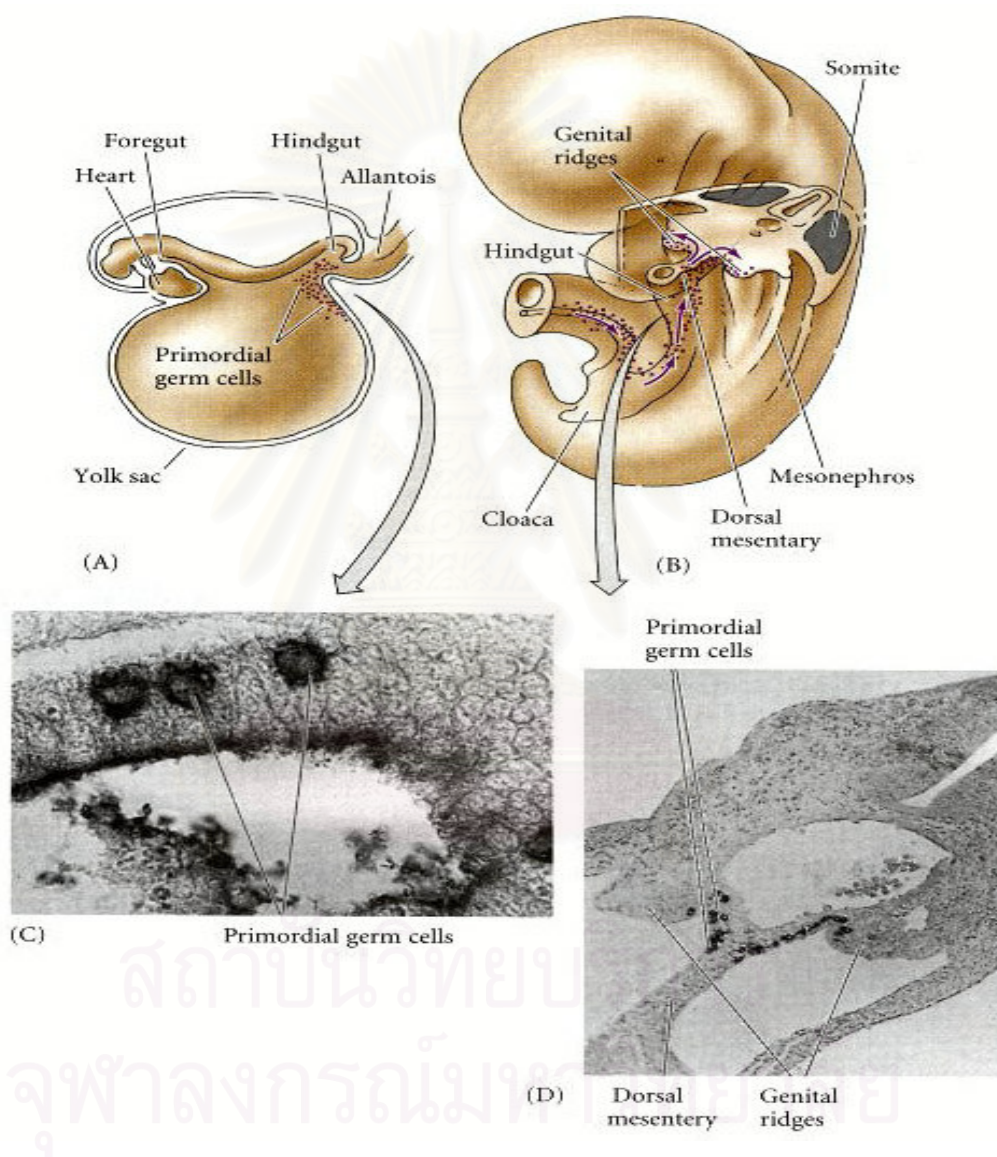
ภาพที่ 3 ระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริออนกกระทาญี่ปุ่น (A) ระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริโอในระยะที่ยังไม่กำหนดเพศ (indifferent stage) ประกอบด้วย gonads (สีขา) และ accessory embryonic ducts (สีเทาและสีดำ) (B) เอ็มบริโอเพศผู้ระยะฟักมี Wolffian ducts (สีเทา) ทั้งข้างซ้ายและขวา และ (C) เอ็มบริโอเพศเมียระยะฟักมี Müllerian ducts (สีดำ) ข้างซ้ายเพียงข้างเดียว (ดัดแปลง จาก Romanoff, 1960) [EG: Embryonic Gonad; ET: Embryonic Testes; EO: Embryonic Ovary; AED: Accessory Embryonic Duct; WD: Wolffian Duct; MD: Müllerian Duct; ME: Mesonephros]

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal development) ในระยะเอ็มบริโอมีเหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นต่อเนื่องเป็นลำดับ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ได้แก่:

1. ระยะที่มีการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial germ cells: PGCs) จากแหล่งกำเนิดนอกตัวเอ็มบริโอ (extraembryonic region) มาฝังตัวในตำแหน่งที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 1-2 วัน PGCs เป็นกลุ่มเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากกลุ่มเซลล์เอนโดเดิร์ม (endoderm) ของถุงหุ้มไข่แดง (yolk sac) ที่อยู่ใกล้กับส่วนของทางเดินอาหารส่วนท้ายของเอ็มบริโอ (hindgut) ที่จะยื่นออกเกิดเป็นแอลแลนทอยด์ PGCs เคลื่อนที่แบบ amoeboid movement มาตามเยื่อแขนงลำได้

(mesentery) จนกระทั่งมาฝังตัวในตำแหน่งที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งในระยะนี้มีลักษณะเป็นสันนูนเรียกว่า “genital ridges” อยู่ที่แนวกลางลำตัวทางด้านล่าง (medioventral) ของไตชุดที่สอง (mesonephros) หลังการฝังตัว PGCs และเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ใน genital ridges เจริญร่วมกันเพื่อสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad)



ภาพที่ 4 วิธีการเคลื่อนที่ของ Primordial germ cells (PGCs) ในเอ็มบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (A) PGCs ที่เห็นใน yolk sac ใกล้กับบริเวณ hindgut และ allantois (B) PGCs เคลื่อนที่ไปตาม dorsal mesentery เพื่อไปฝังตัวที่ genital ridges (C) PGCs บริเวณ hindgut ใกล้กับตำแหน่งของ yolk sac และ allantois (D) PGCs ที่เคลื่อนที่ไปตาม dorsal mesentery (ดัดแปลงจาก Gilbert, 2003)

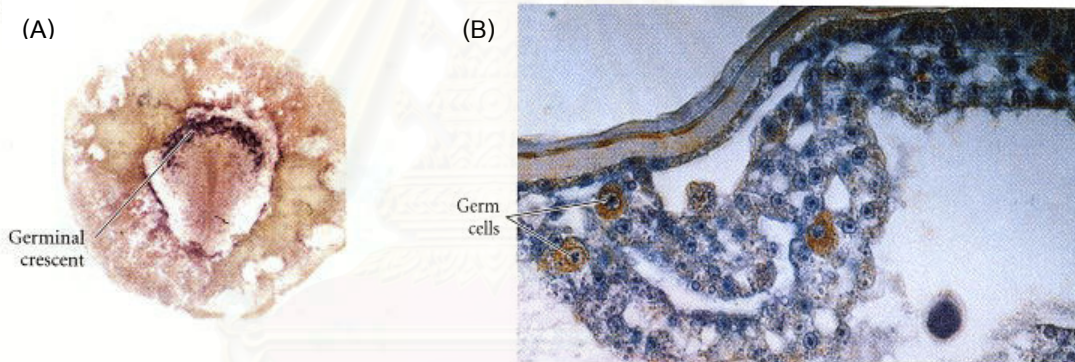
2. ระยะเวลาที่เกิดกระบวนการกำหนดเพศ (sex determination) ของเอ็มบริโอ กระบวนการนี้เกิดในเอ็มบริโอระยะพัก 3-4 วัน
 3. ระยะเวลาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal differentiation) เพศผู้หรือเพศเมีย กระบวนการนี้เกิดในเอ็มบริโอระยะพักประมาณ 6 วัน
- ในที่สุดอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแต่ละเพศมีการทำงาน (gonadal function) เพื่อผลิตเซลล์สืบพันธุ์ (gametes) ที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป (Clinton and Haines, 1999)

ต้นกำเนิดและลักษณะรูปร่างของ Primordial Germ Cells (PGCs) ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น

การเริ่มต้นศึกษา PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเกิดหลังจากมีการศึกษา PGCs ในเอ็มบริโอไก่ โดยเริ่มจากการศึกษาของ Swift (1914) ซึ่งสามารถจำแนก PGCs จากกลุ่มเซลล์ร่างกายอื่นๆ ของเอ็มบริโอได้ตั้งแต่ในช่วงท้ายของการเจริญในระยะแกสทูลา (gastrula) ต่อมาผู้สามารถจำแนก PGCs ในการเจริญช่วงต้นของเอ็มบริโอระยะแกสทูลาขณะมีการเริ่มสร้างพริมีทีฟ สตรีค (primitive streak) (Clawson and Domm, 1969) ซึ่งมีการศึกษาในระยะหลังที่มีผลสอดคล้องกับการศึกษารุ่นนี้ได้แก่รายงานของ Muniesa and Dominguez, 1990; England and Mutsumura, 1993; Matsumura and England, 1993; Karagenc et al. (1996) การศึกษาของ Fujimoto et al. (1976) ได้ตรวจพบ PGCs ที่บริเวณ เจอร์มินัล แครสเซนต (germinal crescent) ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ทางด้านหน้า (anterior) ของพริมีทีฟ สตรีค เป็นบริเวณที่กลุ่มเซลล์มีโซเดิร์ม (mesoderm) เคลื่อนที่ไปไม่ถึง ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน Eyal-Giladi et al. (1976) สามารถจำแนก PGCs ได้ในการเจริญระยะที่อ่อนกว่าการศึกษาเดิมโดยพบที่บลาสโตดิสก์ (blastodisc) ในการเจริญช่วงท้ายของระยะคลีเวจ (cleavage) ต่อกับระยะบลาสทูลา (blastula) และมีการศึกษาในระยะต่อมาที่รายงานผลเช่นเดียวกันได้แก่งานของ Sutasurya et al. (1983), Pardanaud et al. (1987) และ Ginsburg and Eyal-Giladi (1989) Eyal-Giladi et al. (1981) ศึกษาโดยใช้เทคนิค Feulgen staining สามารถพบ PGCs ที่บริเวณเอพิบลาสต์ (epiblast) ซึ่งเกิดในช่วงต้นของการเจริญระยะบลาสทูลา รายงานการศึกษาในระยะต่อมาสามารถตรวจพบ PGCs ตรงกลางของ area pellucida ซึ่งเกิดในการเจริญช่วงท้ายของระยะคลีเวจต่อเนื่องกับระยะบลาสทูลา (Ginsburg and Eyal-Giladi, 1987; Kagami, 1997; Naito, 2001) อย่างไรก็ตาม Tsunekawa et al. (2000) สามารถติดตามได้ว่าไซโทพลาซึมในตำแหน่งใดของโอโอไซต์ (oocytes) ที่มีบทบาทในการเจริญมาเป็น PGCs โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry

การศึกษาของ Yoshinaga et al. (1993) ได้รายงานถึงลักษณะรูปร่าง PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นไว้ดังนี้

1. เซลล์มีขนาดประมาณ 12-15 ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่าเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ที่อยู่ใกล้เคียงและมีนิวเคลียสขนาดประมาณ 7-10 ไมโครเมตร
2. ไม่มี glycogen particles ในไซโทพลาซึม (Nakamura et al., 1992) ซึ่งต่างจาก PGCs ของเอ็มบริโอไก่ที่มี glycogen particles เป็นจำนวนมากในไซโทพลาซึม (Clawson and Domm, 1963; Meyer, 1964; Fujimoto et al., 1976)
3. การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบ electron dense และ membrane bounded granules ในไซโทพลาซึมในระยะ indifferent gonads
4. มีนิวเคลียสที่เห็นได้ชัดเจนและอยู่ใกล้กันกับเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) ซึ่งการศึกษาค้างนี้เป็นการศึกษาค้างแรกที่ได้อายางถึงลักษณะ PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นทั้งภายนอกและภายในอย่างละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน



ภาพที่ 5 จุดกำเนิดของ Primordial germ cells (PGCs) บริเวณ germinal crescent (A) แสดงบริเวณ germinal crescent (สีม่วง) ที่พบ PGCs (B) ภาพกำลังขยายสูงของ PGCs (สีน้ำตาล) บริเวณ germinal crescent (ดัดแปลงจาก Tsunekawa et al., 2000)

การจำแนก PGCs ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น

การจำแนก PGCs ในระยะเริ่มต้นของการเคลื่อนที่ทำได้ง่ายโดยการสังเกตจากขนาดที่ใหญ่กว่าเซลล์ร่างกายที่อยู่ใกล้เคียง (Meyer, 1964; Singh and Meyer, 1967) อย่างไรก็ตามการศึกษาค้างนี้ใช้วิธีที่จำเพาะในการจำแนก PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นโดยใช้ germ cell markers ชนิดต่างๆ ได้แก่

1. เอนไซม์ Alkaline phosphatase (AP) Swartz (1982) พบว่า AP เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมขณะที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs ทั้งในระยะที่เคลื่อนที่แบบ passive

- และระยะที่เคลื่อนที่แบบ active ของเอ็มบริโอไก่ ในระยะที่เคลื่อนที่แบบ passive พบตำแหน่งของเอนไซม์ AP ในไซโทพลาซึมใกล้กับนิวเคลียส แต่ในระยะ active พบตำแหน่งของเอนไซม์ AP เปลี่ยนไปอยู่บริเวณใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ สิทธิพลและคณะ (2547ข) ได้ศึกษาตำแหน่งของ PGCs ในเอ็มบริโอจนกระทั่งหาตัวบ่งชี้ด้วยเทคนิคการย้อมเอนไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Swartz (1982) ที่ศึกษาในเอ็มบริโอไก่ อย่างไรก็ตามการจำแนก PGCs ด้วยวิธีนี้ยังมีความจำเพาะ (specificity) ต่ำมาก
2. เลคติน (Lectin) เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ sugar residues ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ PGCs ในการเจริญระยะที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs Yoshinaga et al. (1992) พบว่า lectin จากมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) สามารถจับกับ sugar residues ของ PGCs ได้ทั้งในเอ็มบริโอไก่และเอ็มบริโอจนกระทั่งหาตัวบ่งชี้ ในขณะ lectin จาก Japanese wistaria (*Wistaria floribunda*) จะจับกับ sugar residues ของ PGCs ในเอ็มบริโอจนกระทั่งหาตัวบ่งชี้เท่านั้น
 3. การใช้ตัวบ่งชี้ทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical markers) เป็นการใช่มอนอโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) และ โพลีโคลนอล แอนติบอดี (polyclonal antibody) ไปจับกับ germ cells epitopes ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ PGCs อย่างจำเพาะในเอ็มบริโอจนกระทั่งหาตัวบ่งชี้และติดตามตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาโดยใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากสารเรืองแสงหรือเอนไซม์ที่เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เกิดตะกอนสี เช่น QH-1 (Pardanaud et al., 1987) Anti-gPGC serum (Ginsburg et al., 1989) QCR1 / QB2 (Ono et al., 1996; Ono et al., 1998; Ono and Machida, 1999) และ Vasa (Tsunekawa et al., 2000)

การเคลื่อนที่ของ Primordial Germ Cells

Primordial Germ Cells (PGCs) มีความสามารถในการเคลื่อนที่จากแหล่งต้นกำเนิดบริเวณนอกตัวเอ็มบริโอ (extraembryonic region) ไปฝังตัวตรงบริเวณที่จะเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (presumptive gonads) (Kuwana, 1993) ปัจจุบันที่คาดว่าเป็นตัวชักนำให้ PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวยังบริเวณที่จะเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้อย่างถูกต้องนั้นเชื่อว่าเป็นการชักนำจากสารเคมี (chemotaxis) อย่างไรก็ตามการศึกษาในระยะแรกยังไม่ทราบถึงชนิดและกลไกการทำงานของ chemotactic factor ดังกล่าวได้อย่างชัดเจนจึงเรียกสารดังกล่าวว่า “telopheron” (Baker, 1972) telopheron ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ร่างกายของ presumptive gonads และชักนำให้ PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวยังบริเวณ presumptive gonads ได้ทั้ง 2 ข้าง แต่จำนวน PGCs ประมาณ 70% พบที่ gonad ข้างซ้ายมากกว่าข้างขวาในทั้งสองเพศ (Witschi, 1935) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Swartz and Domm (1972) ที่กล่าวว่า presumptive gonad ข้างซ้ายหลั่ง chemotactic factor ออกมามากกว่าข้างขวาซึ่งมีผลต่อการ

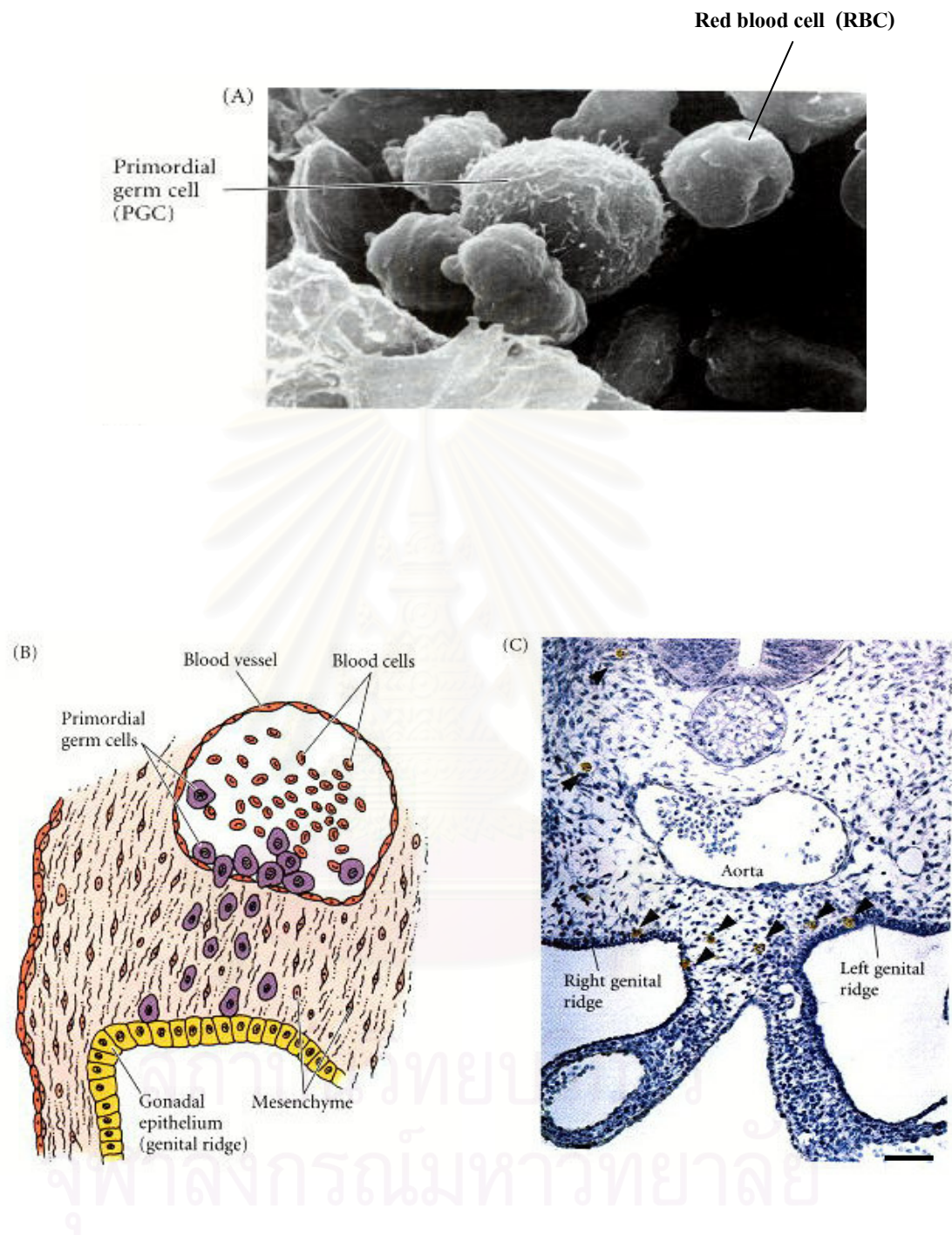
เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitotic activity) ของ PGCs นอกจากนี้ Didier and Fargeix (1976) พบว่า การฝังตัวของ PGCs ในเอ็มบริโอนกกระต่ายปุ่นบริเวณ presumptive gonads ข้างซ้ายและขวามีจำนวนไม่เท่ากันในระยะที่เอ็มบริโอเกิด wing buds และ leg buds (stages 18 and 24 Hamburger and Hamilton, 1951) และเมื่อ presumptive gonads เจริญไปเป็นรังไข่ แล้วพบ oogonia ซึ่งเจริญมาจาก PGCs ที่รังไข่ข้างซ้ายมากกว่าข้างขวาและยังพบอัตราการตายของ oogonia ที่รังไข่ข้างขวามากกว่าข้างซ้ายอีกด้วย (Ukeshima and Fujimoto, 1991) สำหรับ oogonia ที่ตายแล้วจะถูกกำจัดออกจากบริเวณ lacunae ในชั้น medulla ของรังไข่ทั้งข้างซ้ายและขวา (Ukeshima, 1994) และพบว่าการตายของเซลล์เป็นแบบ apoptosis (Ukeshima, 1996; Yoshimura and Nishikori, 2004)

สำหรับการศึกษารายละเอียดของ chemotactic substance ที่หลั่งออกมาจาก presumptive gonads นั้น Baillie et al. (1966) สันนิษฐานว่า chemotactic factor ที่หลั่งมาจาก presumptive gonads ซึ่งมีผลไปชักนำให้ PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวยังบริเวณ presumptive gonads ได้นั้นน่าจะเป็นสารพวก steroids ต่อมา Swartz (1975) ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบว่าการให้ exogenous steroid hormones จะเข้าไปรบกวนการทำงานของ endogenous steroids ที่หลั่งออกมาจาก presumptive gonads ในขณะที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs exogenous steroid hormones น่าจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ในเชิงไปกระตุ้น ยับยั้ง หรือ รบกวนการเคลื่อนที่ของ PGCs ผลการทดลองพบว่า testosterone cypionate (TC) มีผลไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของ PGCs ทำให้พบจำนวนของ PGCs ที่บริเวณ presumptive gonads น้อยที่สุด ผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนสมมติฐานว่า chemotactic substance ที่ถูกหลั่งออกมาจาก presumptive gonads เป็นสารพวก steroids อย่างไรก็ตาม Dubois et al. (1976) รายงานว่า presumptive gonads มีการหลั่งสารพวกไกลโคโปรตีนเพื่อชักนำให้ PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวในบริเวณดังกล่าว ซึ่งเป็นการรายงานที่ขัดแย้งกับข้อสันนิษฐานของ Baillie et al. (1966) และการทดลองของ Swartz (1975)

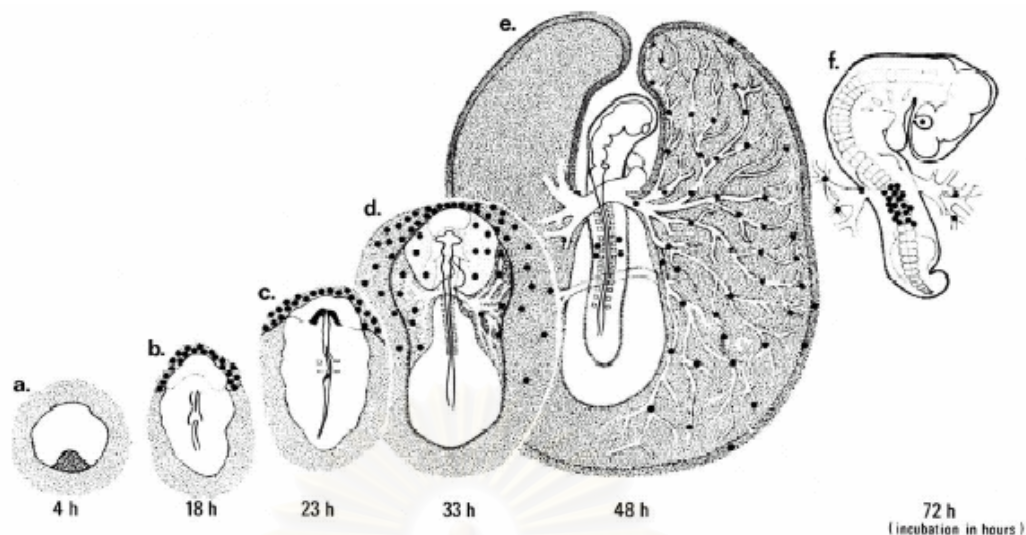
อย่างไรก็ตามเชื่อกันว่า chemotactic factor ที่ถูกหลั่งออกมาจาก presumptive gonads คือ Transforming Growth Factor beta; TGF β (Godin and Wylie 1991; Drews, 1995; Gilbert, 2003) ซึ่งเป็นสารพวกโปรตีน นอกจากนี้ Stebler et al. (2004) พบว่า สารเคมีชื่อ SDF-1 α (The chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha) ยังทำหน้าที่เป็น chemotactic factor ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้ PGCs ของเอ็มบริโอไก่เคลื่อนที่มาฝังตัวยังบริเวณ presumptive gonads ได้ ซึ่งสารเคมีดังกล่าวเป็นสารพวกโปรตีนเช่นกัน

การเคลื่อนที่ของ PGCs ในระยะแรกนั้นเป็นการเคลื่อนที่แบบ passive (passive migration) โดย PGCs ที่อยู่ตรงบริเวณ germinal crescent จะเคลื่อนที่ผ่านเซลล์บุผนังเส้นเลือด

(endothelial cells) เข้ามาอยู่ภายในเส้นเลือดด้วยกระบวนการ diapedesis (Gilbert, 2003) ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่แบบ amoeboid movement อย่างหนึ่ง ต่อมา PGCs ที่เข้ามาอยู่ภายในเส้นเลือดจะมีการเคลื่อนที่โดยอาศัยการไหลเวียนไปตามกระแสเลือดภายในเส้นเลือดนอกตัวเอ็มบริโอ (extraembryonic blood vessel) เรียก PGCs ในระยะนี้ว่า “circulating PGCs (cPGCs)” (Clawson and Domm, 1969) ในระยะนี้รูปร่างของ PGCs ค่อนข้างกลม ต่อมา PGCs จะมีการเคลื่อนที่ออกจากเส้นเลือด ซึ่งในขณะที่ PGCs กำลังเคลื่อนที่ออกจากเส้นเลือดจะมีการยื่นส่วนของ cytoplasmic process ที่มีลักษณะเป็นปุ่มแทรกระหว่างเซลล์เยื่อผนังเส้นเลือดออกไป (Ando and Fujimoto, 1983; Ukeshima et al., 1991) เมื่อ PGCs เคลื่อนที่ผ่านผนังของเส้นเลือดออกมาแล้วจะเคลื่อนที่ต่อโดยอาศัยการเคลื่อนที่ไปตามกลุ่มเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) บริเวณไตชุดที่สองของเอ็มบริโอ เรียก PGCs ในระยะนี้ว่า “tissue PGCs (tPGCs)” (Clawson and Domm, 1969) ในระยะนี้รูปร่างของ PGCs เปลี่ยนแปลงไปโดยพบลักษณะของ pseudopodia ยื่นออกมาเป็นการเคลื่อนที่แบบ amoeboid movement (Fujimoto et al., 1976; Lee et al., 1978b; Kuwana et al., 1986) ซึ่งการเคลื่อนที่ในระยะนี้เป็นการเคลื่อนที่ด้วยตัวของ PGCs เอง เรียกว่า “การเคลื่อนที่แบบ active (active migration)” ในการเคลื่อนที่แบบ active ของ tissue PGCs ไปตาม mesenchymal cells ของเอ็มบริโอจะสิ้นสุดการเคลื่อนที่เมื่อมาถึงบริเวณ genital ridges จากการศึกษาของ Ukeshima et al. (1987) พบว่าการเกิด genital ridges จะสัมพันธ์กับการฝังตัวของ PGCs ตรงตำแหน่งต่างๆ ของ genital ridges PGCs ที่มาฝังตัวบริเวณ genital ridges เรียบร้อยแล้ว เรียกว่า “gonadal PGCs (gPGCs)” (Clawson and Domm, 1969) นอกจากนี้การเจริญของเส้นเลือดบริเวณ genital ridges ยังมีความสำคัญต่อการฝังตัวและการรวมกลุ่มของ PGCs ที่บริเวณดังกล่าวด้วย (Perez-Aparicio et al., 1998)



ภาพที่ 6 แสดง PGCs ในระยะ passive และ active migration (A) ภาพจาก Scanning Electron Microscope (SEM) แสดง PGCs ในเส้นเลือดฝอย ระยะ passive migration (B) การเคลื่อนที่ของ PGCs ออกจากเซลล์บุผนังเส้นเลือดด้วยกระบวนการ diapedesis (C) การเคลื่อนที่ของ PGCs (หัวลูกศรสีดำ) บริเวณ genital ridges ระยะ active migration (ดัดแปลงจาก Gilbert, 2003) Bar = 100 μ m



ภาพที่ 7 การเคลื่อนที่ของ PGCs ของเอ็มบริโอไก่ในระยะเวลาต่างๆ (a) สังเกต PGCs ได้ยากในระยะเริ่มเกิด primitive streak (b) PGCs (จุดสีดำ) บริเวณ germinal crescent ระยะฟัก 18 ชั่วโมง (c) PGCs ที่เกาะกลุ่มตรงบริเวณ germinal crescent ระยะฟัก 23 ชั่วโมง (d) PGCs เคลื่อนที่เข้าไปในบริเวณ blood islands ระยะฟัก 33 ชั่วโมง (e) PGCs เคลื่อนที่แบบ passive migration ในระบบหมุนเวียนเลือด ระยะฟัก 48 ชั่วโมง (f) PGCs เคลื่อนที่แบบ active migration มาฝังตัวบริเวณ presumptive gonads ระยะฟัก 72 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Nieuwkoop and Sutasurya, 1979)

อย่างไรก็ตาม PGCs สามารถเคลื่อนที่ออกนอกบริเวณ presumptive gonads แล้วไปฝังตัวที่บริเวณอื่นที่ไม่ใช่ presumptive gonads ได้ จากการรายงานของ Nakamura et al. (1988) กล่าวว่า จำนวน PGCs ของเอ็มบริโอไก่ที่เคลื่อนที่ออกนอกบริเวณ presumptive gonads มีประมาณ 20% ของ PGCs ทั้งหมดที่ศึกษา และในจำนวนนี้ประมาณ 90% เป็น PGCs ที่พบบริเวณส่วนหัวของเอ็มบริโอในตำแหน่งใกล้เคียงกับ neural tube สำหรับการรายงานของ PGCs ที่เคลื่อนที่ของออกนอกบริเวณ presumptive gonads ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นนั้น สิริพิพลและคณะ (2547ก) พบ PGCs ตรงตำแหน่งใกล้เคียงกับ neural tube บริเวณส่วนหัวของเอ็มบริโอโดยใช้เทคนิค Mallory AZAN staining ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakamura et al. (1988) และจากการศึกษาของ Nakamura et al. (1991) พบว่า ในสถานะที่ไม่มี presumptive gonads PGCs ของเอ็มบริโอไก่สามารถเคลื่อนที่ไปรวมกันอยู่ตรงบริเวณส่วนหัวของเอ็มบริโอโดยเคลื่อนที่ออกจากผนังของเส้นเลือดฝอยแล้วแทรกตัวเข้าไปในชั้นมีเซนไคม์

สำหรับการศึกษาถึงผลของสารเคมีที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ส่วนใหญ่เป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในเอ็มบริโอไก่ พบว่า มีสารเคมีหลายกลุ่มที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs

ได้แก่ กลุ่มยาฆ่าแมลงเช่น DDT David (1975) พบว่า DDT มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ในระยะ passive และระยะ active migration ทำให้จำนวน PGCs ที่บริเวณ presumptive gonads ลดลง กลุ่มฮอร์โมน androgen สังเคราะห์ เช่น Cyproterone acetate (CA) ซึ่ง Swartz (1977) พบว่า presumptive gonads ของเอ็มบริโอที่ได้รับ CA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม มีจำนวนของ PGCs ที่บริเวณ presumptive gonads น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ CA กลุ่มโปรตีนที่ได้จากพืช เช่น lectin Concanavalin A (Con A) โดย Lee et al. (1978a) พบว่า Con A ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของ PGCs จากบริเวณ germinal crescent ไปยังบริเวณอื่นๆของเอ็มบริโอ สารกลุ่มอื่นๆเช่นกลุ่ม Polyaromatic hydrocarbons เช่น Polychlorinated bisphenyls (PCBs) ก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs การศึกษาของ Fang et al. (2002) พบว่า PCBs ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/กรัม ไซ ทำให้จำนวนของ PGCs ที่บริเวณ presumptive gonads ลดลงและที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัม/กรัม ไซ ทำให้เกิดการตายของ PGCs แบบ necrosis

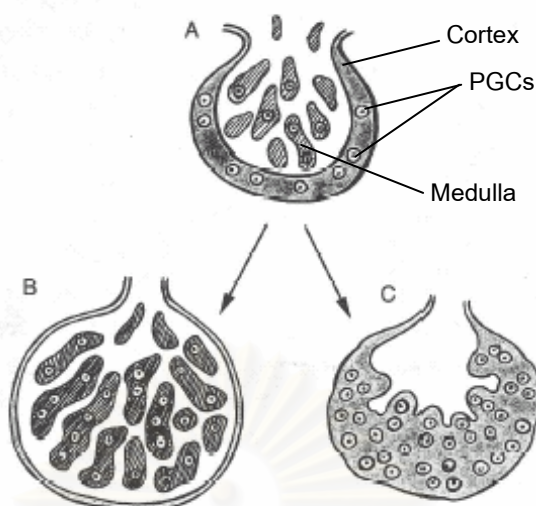
การกำหนดเพศและการเปลี่ยนแปลงลักษณะเพศ

ในเอ็มบริโอสัตว์ปีกการกำหนดเพศ (sex determination) และการเปลี่ยนแปลงลักษณะเพศ (sexual differentiation) ถูกควบคุมด้วยยีนบนโครโมโซมเพศ (genetic sex determination) โครโมโซมเพศของสัตว์ปีกมีจีโนไทป์ 2 แบบ คือ จีโนไทป์แบบ homogametic sex (ZZ) ในเพศผู้ และจีโนไทป์แบบ heterogametic sex (ZW) ในเพศเมีย (Clinton and Haines, 1999; Ellegren, 2001; Shimada, 2002; Smith and Sinclair, 2001; Nakagawa, 2004; Smith and Sinclair, 2004) อย่างไรก็ตามรายละเอียดของกลไกการกำหนดเพศด้วยยีนบนโครโมโซมเพศยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด Smith et al. (1999) พบว่า ยีน *DMRT1* (doublesex-and *mab-3*-related transcription factor 1 gene) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการสร้าง testes ในเอ็มบริโอเพศผู้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Raymond et al. (1999) พบว่า ยีนที่อยู่บนโครโมโซม Z ได้แก่ *DMRT1* มีการแสดงออกมากที่บริเวณ genital ridges ของเอ็มบริโอไก่เพศผู้ในระยะ gonadal differentiation สำหรับในเอ็มบริโอเพศเมียพบการแสดงออกของยีนที่อยู่บนโครโมโซม W มากที่บริเวณ genital ridges ของ embryonic gonad ก่อนที่จะเกิดกระบวนการ sexual differentiation ได้มีผู้ตั้งชื่อเรียกยีนดังกล่าวเป็น 3 ชื่อที่แตกต่างกันได้แก่ ยีน *PKCIW* (protein kinase C inhibitor W-linked gene หรือ *Wpkci* gene) (Hori et al., 2000;) ยีน *ASW* (Avian Sex-specific W-linked gene) (O'Neill et al., 2000; Ellegren, 2001; Pace and Brenner, 2003) และยีน *FET-1* (Female- Expressed Transcript 1 gene) (Reed and Sinclair,

2002) นอกจากนี้ Clinton (1997) ได้สรุปว่า การกำหนดเพศของเอ็มบริโอไก่เกิดขึ้นประมาณวันที่ 5-6 ของการเจริญ

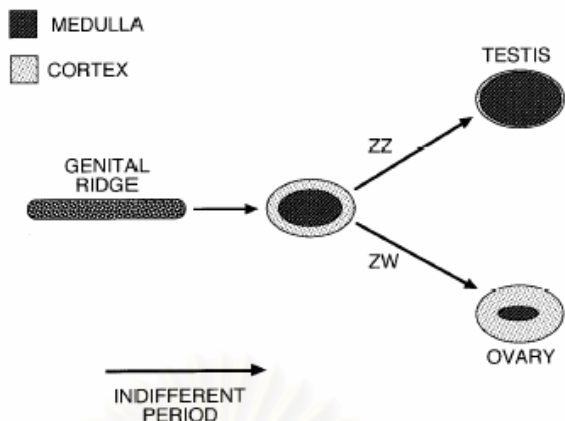
กระบวนการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

กระบวนการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadogenesis) ในเอ็มบริโอไก กระบวนการนี้มีขั้นตอนที่คล้ายกันกับกระบวนการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอไก่ โดยอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เจริญมาจาก intermediate mesoderm ที่มีลักษณะเป็นสันนูน เรียกว่า “genital ridge” ซึ่งอยู่บริเวณขอบด้านล่าง (ventral) ของไตชุดที่สอง (mesonephros) และเจริญร่วมกันกับไตชุดที่สอง (Browder et al., 1991) โดยกลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์นั้นเปลี่ยนแปลงมาจาก mesenchymal blastema ของ genital ridge ที่หนาตัวขึ้นมาจากสองบริเวณร่วมกันคือ บริเวณ coelomic epithelium และบริเวณ mesonephros (Matineau et al., 1997) การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอในระยะเวลาแรกนั้นไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ เรียกระยะนี้ว่า “indifferent stage” ต่อมาเกิดการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแต่ละเพศแยกกัน โดยเอ็มบริโอเพศผู้มีการเจริญของอัณฑะ ในขณะที่เอ็มบริโอเพศเมียมีการเจริญของรังไข่ กลุ่มเซลล์ร่างกายของเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียในระยะ indifferent stages จะมีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะคือ เป็นเซลล์ที่สังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenic cells) และเป็นเซลล์ค้ำจุน (supporting cells) ซึ่งเซลล์ทั้งสองจะเจริญล้อมรอบเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells) จากนั้นจึงแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเปลี่ยนแปลงเป็น primary sex cords (Romanoff, 1960)

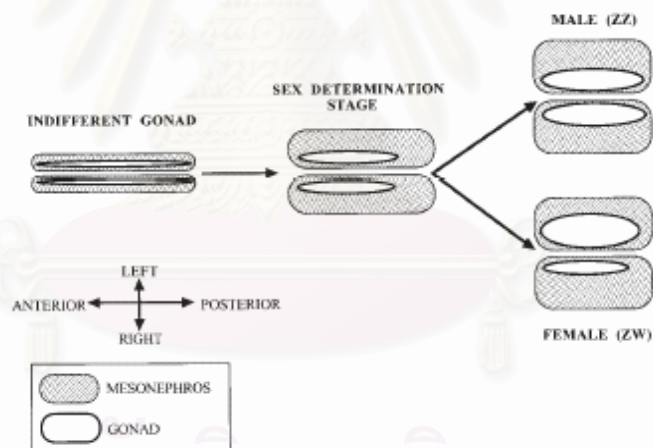


ภาพที่ 8 แสดง sexual differentiation ของ embryonic gonads (A) embryonic gonads ระยะ indifferent stage ประกอบด้วยชั้น cortex และ medulla ภายในมี PGCs (สีเทา) ที่พบทั้งในชั้น cortex และ medulla (B) male embryonic gonads ชั้น medulla ประกอบด้วย testicular cords ที่มี spermatogonia และ spermatocytes อยู่ภายใน และมี epithelium ของชั้น cortex บาง (C) female embryonic gonad มีชั้น cortex หนาและพบ oocytes อยู่บริเวณชั้น cortex (ดัดแปลงจาก McCarrey and Abbott, 1979)

การเจริญของ primary sex cords ได้แก่ cortical cord และ medullary cord ที่อยู่ใน embryonic ovaries และ embryonic testes มีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกันไปในแต่ละเพศ โดยทั่วไปแล้ว embryonic gonad ประกอบด้วยชั้น 2 ชั้นคือ ชั้นใน เรียกว่า "medulla" และชั้นนอก เรียกว่า "cortex" (Maraud et al., 1987) การเจริญของอวัยวะเกิดจาก medullary cord มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนออกมาแทนที่ชั้น cortex มากขึ้นส่งผลให้เหลือชั้น cortex ที่บางจากนั้นจึงมีการเจริญของ medullary cord ไปเป็น secondary sex cord เรียกว่า testicular cord ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนบนโครโมโซมเพศ ในขณะที่การเจริญของรังไข่เกิดจาก medullary cord บางส่วนสลายตัวเมื่อมีการเจริญของ secondary sex cord เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ชั้น cortex หนาขึ้น ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนบนโครโมโซมเพศเช่นกัน ดังนั้นการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอเพศผู้จัดเป็น "medullary development" สำหรับในเอ็มบริโอเพศเมียจัดเป็น "cortical development"



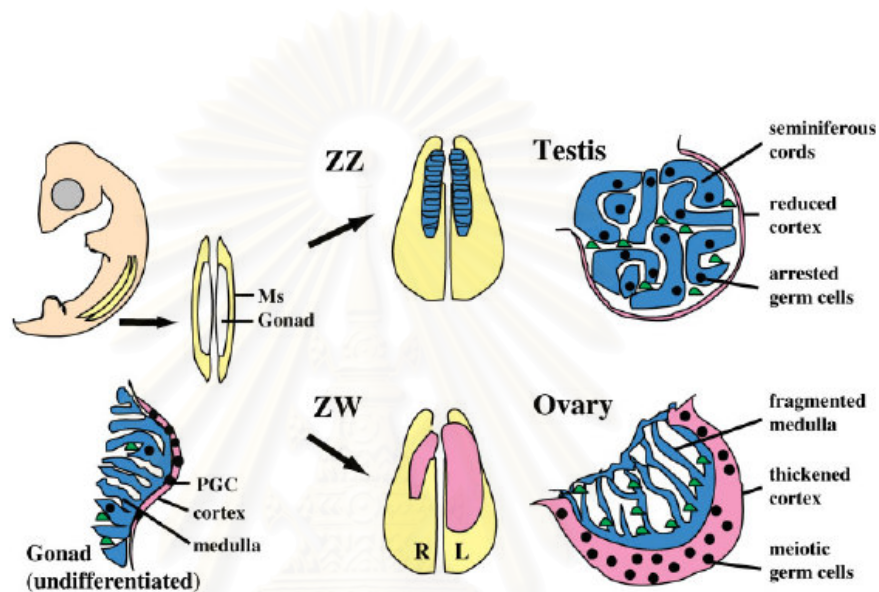
ภาพที่ 9 แสดงการเจริญของชั้น cortex และ medulla ของ embryonic gonad สังเกตชั้น cortex (สีเทา) และ medulla (สีดำ) ในระยะ indifferent stage ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศผู้ (อัณฑะ) และเพศเมีย (รังไข่) จากอิทธิพลของโครโมโซมเพศ (ZZ และ ZW) (ดัดแปลงจาก Clinton and Haines, 1999)



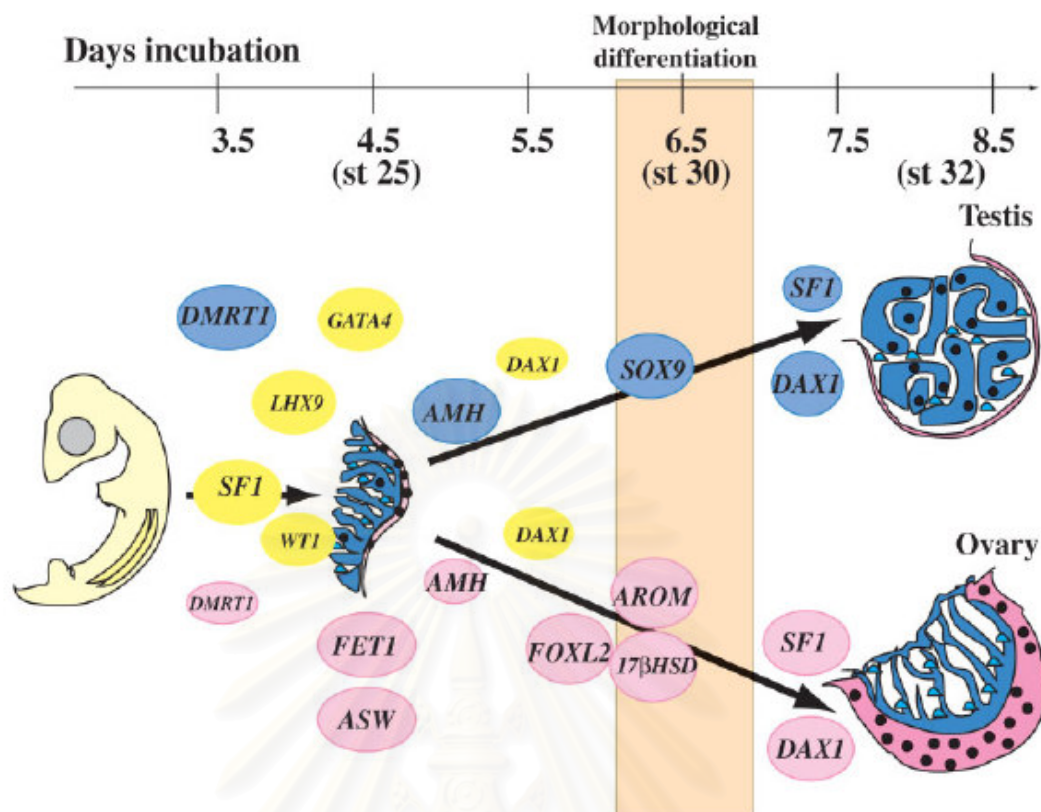
ภาพที่ 10 แสดงการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่บนไตชุดที่สอง สังเกตอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (สีขาว) ที่อยู่บนไตชุดที่สอง (สีเทา) ในระยะที่ไม่สามารถแยกเพศได้ (indifferent stage) และระยะที่มีการกำหนดเพศ (sex determination stage) ที่จะเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ZZ) และเพศเมีย (ZW) (ดัดแปลงจาก Clinton and Haines, 1999)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal differentiation) ในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียนั้นถูกควบคุมด้วยกลไกที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุล 2 กลไก คือ

- 1) กลไกการทำงานของยีนอย่างต่อเนื่องเป็นลำดับ (gene cascade) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ควบคุมให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฉพาะในอวัยวะหรือรังไข่
- 2) กลไกการกำหนดเพศ (sex-determining mechanism) ที่ควบคุมให้ embryonic gonads เจริญไปเป็นอวัยวะหรือรังไข่



ภาพที่ 11 กระบวนการ gonadal differentiation เริ่มต้นจากวันที่ 3.5 ของการเจริญ พบบริเวณที่จะเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges) มีลักษณะเป็นสันนูน (สีขาว) ซึ่งอยู่ทางด้าน ventral ของ mesonephros (สีเหลือง) ในระยะนี้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วยชั้น cortex (สีชมพู) และ medulla (สีน้ำเงิน) และไม่สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้จากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบ PGCs (สีดำ) อยู่ในชั้น cortex เป็นส่วนใหญ่ ต่อมาในช่วงวันที่ 5.5 ถึง 6.5 ของการเจริญ เริ่มที่จะแยกเพศของเอ็มบริโอได้จากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยในเอ็มบริโอเพศผู้ (ZZ) อวัยวะ (สีน้ำเงิน) ข้างซ้ายและขวามีขนาดเท่ากัน โครงสร้างภายในอวัยวะประกอบด้วย ชั้น medulla พบ seminiferous cord (สีน้ำเงิน) ที่มี germ cells (สีดำ) อยู่ภายใน และชั้น cortex (สีชมพู) ที่บาง ในขณะที่เอ็มบริโอเพศเมีย (ZW) เฉพาะรังไข่ข้างซ้ายเท่านั้นที่มีการเจริญแต่ข้างขวาสลายไป โครงสร้างภายในรังไข่ข้างซ้ายมีการเจริญของชั้น cortex ที่หนา (สีชมพู) และพบ germ cells (สีดำ) กระจายอยู่ทั่วไป ส่วนชั้น medulla (สีน้ำเงิน) มีการสร้างช่องว่าง (lacunae) เกิดขึ้น (ดัดแปลงจาก Smith and Sinclair, 2004)



ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่จำเพาะในการกำหนดเพศ สังกะตยีนที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์เฉพาะในอวัยวะของเอ็มบริโอเพศผู้ (วงกลมสีน้ำเงิน) ในรังไข่ของเอ็มบริโอเพศเมีย (วงกลมสีชมพู) และยีนที่มีการแสดงออกที่พบในเอ็มบริโอทั้งสองเพศ (วงกลมสีเหลือง) อย่างต่อเนื่องเป็นลำดับในช่วงที่เกิดกระบวนการ gonadal differentiation ขนาดของวงกลมแสดงถึงระดับความสัมพันธ์ของการแสดงออกของแต่ละยีนเมื่อเปรียบเทียบกันในเอ็มบริโอแต่ละเพศ พื้นที่สีส้มอ่อนแสดงวันแรกที่สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้จากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (ดัดแปลงจาก Smith and Sinclair, 2004) [st = stage]

นอกจากนี้ฮอร์โมนเอสโตรเจนยังมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ gonadal differentiation (Woods and Erton, 1978; Gasc, 1980) โดยสามารถชักนำให้ embryonic gonad เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือรังไข่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของฮอร์โมนที่ได้รับและ endocrine disruptors เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (synthetic estrogen) สามารถมีอิทธิพลรบกวนกระบวนการ gonadal differentiation ได้ (Narbaitz and Adler, 1966; Scheib, 1983; Stevens, 1997)

ได้มีการทดลองโดยให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์แก่เอ็มบริโอไก่เพศผู้ในระยะ sexual differentiation พบว่า embryonic gonads ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิดลักษณะร่วมของอวัยวะและรังไข่ (ovotestis) (Kozelka and Gallagher, 1934; Willier et al., 1935; Willier et al., 1937) นอกจากนี้ยังพบว่า DDT และ PCBs สามารถชักนำให้เกิด ovotestis ในเอ็มบริโอนกกระทาพันธุ์แคลิฟอร์เนีย (California quail) และเอ็มบริโอของนกนางนวล (Common terns) (Fry and Toone, 1981; Hart et al., 2003) ซึ่งลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ ovotestis ประกอบด้วยชั้น cortex หนาและพบ germ cells ที่เข้าสู่ระยะ oocyte ในชั้น cortex ซึ่งเป็นลักษณะของ embryonic gonad เพศเมียแต่ในชั้น medulla ยังคงพบ testicular cords อยู่ (Teng and Teng, 1979; Scheib, 1983, Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Shibuya et al., 2004; Shibuya et al., 2005) การศึกษาในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้พบว่า เกิดลักษณะ ovotestis ที่ embryonic gonad ข้างซ้ายภายหลังจากการได้รับ diethylstilbestrol (DES) ในวันที่ 4 และวันที่ 3 ของการฟัก (Perrin et al., 1995; Berg et al., 1999) นอกจากนี้มีการรายงานว่า *o,p'*-DDT และ ethynylestradiol (EE₂) สามารถชักนำให้ embryonic gonads เพศผู้เกิด ovotestis ได้ (Berg et al., 1998; Berg et al., 1999)

มีการศึกษาเรื่อง gonadal differentiation ในเอ็มบริโอไก่เพศเมียด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การนำเอา embryonic testes มา graft ที่บริเวณ embryonic ovary ของเอ็มบริโอเพศเมียที่เป็นเจ้าบ้าน พบว่า embryonic testes ที่นำมา graft มีผลทำให้ embryonic ovary เกิดการสลายตัว มีการเปลี่ยนแปลงจาก embryonic ovary เป็น embryonic testis ที่มีการสร้าง interstitial cells (Leydig's cell) ได้ (Groenendijk-Huijber, 1960; Rashedi et al., 1983; Maraud and Vergnaud, 1986; Rashedi and Maraud; 1987; Maraud et al., 1990; Rashedi et al., 1990) การให้สารเคมีเช่น 1-methyl-androstendion (Wartenberg et al., 1992) Fadrozole (Wartenberg et al., 1992; Burke and Henry, 1999; Smith et al., 2003) ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aromatase (aromatase inhibitor) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนฮอร์โมนแอนโดรเจนไปเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนพบว่า สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) ของ embryonic gonad จากเพศเมียเป็นเพศผู้ได้ (Elbrecht and Smith, 1992) สำหรับการศึกษานี้ในเอ็มบริโอ

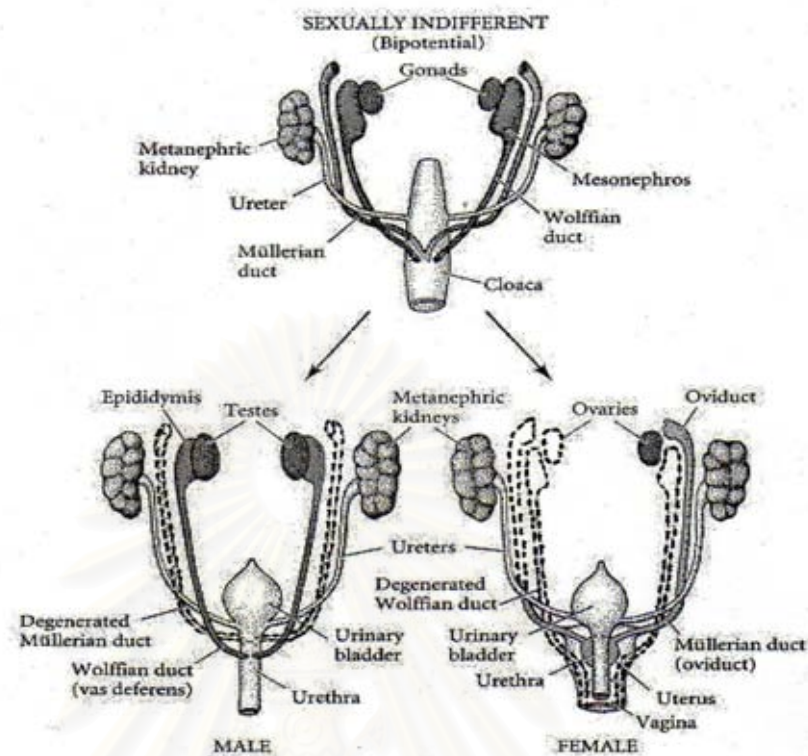
นกกระทาญี่ปุ่นเพศเมีย Scheib et al. (1984) รายงานว่า Tamoxifen (antiestrogen) มีผลไปยับยั้งการแบ่งเซลล์บริเวณ germinal epithelium และยับยั้งการเกิดชั้น cortex ของ embryonic gonad ข้างซ้ายแต่กระตุ้นให้มีการเจริญในชั้น medulla ของ embryonic gonad ทั้งข้างซ้ายและขวา และยังมีสารเคมีที่ไม่ใช่กลุ่มของฮอร์โมนสังเคราะห์ (nonsynthetic hormones) ที่สามารถส่งผลกระทบต่อกระบวนการ gonadal development ในเอ็มบริโอได้แก่ Carbaryl (Swartz, 1985) และ PCBs (Zhang et al., 2002) สำหรับในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น ได้แก่ Busulfan (Hallett and Wentworth, 1991) และ Nonylphenol (Nishijima et al., 2003)

ผลของ endogenous estrogen หรือ endocrine disruptors ที่ออกฤทธิ์คล้ายกันกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีต่อกระบวนการ gonadal development นั้น มีการทำงานโดยการจับกับตัวรับต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptor ER) มีการศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอไก่เพศเมียพบปริมาณของ ER ชนิดอัลฟา (α) มากตรงบริเวณ epithelium ของชั้น cortex ของ embryonic gonad ข้างซ้ายสามารถพบ ER α ได้ก่อนที่จะเกิดกระบวนการ gonadal differentiation ในขณะที่บริเวณ epithelium ของ embryonic gonad เพศผู้วันที่ 4.5 และ 12.5 ของการฟักพบ ER α ในปริมาณน้อย (Smith et al., 1997; Nakabayashi et al., 1998) Smith et al. (1997) รายงานว่า พบ mRNA ของ ER α ที่บริเวณ genital ridge ของเอ็มบริโอไก่เพศเมียในวันที่ 3.5 ของการฟัก ในขณะที่พบ ER ชนิดเบต้า (β) บริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และสมองของนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย (Lakaye et al., 1998; Foidart et al., 1999) แต่ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นยังไม่มีรายงานในเรื่องดังกล่าว

ฮอร์โมนเอสโตรเจนถูกเปลี่ยนแปลงมาจากฮอร์โมนแอนโดรเจนโดยเอนไซม์ "aromatase (CYP19, P450arom)" (Rumsby, 1997; Bruggeman et al., 2002) มีรายงานที่พบ mRNA ของ aromatase และ aromatase activity บริเวณ embryonic gonad ของเอ็มบริโอไก่เพศเมียในช่วงวันที่ 6-6.5 ของการฟักซึ่งเป็นช่วงที่เกิด sexual differentiation ในขณะที่เอ็มบริโอไก่เพศผู้ไม่พบการแสดงออกของ aromatase gene (Smith et al., 1997; Villalpando et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Clinton and Haines (1999) ที่ตรวจพบฮอร์โมนเอสโตรเจนบริเวณ embryonic gonad ของเอ็มบริโอไก่เพศเมียในวันที่ 6.5 ของการฟัก

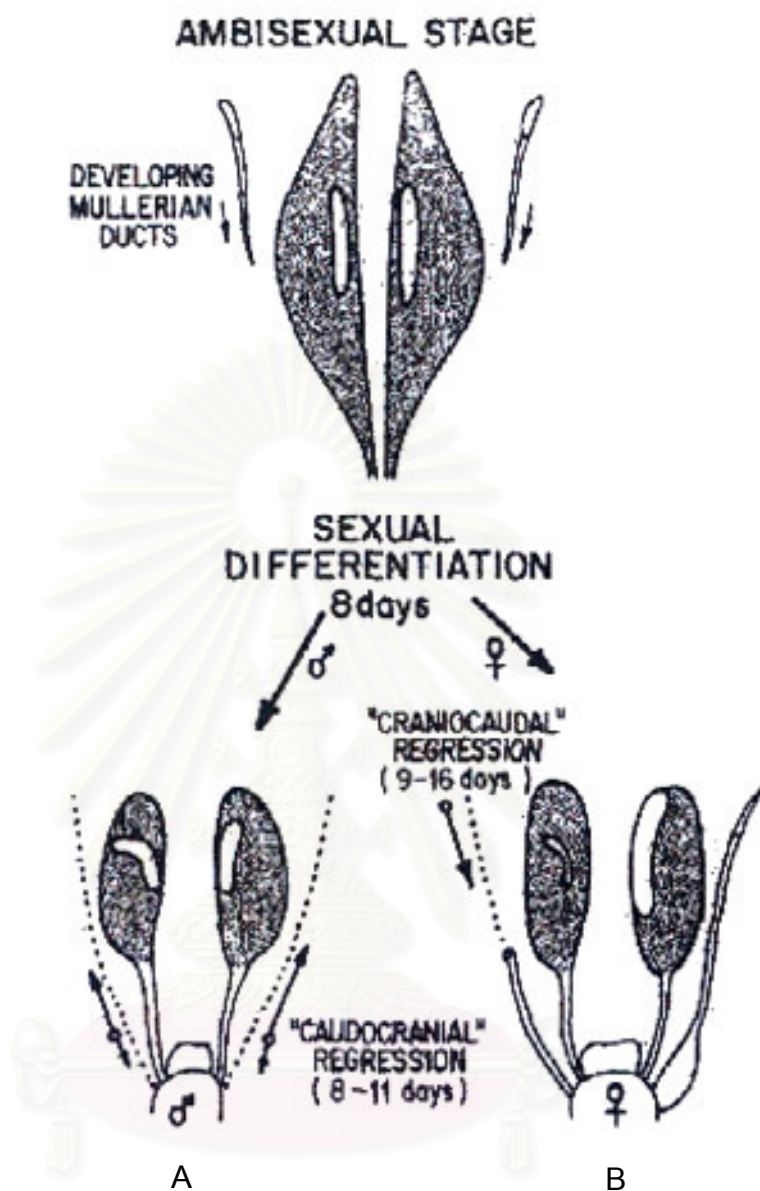
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของ endocrine disruptors อื่นๆที่มีต่อการสลายตัวและการคงอยู่ของ embryonic accessory ducts จากการทดลองโดยให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ในระยะ sexual differentiation แก่เอ็มบริโอไก่พบว่า เอ็มบริโอเพศผู้ยังมีการคงอยู่ของ Müllerian duct ทั้งสองข้างซึ่งโดยปกติที่อดดังกล่าวจะต้องสลายไปในเอ็มบริโอเพศผู้ และในเอ็มบริโอเพศเมียที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์พบว่า มีการคงอยู่ของ Müllerian duct ข้าง

ขวาซึ่งโดยปกติจะต้องสลายไปเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบก้อนเนื้อ (cyst) อยู่บริเวณ Müllerian duct (Willier et al., 1935; Willier et al., 1937; Teng and Teng, 1979; Berg, 1999) ในการศึกษากลไกการสลายตัว (regression) ของ embryonic duct โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสลายตัวของ Müllerian duct (Müllerian duct regression) ในเอ็มบริโอไก่นั้นได้มีการรายงานว่ามีสารเคมีที่ชื่อ MIS (Müllerian Inhibiting Substance) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ transforming growth factor- β family (Hutson et al., 1981; Teng, 1987) ที่ถูกสร้างขึ้นจาก female gonads ส่งผลให้เกิดการสลายตัวเฉพาะ Müllerian duct ข้างขวา ในขณะที่ Müllerian duct ข้างซ้ายยังคงอยู่เนื่องจากมีอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สร้างจาก female gonad มีผลไปยับยั้งการทำงานของ MIS ที่ Müllerian duct ข้างซ้ายทำให้ Müllerian duct ข้างซ้ายไม่สลายไป (Hutson et al., 1981) จากการศึกษาของ Hutson et al. (1985) พบว่า การเกิด Müllerian duct regression ยังเกิดได้จากปัจจัยของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในธรรมชาติ เช่น Norethindrone (NET) Aminoglutethimide (AG) และ 4-hydroxyandrostenedione (4OHA) ในขณะที่ Teng (1990) รายงานว่า Diethylstilbestrol (DES) มีผลไปยับยั้งการเกิด Müllerian duct regression ในเอ็มบริโอไก่ทำให้พบ Müllerian duct ข้างขวาในเอ็มบริโอเพศเมียและพบ Müllerian duct ทั้งข้างซ้ายและขวาในเอ็มบริโอเพศผู้ สำหรับกลไกการสลายตัวของ Müllerian duct นั้นเกิดจาก MIS ที่ถูกสร้างจาก embryonic ovary จะไปจับกับ MIS receptor ที่อยู่บน Müllerian-mesenchymal cells (Teng, 1990; Tsuji et al., 1992) แล้วส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์และการสลายตัวของ extracellular material (ECM) บริเวณ basement membrane และ periductal region ของ Müllerian duct (Hayashi et al., 1982; Trelstad et al., 1982; Ikawa et al., 1984) ซึ่งการสลายตัวของ ECM บริเวณดังกล่าวเกิดจากเอ็นไซม์ในกลุ่มของ ECM degrading enzyme ที่ชื่อ "matrix metalloproteinase enzyme (MMP)" (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1999; Vu and Werb, 2000) จากการศึกษาของ Ha et al. (2004) พบว่า การแสดงออกของ mRNA ของ MMP-2 บริเวณ Müllerian duct ข้างขวาของเอ็มบริโอไก่เพศเมียเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 15 และวันที่ 18 ของการฟักจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR



ภาพที่ 13 แสดงการสลายตัวของ accessory embryonic ducts (A) ระยะที่ไม่ยังไม่มี การสลายตัวของ accessory embryonic ducts (indifferent stage) (B) การสลายตัวของ Müllerian ducts ทั้งสองข้างในเพศผู้ (C) การสลายตัวของ Wolffian ducts ทั้งสองข้างและการสลายตัวของ Müllerian ducts ขวา และ embryonic ovary ข้างขวา ในเพศเมีย (ดัดแปลงจาก Gilbert, 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 14 แสดงการเจริญของ Müllerian duct ของเอ็มบริโอในระยะเวลาที่ยังไม่กำหนดเพศ และรูปแบบการสลายตัวของ Müllerian duct ในเอ็มบริโอเพศผู้แบบ caudocranial regression (A) และการสลายตัวของ Müllerian duct ในเอ็มบริโอเพศเมียแบบ craniocaudal regression (B) (ดัดแปลงจาก Hutson et al., 1985)

สารเคมีที่เป็น endocrine disruptors (EDs) ที่ออกฤทธิ์คล้ายกันกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีผลกระทบต่อกระบวนการ gonadal development นอกจากจะเป็น EDs ในกลุ่มฮอร์โมนสังเคราะห์หรือสารสังเคราะห์แล้ว ยังมี EDs ที่เป็นสารเคมีที่ออกฤทธิ์คล้ายกันกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่พบในพืช (phytoestrogen) ซึ่งกลุ่ม isoflavones เป็นกลุ่มที่นิยมนำมาศึกษาทางด้านพิษวิทยาการสืบพันธุ์ (reproductive toxicology) และตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้ที่ใช้ศึกษากันมากคือ เจนิสเตอิน (Genistein) (Setchell, 1998; Kanno et al., 2002; King, 2002)

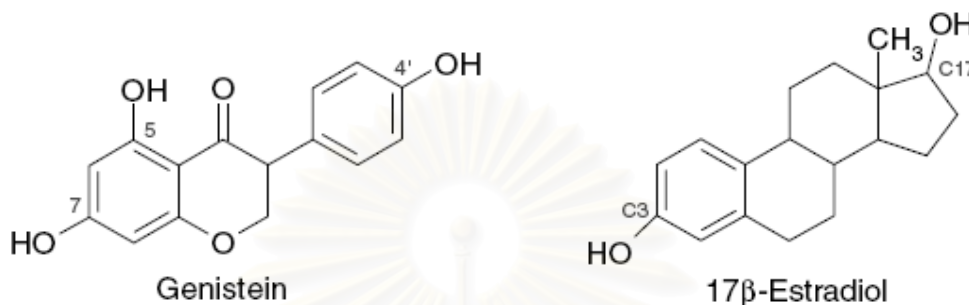
เจนิสเตอิน

เจนิสเตอิน (Genistein: 4',5,7-trihydroxyisoflavone) เป็นสารเคมีในกลุ่ม isoflavones ที่พบมากในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) มีการรายงานว่า พืชตระกูลนี้สังเคราะห์ genistein ขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากสัตว์กินพืช รา และแบคทีเรียที่ก่อโรค นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยทำให้เกิดกระบวนการ symbiosis ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียที่เรี่ยกับปมของรากพืชตระกูลถั่ว (Koes et al., 1994) มักพบ genistein ในรูปของ inactive glucoside หรือ aglycone (Axelson et al., 1982; Eldridge and Kwolek, 1983; Setchell, 1998) โดย genistein ในรูป inactive glucoside ถูกเปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้นที่ชื่อว่า "biochanin A" ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ intestinal glucosidase ที่ถูกสร้างขึ้นจาก gut intestinal microflora ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lampe et al., 1998; Rowland et al., 2000) ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ metabolism จะได้สารที่ชื่อว่า *p*-Ethyphenol (Shutt, 1976; Setchell, 1998)

โครงสร้างและการทำงานของเจนิสเตอิน

Genistein มีโครงสร้างทางเคมีบางส่วนที่คล้ายกันกับฮอร์โมน 17β -Estradiol ซึ่งเป็นเอสโตรเจนที่มีศักยภาพสูง ได้แก่ การมีวงแหวนของฟีนอล (phenolic rings) และระยะห่างระหว่างหมู่ 4' กับหมู่ 7-hydroxyl group เป็นต้น (Dixon and Ferreira, 2002) จากลักษณะโครงสร้างทางเคมีดังกล่าวทำให้ genistein สามารถจับกับ estrogen receptor (ER) ตรงบริเวณ ligand-binding domain (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999) และ sex hormone binding proteins (SHBP) แล้วออกฤทธิ์เป็นตัวเสริมฤทธิ์ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen agonist) หรือ ตัวต้านฤทธิ์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen antagonist) ได้ (Setchell, 1998) มีรายงานว่า genistein สามารถจับได้ทั้งกับ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ แต่มักที่จะจับกับ $ER\beta$ มากกว่า $ER\alpha$ (Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1998; Barnes et al., 2000) และยังมีรายงานว่า เจนิสเตอินสามารถจับกับ estrogen related receptor (ERR) เช่น $ERR\alpha$ $ERR\beta$ และ $ERR\gamma$ ได้อีกด้วย (Suetsugu

et al., 2003) และเมื่อ genistein จับกับ ER แล้วจะมีผลไปรบกวนการทำงานของระบบอื่นๆ ที่มีการกระจายตัวของ ER แตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ โดยเฉพาะ ER β ที่พบมากในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ รังไข่ อัณฑะ เต้านม และต่อมลูกหมาก (Brandenberger et al., 1997; Setchell, 1999)

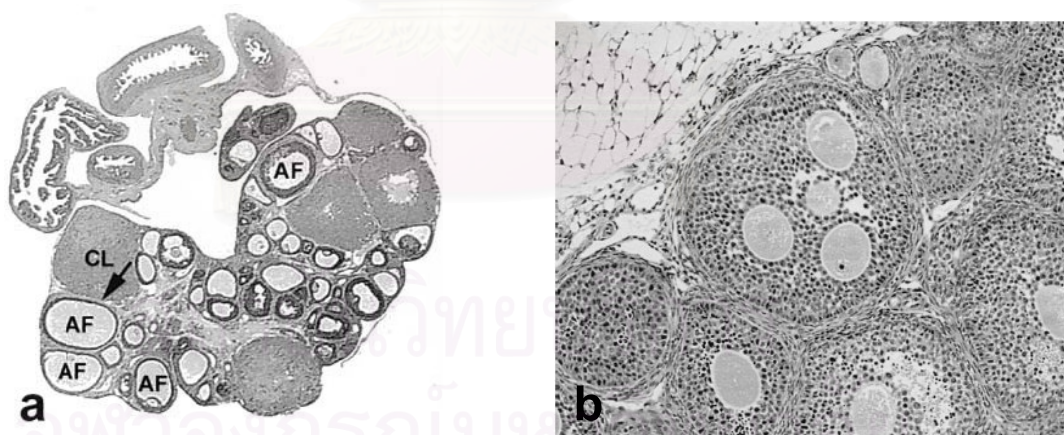


ภาพที่ 15 เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีระหว่าง Genistein กับ 17 β -Estradiol (ดัดแปลงจาก Shaw and McCully, 2002)

ผลของเจนิสเทอินต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

จากการศึกษาของ Awoniyi et al. (1998) พบว่า ในหนูแรทเพศเมียที่ได้รับ genistein ปริมาณ 50 $\mu\text{g}/\text{d}$ ในวันที่ 21 ของการตั้งครรภ์มีน้ำหนักของรังไข่ มดลูก และระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนใน plasma ลดลง Casanova et al. (1999) รายงานว่า genistein และ daidzein เป็นตัวเสริมการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีความสามารถในการจับกับ estrogen receptor ทั้งชนิด α และ β แต่ genistein จะมีศักยภาพสูงกว่า daidzein ในการส่งผลให้อัตราส่วนของน้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lewis et al. (2003) ที่กล่าวว่า หนูแรทเพศเมียที่ได้รับ genistein ปริมาณ 40 mg/kg มีน้ำหนักมดลูกเพิ่มขึ้นในวันที่ 22 ของระยะหลังคลอด นอกจากนี้ยังพบว่า genistein สามารถส่งผลกระทบต่อ sexual differentiation และ sexual development ของหนูแรทภายหลังจากที่ได้รับ genistein ในระยะก่อนคลอด Delclos et al. (2001) พบว่า ในหนูแรทเพศเมียที่ได้รับ genistein ที่ระดับความเข้มข้น 250 ถึง 1,250 ppm. ทำให้ต่อมอัณฑะมีการแบ่งเซลล์ของท่อผลิตน้ำนมเพิ่มมากขึ้น (ductal-alveolar hyperplasia) และเกิดความผิดปกติของการเจริญของกลุ่มเซลล์ในช่องคลอดที่ระดับความเข้มข้น 625 และ 1,250 ppm. และในรังไข่เกิดความผิดปกติโดยมีฟอลลิเคิลที่ฝ่อ (atretic follicles) เกิดเป็นช่องว่างจำนวนหลายฟอลลิเคิล (ovarian antral follicles) ที่ระดับความเข้มข้น 1,250 ppm. ทำให้หนูแรทเพศผู้มีการบวมนองการ spermatogenesis เกิดช้ากว่าปกติและพบ

ความผิดปกติของอสุจิใน epididymis ที่ระดับความเข้มข้น 625 และ 1,250 ppm. แต่สำหรับหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับ genistein ปริมาณ 250 และ 1,000 mg/kg diet ไม่มีผลกระทบต่อน้ำหนัก testes และรูปร่างของ testes (Fritz et al., 2003) สำหรับการศึกษาในหนูเมาส์ Cline et al. (2004) พบว่า genistein ในปริมาณ 40 mg/kg body weight มีผลทำให้มดลูกขยายขนาดและ epithelial cells ของผนังมดลูกชั้นในสูงขึ้น และในหนูเมาส์เพศผู้ที่ได้รับ genistein ปริมาณ 5 mg/kg มีผลทำให้ปริมาณของอสุจิลดลง (Lee et al., 2004) จากการศึกษาของ Wendy et al. (2000) พบว่า การได้รับ genistein ในปริมาณ 50,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 ของระยะคลอดใหม่ทำให้หนูเมาส์มีจำนวน oocytes เพิ่มขึ้นหลาย oocytes ต่อ 1 follicle (multi-oocyte follicle) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nagao et al. (2001) ที่พบว่า ภายในรังไข่ของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับ genistein ปริมาณ 50 mg/kg ในระยะหลังคลอดวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 มีจำนวน oocytes เพิ่มขึ้น 2-3 oocytes ต่อ 1 follicle (polyovular follicles) และมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติในเพศเมีย ซึ่งลักษณะของ multi-oocyte follicles หรือ polyovular follicles เกิดขึ้นจากกลไกการทำงานของ genistein ที่จับกับ ER ชนิด β เนื่องจากพบว่า หนูเมาส์ที่นำเอาส่วนของยีนที่สังเคราะห์ ER β ออกไป (gene knockout) ไม่พบลักษณะดังกล่าว (Jefferson et al., 2002)



ภาพที่ 16 แสดง ovarian antral follicles และ multi-oocyte follicle (a) สังเกตลักษณะ ovarian antral follicles ที่มี atretic follicles (AF) (ดัดแปลงจาก Delclos et al., 2001) และ (b) ลักษณะ multi-oocyte follicle (ดัดแปลงจาก Wendy et al., 2000)

ผลของเจนิสเตอินต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ปีก

นักกระทำพันธุ์แคลิฟอร์เนียเพศเมียที่กินอาหารที่มีส่วนผสมของ formononetin (สารตั้งต้นของ daidzein) และ genistein จากพืชเมื่อผ่านกระบวนการย่อยแล้วสารทั้งสองตัวนี้มีผลไปยับยั้งการทำงานของระบบสืบพันธุ์และทำให้จำนวนไข่ที่ตัวเมียวางไข่ในแต่ละครั้งลดลง (Leopold et al., 1976) และไก่เพศผู้ที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 5 10 และ 50 μM มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์และการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจาก Leydig's cell (Opalka et al., 2004)

เห็นได้ว่าการศึกษาผล genistein ต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกทั้งในระยะเอ็มบริโอและระยะตัวเต็มวัยมีน้อยกว่าการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

1. แผนการทดลอง

ไข่นกกระทาที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นไข่นกกระทาญี่ปุ่นจากเสรีฟาร์ม จังหวัดนครปฐม โดยเลือกระยะที่จะเก็บเอ็มบริโอเพื่อนำมาติดตามผล รวมทั้งวิธีการตรวจสอบตั้งแผนงานสำหรับแต่ละการทดลองดังต่อไปนี้

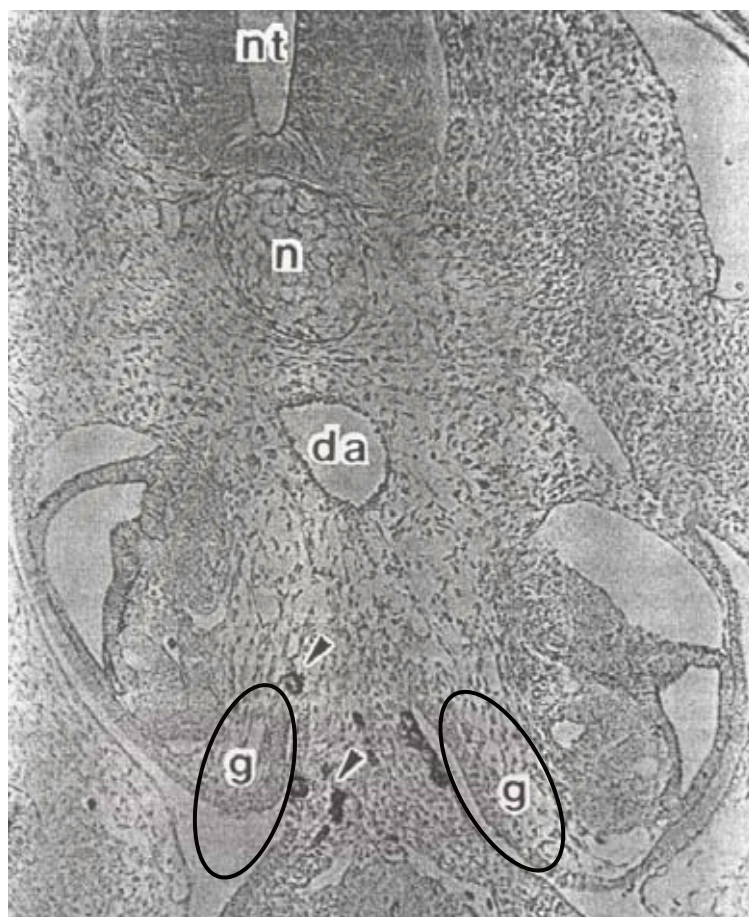
การทดลองที่ 1

ศึกษาผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells: PGCs migration) มาฝังตัวที่ genital ridges ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นภายหลังจากการได้รับ genistein โดยการฉีดโดยตรงในไข่ (*in ovo*) ใช้ไข่นกกระทาญี่ปุ่นที่ยังไม่ได้นำเข้าฟัก (วันที่ 0) และ แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

- 1.1 กลุ่มควบคุมฉีดตัวทำละลายของ genistein ได้แก่ 10% DMSO + Corn oil สัดส่วน 1 : 10
- 1.2 กลุ่มทดลองฉีด genistein ที่ละลายใน 10% DMSO + Corn oil ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่
- 1.3 กลุ่มทดลองฉีด genistein ที่ละลายใน 10% DMSO + Corn oil ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่

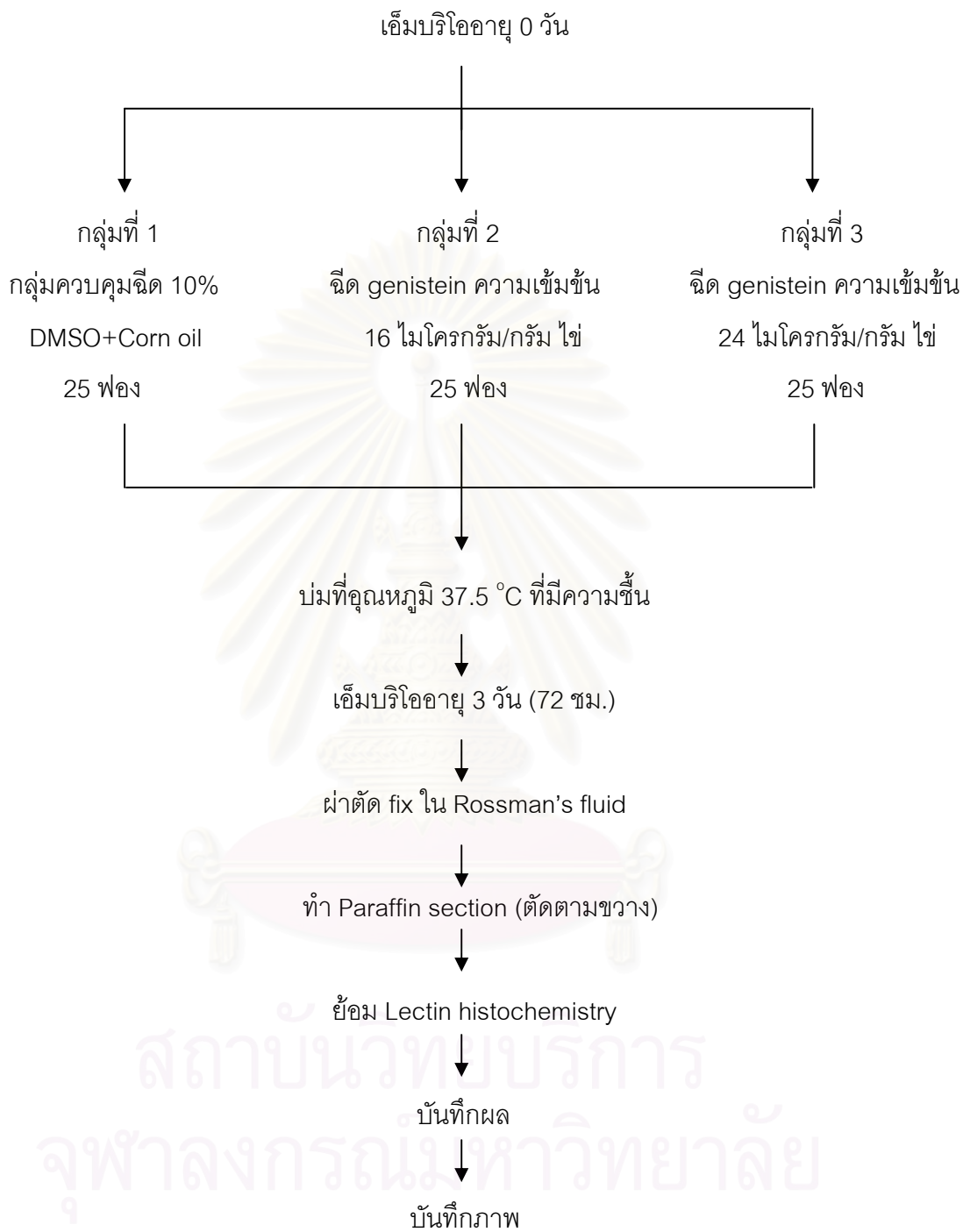
หลังจากนั้นนำไข่นกกระทาบรรจุลงในเครื่องพลิกไข่อัตโนมัติ นำมาฟักใน water-jacketed incubator จนเอ็มบริโอมีอายุครบ 3 วัน (72 ชม.) (Yoshinaga et al., 1992) แล้วจึงนำเอ็มบริโอมาศึกษาการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (PGCs) มาฝังตัวใน genital ridges โดยนำเอ็มบริโอมาผ่านขบวนการทางฮิสโตเทคนิคแล้วย้อมด้วย WFA lectin (*Wisteria floribunda* Agglutinin) ที่มีความจำเพาะต่อ PGCs ของนกกระทาญี่ปุ่น วัดผลการทดลองในเชิงปริมาณด้วยการนับจำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges (ดังรูป) ซึ่งมีวิธีการนับโดย เอ็มบริโอ 1 ตัวต่อ section ที่จะนับทั้งหมด 10 section (เว้นระยะห่างทุกๆ 2 section เพื่อไม่ให้ทับซ้ำ นับไปจนครบ 10 section, Song et al., 2005) แล้วบันทึกภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์บันทึกผลการทดลองของจำนวน PGCs ที่นับได้ทั้ง 3 กลุ่ม และคำนวณค่าดัชนีความเป็นหมัน (Index of Sterility : IS) จากสูตร $IS = (N - X) / N$ โดย N = จำนวน PGCs ของเอ็มบริโอกลุ่ม

ควบคุม และ X = จำนวน PGCs ของเอ็มบริโอกลุ่มทดลอง (Aige-Gil and Simkiss, 1991) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ one-way ANOVA วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS



ภาพที่ 17 ภาพตัดขวางเอ็มบริโอระยะ 72 ชั่วโมงแสดงบริเวณ genital ridge (วงรี) ที่ทำการนับจำนวน PGCs ; nt = neural tube, n = notochord, da = dorsal aorta และ g = genital ridges (ดัดแปลงจาก Yoshinaga, 1992)

แผนภูมิการทดลองที่ 1



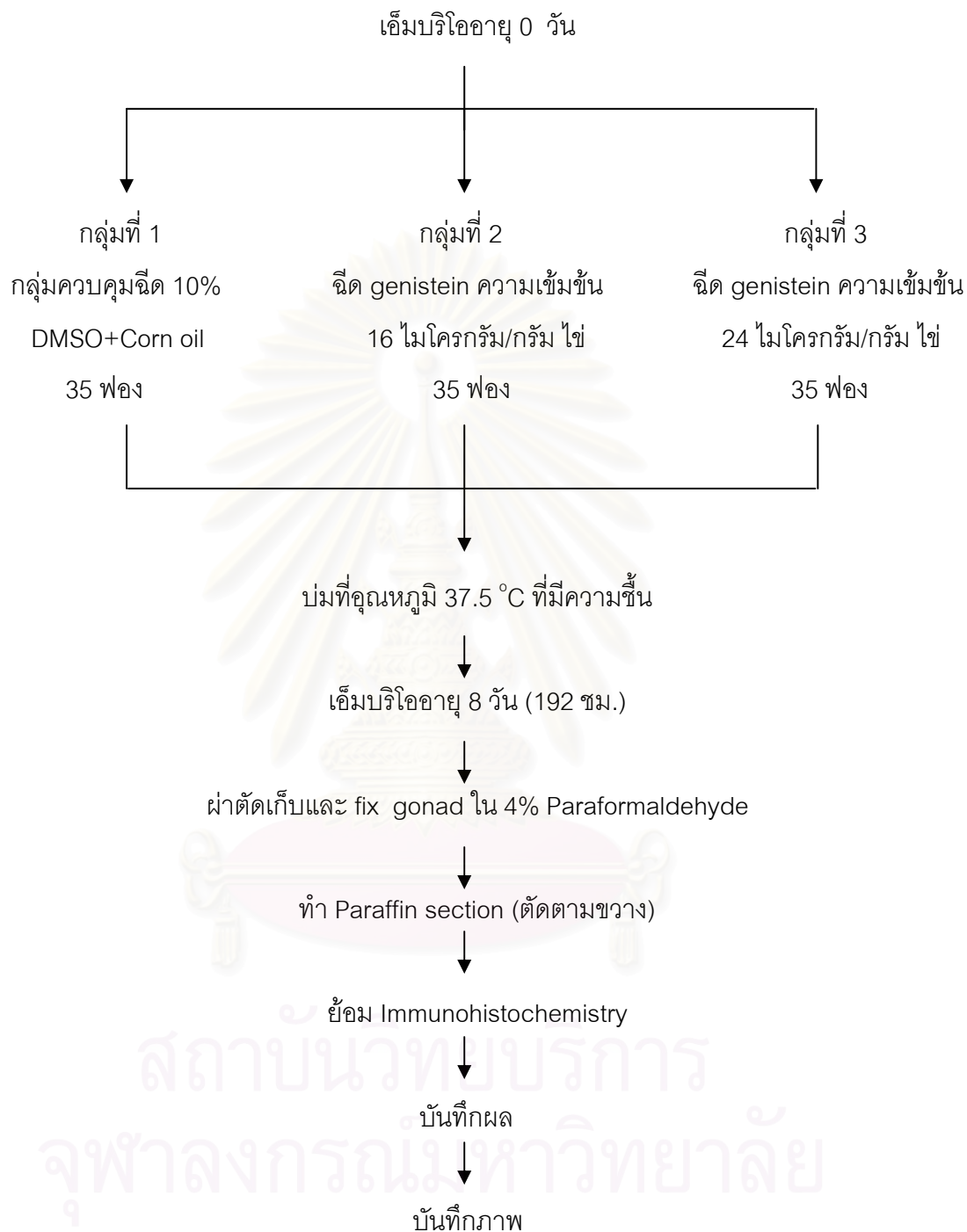
สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2

ศึกษาผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอในกระต่ายญี่ปุ่นเพศผู้หลังจากการได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*)

โดยใช้ไข่นกกระต่ายญี่ปุ่นที่ยังไม่ได้เข้าฟัก (วันที่ 0) แล้วแบ่งกลุ่มการทดลองเพื่อฉีด genistein และดำเนินการฟักเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จนกระทั่งเอ็มบริโอมีอายุฟัก 8 วัน (Andrews et al., 1997) แล้วจึงนำเอ็มบริโอมาผ่าตัด นำมา fix เพื่อผ่านขบวนการทางฮิสโตเทคนิค และนำมาย้อมด้วยเทคนิคทาง immunohistochemistry (ดังแผนภูมิการทดลอง) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของ estrogen receptor (ER) ในเซลล์บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ (male left gonad) วัดผลการทดลองในเชิงปริมาณด้วยการนับจำนวนเซลล์ที่มี estrogen receptor (ER-immunostained cells) ที่อยู่บริเวณ germinal epithelium (González-Morán, 2005) โดยนับหมดทุก section ในแต่ละสไลด์จนครบทุกสไลด์ (เว้นระยะห่างทุกๆ 2 section เพื่อไม่ให้ทับซ้ำและนับจำนวน ER-immunostained cells ที่พบทุกเซลล์ที่อยู่โดยรอบเส้นรอบวงของบริเวณ germinal epithelium) นำข้อมูลที่นับได้ทั้ง 3 กลุ่มมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ one-way ANOVA วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

แผนภูมิการทดลองที่ 2



การทดลองที่ 3

ศึกษาผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอในกระต่ายขุนเพศผู้และเพศเมียภายหลังจากการได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*)

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ดำเนินการฉีด genistein โดยใช้ไข่นกกระต่ายขุนที่ยังไม่ได้เข้าฟัก (วันที่ 0) และดำเนินการฟักเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จนกระทั่งเอ็มบริโอมีอายุฟักครบ 15 วัน (Berg et al., 1999) แล้วจึงนำเอ็มบริโอมาผ่าตัดเพื่อศึกษาสภาพทางกายวิภาคและการศึกษาทางเนื้อเยื่อ โดยวัดผลการทดลองในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ดังต่อไปนี้

3.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค (anatomical alteration) ของท่อ Müllerian ducts (MDs) ทั้งในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมีย โดยสังเกตลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้น ดังนี้

- เอ็มบริโอเพศผู้ : สังเกตการคงอยู่อย่างสมบูรณ์หรือบางส่วนของ MDs ทั้งสองข้าง (completely or partially persistent of left and right MDs)
- เอ็มบริโอเพศเมีย : สังเกตความผิดปกติของ MD ข้างขวา เช่น ความยาวที่เพิ่มขึ้น (ยาวกว่า 3 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม), การปรากฏของต่อมสร้างเปลือกไข่ (shell gland) ที่ MDs ข้างขวา

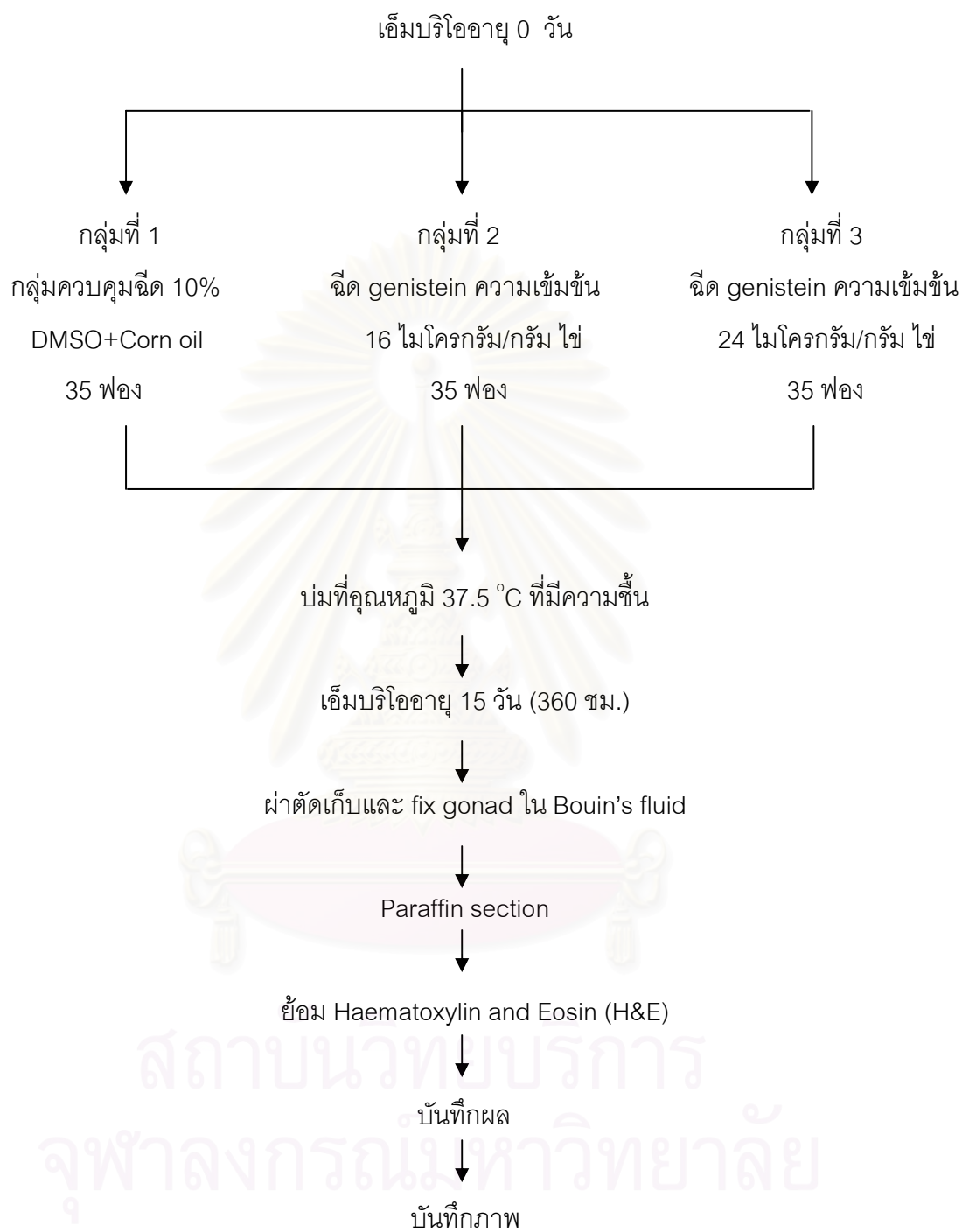
3.2 การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ (histological alteration) ของอวัยวะข้างซ้าย (left testis) ในเอ็มบริโอเพศผู้ โดยสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะที่เกิดโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovotestis) จากลักษณะดังต่อไปนี้

- การมีชั้น cortex ที่หนาขึ้นและปรากฏ oocyte-like germ cells ที่อยู่ในระยะ meiotic prophase มากกว่า 5 เซลล์ขึ้นไป (Berg et al., 1999; Berg et al., 2001)
- การมีเซลล์บุผิว (epithelial cells) ชนิดทรงลูกบาศก์ (cuboidal cells) หรือทรงกระบอก (columnar cells) และไซโทพลาซึมของ germ cells ในชั้น cortex เป็นแบบ eosinophilic cytoplasm (Shibuya et al., 2004)

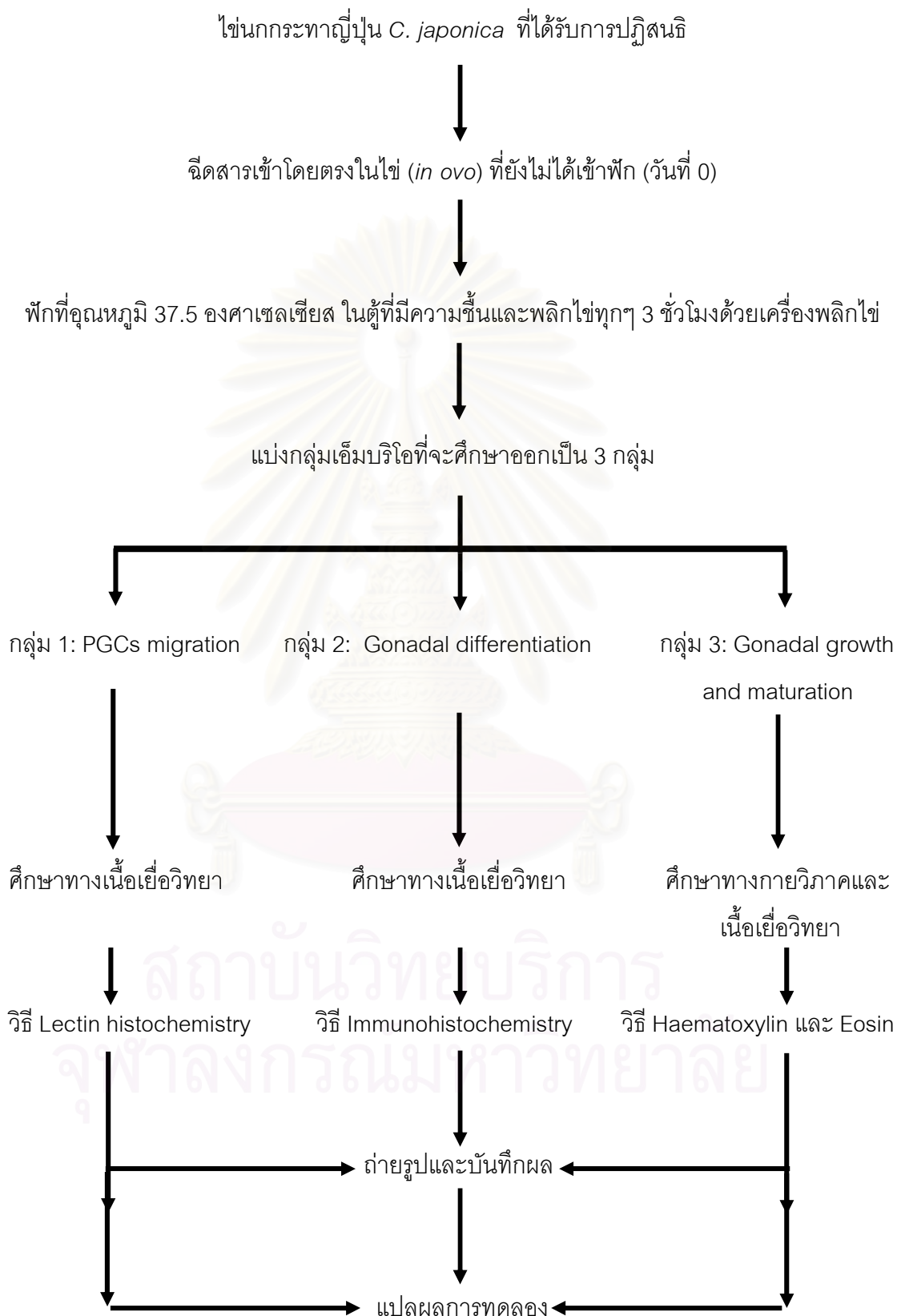
ซึ่งลักษณะดังกล่าวข้างต้นพบเฉพาะในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (รังไข่) ข้างซ้ายในสภาพปกติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลของจำนวนเอ็มบริโอที่เกิดความผิดปกติในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบ Fisher's exact test

แผนภูมิการทดลองที่ 3

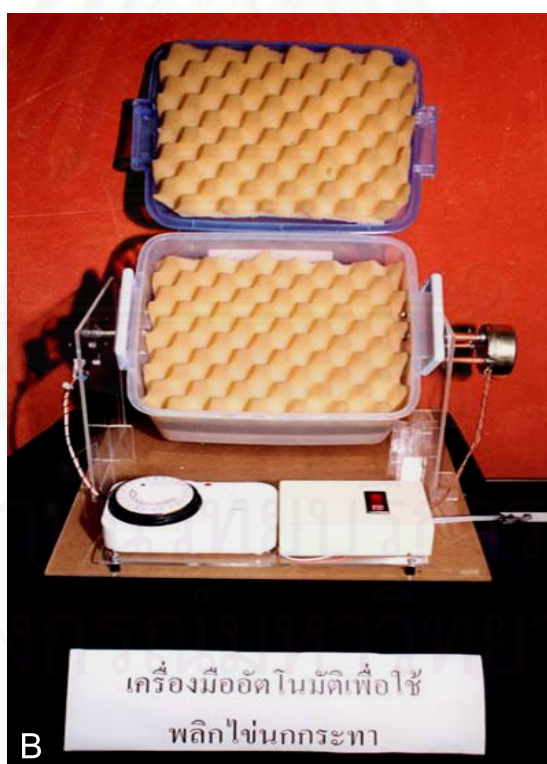


แผนภูมิสรุปขั้นตอนการดำเนินงานและวิธีการศึกษา



2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- Automatic rotating incubator
- BHS Olympus system microscope (Olympus, Japan)
- Cell counter : Taiwan
- Disposable microtome knife : Feather, Japan
- PM-10M3 Photomicrographic system camera (Olympus, Japan)
- Forceps
- Hamilton microliter syringe : Hamilton Company, Reno, NV, USA.
- Hot plate : E.G.O
- Laminar flow : Dwyer MARK II, Dwyer Instruments, Inc., USA.
- Leukosilk plastic tape : Beiersdorf AG, Humburg, Germany
- Manual counter
- Micropipette : Pipetman, Gilson, France
- Moist chamber
- Needle
- Petri dish
- Rotary microtome : The Gemmary, Fallbrook, CA, USA.
- Rubber gloves : Angel Touch, EN Medipart, Korea
- SZ-PT Stereomicroscope (Olympus, Japan)
- Vial 20 ml
- Water-jacketed incubator : Forma Scientific, Marietta, OH, USA.
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง : Precisa 125A



ภาพที่ 18 เครื่องมืออัตโนมัติเพื่อใช้พลิกไข่บนกระดาษ (Automatic rotating incubator) แสดง
โครงสร้างภายนอก (A) และ โครงสร้างภายใน (B)

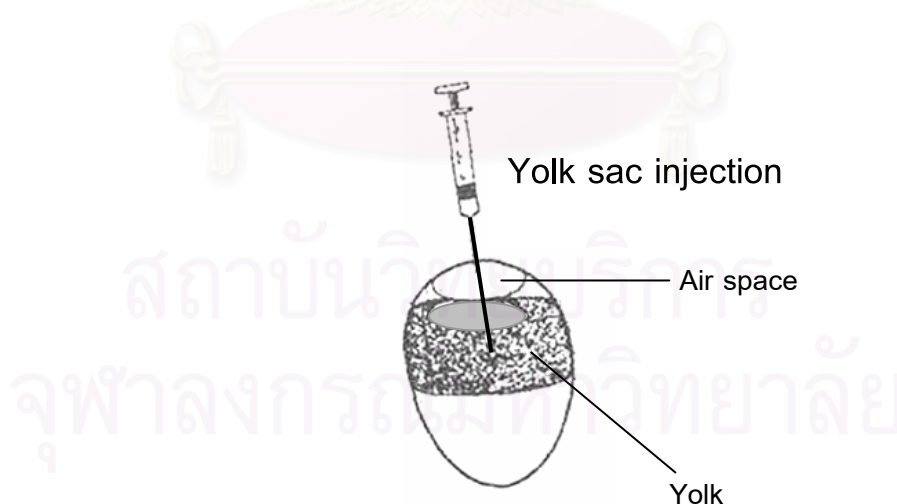
3. สารเคมี

- Biotinylated goat anti-mouse IgG : Chemicon International Inc., Temacula, Canada
- Butanol : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Corn oil : Mazola, CPC/AJI, Thailand.
- Dimethylsulfoxide (DMSO) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Eosin : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Ethanol : องค์การสุรา กรมสรรพสามิต
- Genistein : Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA.
- Haematoxylin : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- Hydrogen peroxide : APS, Auburn, Australia.
- Immunoperoxidase Secondary Detection System : Chemicon International, USA.
- Lectin (*Wisteria floribunda*, Biotin conjugate) : Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA.
- Mouse anti-estrogen receptor monoclonal antibody : Chemicon International Inc., Temacula, Canada
- Paraformaldehyde : Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.
- Paraplast : Sherwood Medical Co., St. Louis, Mo, USA.
- Permout : Fisher Scientific Company., Fair Lawn, NJ, USA.
- Poly-L-Lysine : Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.
- Triton X-100 : Serva, New York, USA.
- Tween 80 : Fluka, Bunch, Switzerland.
- Xylene : E. Merck, Darmstadt, Germany.

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การฉีด genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*)

- 4.1.1 ชั่งน้ำหนักไข่ที่คัดเลือก 4 ตำแหน่ง
- 4.1.2 ขั้นตอนลำดับต่อไปทำการฉีดสารเข้าสู่ไข่ในสภาพปลอดเชื้อโดยเครื่องมือทุกชิ้นผ่านการฆ่าเชื้อ และทำใน Laminar flow hood
 - 4.1.2.1 ฆ่าเชื้อตรงบริเวณเปลือกไข่ด้านข้างที่ฉีดสารด้วย 70% Ethanol
 - 4.1.2.2 เจาะเปลือกไข่ทำการฆ่าเชื้อแล้วด้วยเข็มเย็บที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
 - 4.1.2.3 ฉีดสารตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ โดยใช้ Hamilton microliter syringes ขนาด 50 ไมโครลิตร ฉีดทางรูบนเปลือกไข่ด้านข้างที่เจาะไว้ โดยให้ผ่านบริเวณที่เป็นไข่แดง ตามวิธีของ Brunström and Örberg, 1982 และ Brunström and Halldin, 1998 (ภาพที่ 19)
 - 4.1.2.4 ปิดรูที่ฉีดสารด้วย paraffin (Brunström and Örberg, 1982)
- 4.1.3 นำไข่นกกระทาญี่ปุ่นที่ฉีดสารละลาย genistein เรียบร้อยแล้วและกลุ่มควบคุมบรรจุลงในเครื่องพลิกไข่อัตโนมัติที่ตั้งเวลาให้หมุนทุกๆ 3 ชั่วโมง แล้วนำไปพักใน water-jacketed incubator จนกระทั่งเอ็มบริโอเจริญจนมีอายุฟักครบของแต่ละการทดลอง แล้วจึงนำเอ็มบริโอมาศึกษา



ภาพที่ 19 แสดงการฉีด genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ผ่านบริเวณที่เป็นไข่แดง (yolk) ในวันที่ ยังไม่ได้เข้าฟัก (ดัดแปลงจาก Hutson et al., 1985)

4.2 การผ่าตัดเพื่อนำเอ็มบริโอมาศึกษาสภาพทางกายวิภาคและการศึกษาทางเนื้อเยื่อ

- 4.2.1 เปิดเปลือกไข่ เทเอ็มบริโอและส่วนประกอบอื่นๆ ที่อยู่ภายในไข่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร
- 4.2.2 ผ่าตัดนำเฉพาะตัวเอ็มบริโอมาใส่ลงใน Petri dish ที่มี Chick ringer solution อยู่ โดยอาศัยกล้อง stereomicroscope ศึกษาและบันทึกผลทางกายวิภาคและบันทึกภาพ
- 4.2.3 Fix เอ็มบริโอเพื่อศึกษาในระดับเนื้อเยื่อด้วย
- การทดลองที่ 1 ใช้ Rossmann's fluid (Nakamura et al., 1992) นาน 24 ชั่วโมง
 - การทดลองที่ 2 ใช้ 4% Paraformaldehyde (Nakabayashi et al., 1998) นาน 16 ชั่วโมง
 - การทดลองที่ 3 ใช้ Bouin's fluid (Kannankeril and Domm, 1968) นาน 24 ชั่วโมง

4.3 การทำ Paraffin section

- 4.3.1 ล้าง fixative
- การทดลองที่ 1 ล้าง fixative ด้วย Absolute ethanol นาน 2 สัปดาห์ จนไม่มีสีของ Picric acid เหลืออยู่
 - การทดลองที่ 2 ล้าง fixative ด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
 - การทดลองที่ 3 ล้าง fixative ด้วย 70% Ethanol นาน 3 สัปดาห์ จนไม่มีสีของ Picric acid เหลืออยู่
- 4.3.2 Dehydration
- การทดลองที่ 1 dehydrate ด้วย 30% Ethanol 70% Ethanol และ Absolute ethanol ตามลำดับ
 - การทดลองที่ 2 dehydrate ด้วย 30% Ethanol 70% Ethanol และ Absolute ethanol ตามลำดับ

- การทดลองที่ 3 dehydrate ด้วย 90% Ethanol 95% Ethanol และ Butanol ตามลำดับ

4.3.3 Clearing : การทดลองที่ 1 2 และ 3 clear ด้วย Xylene

4.3.4 Infiltration : การทดลองที่ 1 2 และ 3 infiltrate ด้วย Xylene+Molten Paraffin Wax Wax 1 และ Wax 2 ตามลำดับ

4.3.5 Embedding : การทดลองที่ 1 2 และ 3 embed ด้วย Paraffin Wax 3

4.3.6 ตัด Paraffin section ที่ความขนาดดังนี้

- การทดลองที่ 1 ตัด section ที่ความหนา 6 ไมครอน (Yoshinaga et al., 1992)
- การทดลองที่ 2 ตัด section ที่ความหนา 5 ไมครอน (González-Morán and Camacho-Arroyo, 2001)
- การทดลองที่ 3 ตัด section ที่ความหนา 5 ไมครอน (Berg et al., 1998)

4.3.7 การติด section บนสไลด์ : การทดลองที่ 1 และ 2 เคลือบ (coat) สไลด์ด้วย 0.01% poly-L-lysine (González-Morán and Camacho-Arroyo, 2001; Bancroft and Gamble, 2002) สำหรับการทดลองที่ 3 เคลือบสไลด์ด้วย egg albumen

4.4 Lectin Histochemistry สำหรับการทดลองที่ 1 (Primordial Germ Cell migration) : มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.4.1 ขั้นตอนการเอาพาราฟินออก (Deparaffinization) และ การให้น้ำคืนสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration) : นำสไลด์ที่มี section ของเอ็มบริโอมาผ่านขั้นตอนดังนี้

- | | | |
|-------------------|---------|-------------------|
| - Xylene | 4 ครั้ง | นานครั้งละ 5 นาที |
| - 100% Ethanol | 2 ครั้ง | นานครั้งละ 1 นาที |
| - 70% Ethanol | 2 ครั้ง | นานครั้งละ 1 นาที |
| - 30% Ethanol | 2 ครั้ง | นานครั้งละ 1 นาที |
| - Distilled water | 2 ครั้ง | นานครั้งละ 1 นาที |

4.4.2 ขั้นตอน Tissue pretreatment : ทำเพื่อกำจัดเอนไซม์ Peroxidase ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ

- หยด 0.3% hydrogen peroxide ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ โดยให้สารครอบคลุมทั่วเนื้อเยื่อ
- นำไปบ่มลงในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น นาน 30 นาที

4.4.3 ขั้นตอนการล้าง Hydrogen peroxide ออกจากเนื้อเยื่อ (Rinsing)

- หยด 1X rinse buffer (ประกอบด้วย Tris buffer + Distilled water + Tween 80) ที่เตรียมไว้แล้วลงบนสไลด์เนื้อเยื่อ เอียงสไลด์ประมาณ 45 องศาเพื่อให้ rinse buffer ล้างเอา 0.3% Hydrogen peroxide ออกจากเนื้อเยื่อแล้วใช้กระดาษทิชชูซับเอา rinse buffer ที่หลงเหลืออยู่ออกจากเนื้อเยื่อเบาๆ
- หยด 1X rinse buffer ลงบนสไลด์ 4 หยด จับสไลด์แล้วเอียงสไลด์ไปมาในแนวนอนเพื่อให้ rinse buffer ค่อยๆ ล้างเอา 0.3% Hydrogen peroxide ออกจากเนื้อเยื่อ
- เอา 1X rinse buffer ออกจากสไลด์แล้วทำขั้นตอน 2 และ 3 ซ้ำอีก 5 ครั้ง
- หยด 1X rinse buffer ลงบนสไลด์ 4 หยด แล้วนำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นานอย่างน้อย 2 นาที
- เอา 1X rinse buffer ออก แล้วเริ่มทำจากขั้นตอนที่ 4.4.3 ซ้ำอีก 5 ครั้ง

4.4.4 ขั้นตอน Lectin staining และ Control staining

- หยด blocking reagent (normal goat serum in phosphate buffered saline PBS จากชุด kit : Immunoperoxidase Secondary Detection System) จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์เพื่อ block nonspecific binding
- นำสไลด์ไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 5 นาที
- เอียงสไลด์ประมาณ 45 องศา แล้วล้างสไลด์ด้วย 1X rinse buffer นานอย่างน้อย 15 วินาที โดยให้ด้านปลายขอบสไลด์วางอยู่บนกระดาษทิชชูเพื่อซับ buffer ที่ยังเหลืออยู่ให้หมด แล้วเริ่มทำขั้นตอนการ rinse ในข้อ 4.4.3 ใหม่
- ไปเปิด biotinylated WFA lectin (*Wisteria floribunda* Agglutinin) (Yoshinaga et al., 1992) ที่ได้จากต้น Japanese wisteria ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนสไลด์ให้สาร

ครอบคลุมทั่วเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปใส่ลงในกล่องที่มีความชื้นแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
(สำหรับ Control staining ทำตามขั้นตอนการย้อมข้างต้นแต่ไม่หยุด WGA lectin ลงบนสไลด์)

4.4.5 ขั้นตอน Streptavidin horseradish peroxidase (Streptavidin HRP)

- หยุด Streptavidin-HRP (จากชุด kit) จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์
- นำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 30 นาที
- นำสไลด์ไป rinse ตามขั้นตอนในข้อ 4.4.3

4.4.6 ขั้นตอน Chromogen reagent

- หยุด Chromogen reagent (จากชุด kit ประกอบด้วย 3,3' Diaminobenzidine diluted in TBS + Hydrogen peroxide diluted in TBS) จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์
- นำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 10 นาที
- นำสไลด์ไป rinse ตามขั้นตอนในข้อ 4.4.3

4.4.7 ขั้นตอน Mounting

- นำสไลด์ไปตั้งน้ำออก (dehydrate) โดยจุ่มสไลด์ลงใน 30% Ethanol, 70% Ethanol และ 100% Ethanol ตามลำดับ แล้วยกขึ้นทันที
- จุ่มสไลด์ลงใน coplin jar ที่มี Xylene อยู่ นาน 1 นาที แล้วยกขึ้นทันที
- หยุด Xylene ประมาณ 1-2 หยดลงบนสไลด์ แล้ว mount สไลด์ด้วย Permount
- ทิ้งสไลด์ไว้ข้ามคืนแล้วนำมาศึกษา

4.5 Immunohistochemistry สำหรับการทดลองที่ 2 (Estrogen receptor localization) : มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.5.1 ขั้นตอนการเอาพาราฟินออก (Deparaffinization) และการให้น้ำคืนสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration) : นำสไลด์เนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนดังนี้

- Xylene 4 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

- 100% Ethanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที
- 70% Ethanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที
- 30% Ethanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที
- Distilled water 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที

4.5.2 ขั้นตอน Tissue pretreatment

- นำสไลด์ที่แช่ใน 10 มิลลิโมลาร์ citric acid, pH 6.0 ไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง microwave (Von Bogulawsky, 1994) จำนวน 2 รอบๆ ละ 10 นาที ที่ 800 วัตต์ เพื่อเป็นการกระตุ้น antigen และไม่ให้อะนติเจนของ antigen ถูกบดบังเมื่อใช้ monoclonal antibody ในการจับกับ antigen ที่ต้องการ
- ล้างสไลด์ด้วย 0.05 โมลาร์ Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
- หยด 3% Hydrogen peroxide ประมาณ 2-3 หยดลงบนสไลด์ให้ครอบคลุมทั่วเนื้อเยื่อ เพื่อกำจัดเอนไซม์ peroxidase ในเนื้อเยื่อ
- นำไปบ่มลงในกล่องพลาสติกที่มีความชื้น นาน 10 นาที
- หยด 0.5% Triton X-100 ประมาณ 2-3 หยดลงบนสไลด์ แล้วนำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้นนาน 20 นาที

4.5.3 ขั้นตอนการล้างเนื้อเยื่อ (Rinsing) : ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 4.4.3

4.5.4 ขั้นตอนการ Blocking

- หยด blocking reagent (normal goat serum in phosphate buffered saline PBS จากชุด kit : Immunoperoxidase Secondary Detection System) จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์เพื่อ block nonspecific binding
- นำสไลด์ไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 5 นาที
- เติงสไลด์ประมาณ 45 องศา แล้วล้างสไลด์ด้วย 1X rinse buffer นานอย่างน้อย 15 วินาที โดยให้ด้านปลายขอบสไลด์วางอยู่บนกระดาษทิชชูเพื่อซับ buffer ที่ยังเหลืออยู่ให้หมด แล้วเริ่มทำขั้นตอนการ rinse ใน ข้อ 4.4.3

4.5.5 ขั้นตอน Primary antibody และ Negative control

- ไปเปิด Primary antibody (mouse anti-estrogen receptor monoclonal antibody) ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (Andrews et al., 1997) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ให้สารครอบคลุมทั่วเนื้อเยื่อ (สำหรับ Negative control ไม่หยด Primary antibody ลงบนสไลด์)
- นำสไลด์ใส่ลงในกล่องที่มีความชื้นแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

4.5.6 ขั้นตอน Secondary antibody

- หยด Secondary antibody (Biotinylated goat anti-mouse IgG ใน phosphate buffer saline จากชุด kit) ลงบนสไลด์ จำนวน 2 หยด
- นำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 10 นาที
- นำสไลด์เนื้อเยื่อไป rinse ตามขั้นตอนในข้อ 4.4.3

4.5.7 ขั้นตอน Streptavidin Horseradish Peroxidase : ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 4.4.5

4.5.8 ขั้นตอน Chromogen reagent : ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 4.4.6

4.5.9 ขั้นตอน Haematoxylin counter staining

- หยด Mayer's haematoxylin counter stain (จากชุด kit) จำนวน 2 หยด ลงบนสไลด์
- นำไปบ่มในกล่องที่มีความชื้น นาน 10 นาที
- นำสไลด์เนื้อเยื่อไป rinse ตามขั้นตอนในข้อ 4.4.3
- วางสไลด์เนื้อเยื่อลงบนกล่องที่มีความชื้นจนกว่าจะเริ่มทำในขั้นต่อไป

4.5.10 ขั้นตอน Dehydration และ Mounting

- นำสไลด์เนื้อเยื่อไปดึงน้ำออก (dehydrate) โดยจุ่มสไลด์ลงใน 30% Ethanol, 70% Ethanol และ 100% Ethanol ตามลำดับ แล้วยกขึ้นทันที
- จุ่มสไลด์ลงใน coplin jar ที่มี Xylene อยู่ นาน 1 นาที แล้วยกขึ้นทันที
- หยด Xylene ประมาณ 1-2 หยดลงบนสไลด์แล้ว mount สไลด์ ด้วย

Permout

- ทิ้งสไลด์ไว้ข้ามคืนแล้วนำมาศึกษา

4.6 การย้อมด้วย Haematoxylin and Eosin (H&E) สำหรับการทดลองที่ 3 เพื่อศึกษา Gonadal

histology : มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- Xylene 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที
- Butanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที
- 95% Ethanol 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา นาน 10 นาที
- ย้อมด้วยสี Mayer's Haematoxylin นาน 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลา นาน 10 นาที
- ย้อมด้วยสี Eosin นาน 3 นาที
- 90% Ethanol นาน 1 นาที
- 95% Ethanol นาน 1 นาที
- Butanol นาน 1 นาที
- Xylene นาน 2 นาที
- นำสไลด์มา mount ด้วย Permout ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำมาศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น (*Coturnix japonica*)

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ได้แก่

- 4.1.1 Primordial Germ Cell migration : เป็นการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells : PGCs) จากแหล่งต้นกำเนิดนอกตัวเอ็มบริโอ (extraembryonic region) มาฝังตัวในตำแหน่งที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges) เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 1-2 วัน (ภาพที่ 20)
- 4.1.2 Gonadal differentiation : เป็นระยะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมีย จากระยะที่ไม่สามารถแยกเพศได้ (indifferent stage) (ภาพที่ 21) จนถึงระยะที่สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้ โดยใช้ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal anatomy) พบว่า ในเอ็มบริโอเพศผู้อัณฑะ (testes) ข้างซ้ายและขวามีขนาดเท่ากัน (symmetrical gonads) ในขณะที่เอ็มบริโอเพศเมียเฉพาะรังไข่ (ovary) ข้างซ้ายเท่านั้นที่เจริญและผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้ ส่วนรังไข่ข้างขวาสลายไปในระยะเอ็มบริโอ (asymmetrical gonads) กระบวนการนี้เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 6-8 วัน (ภาพที่ 22)
- 4.1.3 Gonadal growth and maturation : เป็นระยะที่กลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ spermatogonia oogonia และกลุ่มเซลล์ร่างกายที่อยู่ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นส่งผลให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 11-15 วัน (ภาพที่ 23)

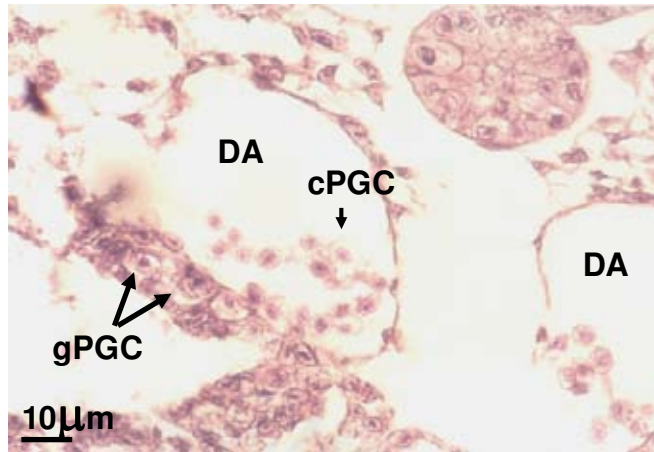
ภาพที่ 20 : ระยะ PGCs migration แสดง PGCs ที่อยู่ใน dorsal aorta และที่ใกล้กับบริเวณที่จะมีการเจริญไปเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นระยะ 48 ชั่วโมง (cPGC : circulating-Primordial Germ Cell , DA : Dorsal aorta , gPGC : gonadal-Primordial Germ Cell) Bar = 10 μ m

ภาพที่ 21 : แสดง embryonic gonads ของนกกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 6 วัน ซึ่งเป็นระยะยังไม่สามารถแยกเพศจากลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ (indifferent stage) (IG : Indifferent gonad , ME : Mesonephros) Bar = 0.5 mm

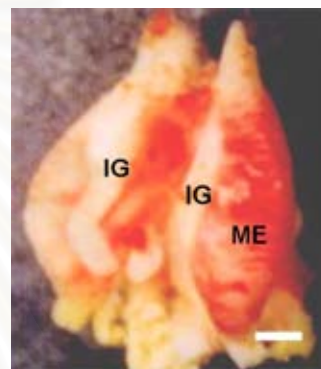
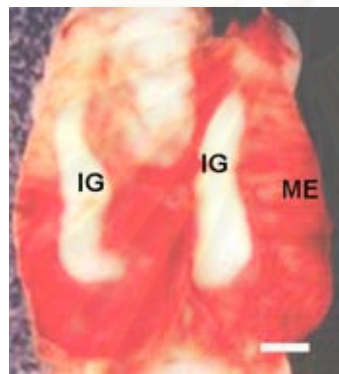
ภาพที่ 22 : แสดง embryonic gonads ของนกกกระทาญี่ปุ่นระยะ gonadal differentiation อายุฟัก 8 วัน เป็นช่วงที่สามารถแยกเพศได้ (different gonads) โดยแสดง symmetrical gonads ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ (ซ้ายมือ) และ asymmetrical gonads (ขวามือ) ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศเมีย (DA : Dorsal aorta , LO : Left ovary , LT : Left testis , ME : Mesonephros , RO : Right ovary, RT : Right testis) Bar = 0.5 mm

ภาพที่ 23 : แสดง embryonic gonad ของนกกกระทาญี่ปุ่นระยะ gonadal growth และ maturation อายุฟัก 15 วัน สังเกตการเติบโตของ embryonic testes ทั้ง 2 ข้าง (ซ้ายมือ) และ embryonic ovary เฉพาะข้างซ้าย (ขวามือ) (LO : Left ovary , LT : Left testis , ME : Mesonephros , RO : Right ovary, RT : Right testis) Bar = 0.5 mm

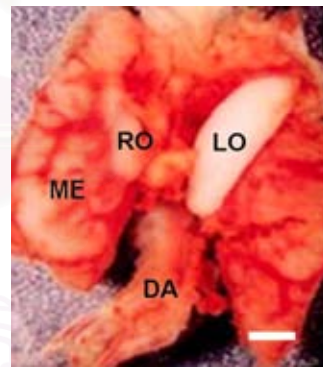
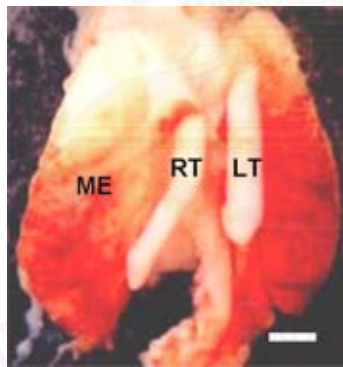
ภาพที่ 20



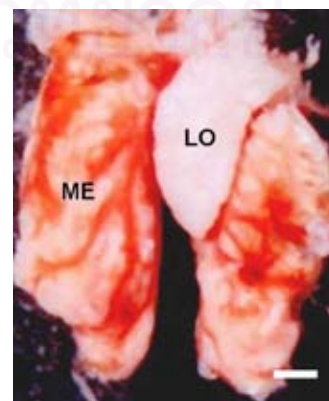
ภาพที่ 21



ภาพที่ 22



ภาพที่ 23



4.2 ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges)

ในเอ็มบริโออายุพัก 3 วัน ตำแหน่งที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า genital ridges พบอยู่ทางด้านล่าง (ventral side) ของไตชุดที่ 2 (mesonephros) ทั้ง 2 ข้าง (ภาพที่ 26A) PGCs เคลื่อนที่จากเส้นเลือดภายนอกว่างกายมายังตำแหน่ง genital ridges โดยทางเส้นเลือด dorsal aorta จากนั้น PGCs เคลื่อนที่ออกจาก dorsal aorta มาฝังตัวใน genital ridges สามารถสังเกตแยก PGCs จากเซลล์ร่างกายที่อยู่ข้างเคียงใน genital ridges ได้จากลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ โดยพบว่า PGCs มีขนาดของเซลล์และขนาดของนิวเคลียสใหญ่ โครมาตินหดตัวแน่น (condensed chromatin) ไฮโทพลาซึมใส (ภาพที่ 26B) การจำแนก PGCs ของเอ็มบริโอในกระเพาะปัสสาวะอย่างจำเพาะเจาะจงทำได้โดยการย้อมด้วย WFA lectin (*Wisteria floribunda* Agglutinin) ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะได้ที่บริเวณผิวเซลล์และในไฮโทพลาซึมของ PGCs (ภาพที่ 27A) เมื่อเปรียบเทียบจำนวน PGCs ที่เคลื่อนที่มาฝังตัวใน genital ridges ในการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2) พบว่า เอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีจำนวนของ PGCs ใน genital ridges ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (41.09 ± 1.38 และ 38.82 ± 0.84 ; $p < 0.001$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม (50.49 ± 1.86) (ภาพที่ 24) ค่าดัชนีความเป็นหมัน (Index of Sterility : IS, ตารางที่ 3) ของเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.19 และ 0.23; $p < 0.001$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 25) เปอร์เซ็นต์ของอัตราการเกิดความเป็นหมัน (sterility rate) ของเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีค่าเท่ากับ 19.0 % และ 23.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 จำนวนของ PGCs (mean \pm SEM) ที่บริเวณ genital ridges ของเอ็มบริโออายุ 3 วัน (ระยะที่ 21) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเอ็มบริโอที่นับ	จำนวนของ PGCs ทั้งหมด
กลุ่มควบคุม (corn oil + 10%DMSO)	6	50.49 \pm 1.86
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	7	41.09 \pm 1.38 ***
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	6	38.82 \pm 0.84 ***

*** ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.001$ ทดสอบโดยใช้สถิติแบบ one-way ANOVA

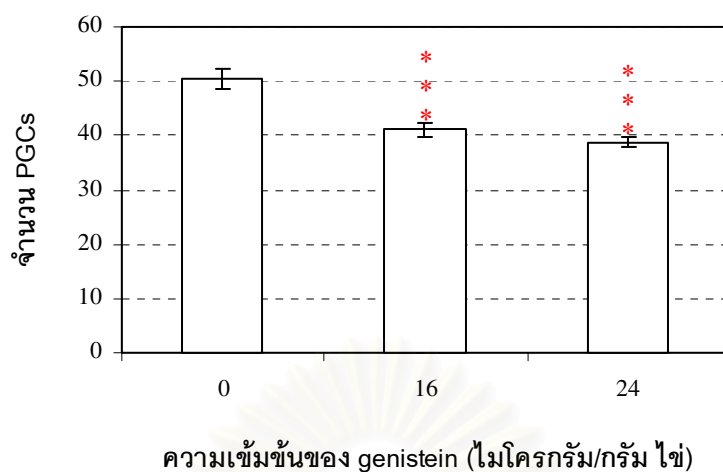
ตารางที่ 3 ค่าดัชนีความเป็นหมัน (Index of Sterility : IS) ของเอ็มบริโออายุ 3 วัน (ระยะที่ 21) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

กลุ่มการทดลอง	ค่าดัชนีความเป็นหมัน ¹	เปอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นหมัน ²
กลุ่มควบคุม (corn oil + 10%DMSO)	0	0
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	0.19 ***	19.0
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	0.23 ***	23.0

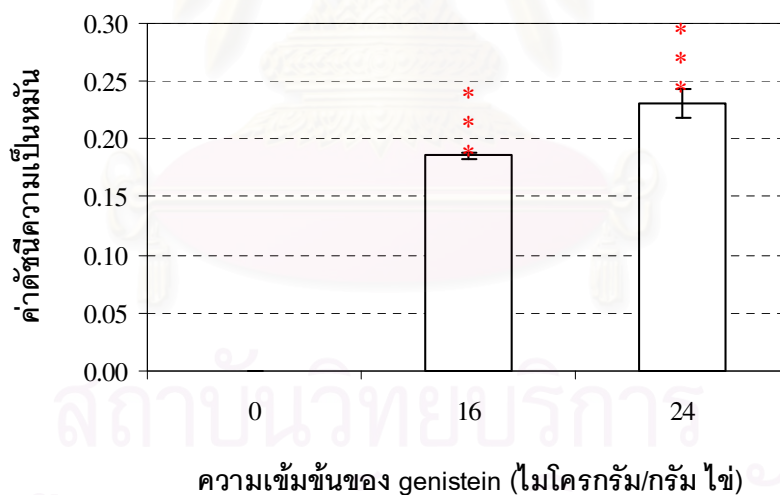
¹ ค่าดัชนีความเป็นหมัน = $\frac{\text{จำนวนของ PGCs กลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนของ PGCs กลุ่มที่ได้รับ genistein}}{\text{จำนวนของ PGCs กลุ่มควบคุม}}$

² เปอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นหมัน = ค่าดัชนีความเป็นหมัน \times 100

*** ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.001$



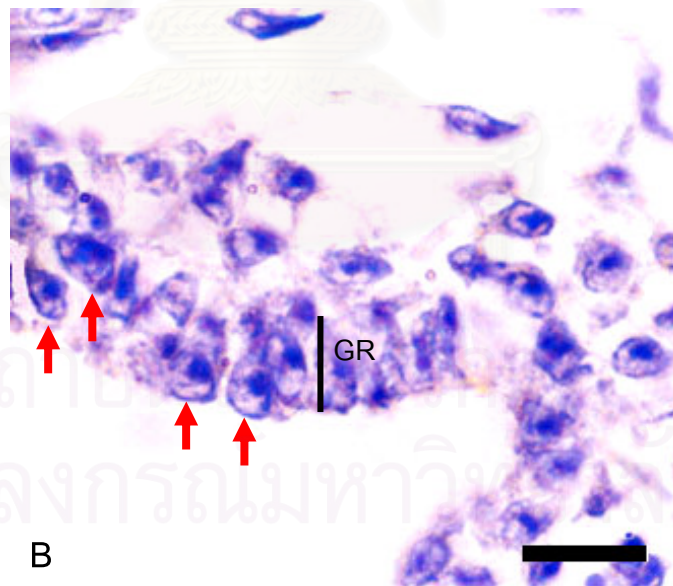
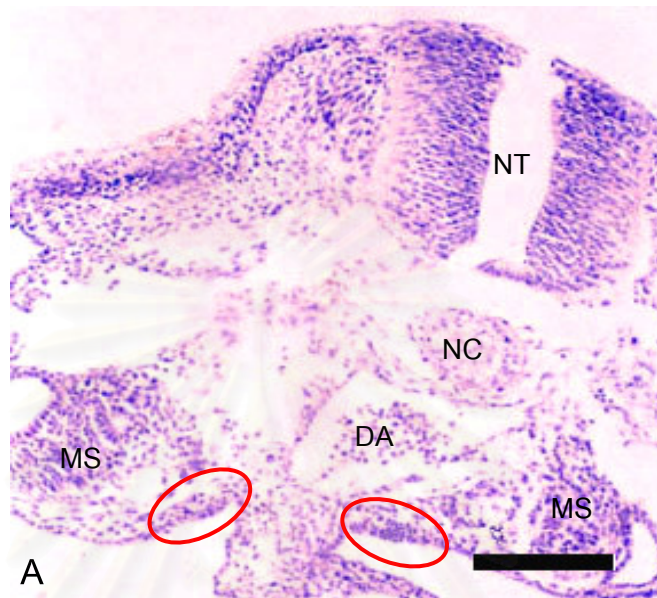
ภาพที่ 24 จำนวน PGCs (mean ± SEM) บริเวณ genital ridges ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) กลุ่มควบคุม (n = 6), กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (n = 7) และ 24 ไมโครกรัม /กรัม ไข่ (n = 6) (** $p < 0.001$)



ภาพที่ 25 ค่าดัชนีความเป็นหมัน (mean ± SEM) ของเอ็มบริโออายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ และ 24 ไมโครกรัม /กรัม ไข่ (** $p < 0.001$)

ภาพที่ 26 ภาพตัดขวาง (cross section) ของเอ็มบริออนกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) ที่กำลังขยายต่ำ (A) และกำลังขยายสูง (B) สังเกตบริเวณ genital ridges (วงรีสีแดง) พบอยู่ทางด้านล่างของ mesonephros ทั้ง 2 ข้าง และ PGCs (ลูกศรสีแดง) สังเกตขนาดของเซลล์ใหญ่, ขนาดของนิวเคลียสใหญ่, โครมาตินขดตัวแน่น และไซโทพลาซึมใส (DA : Dorsal aorta; NC : Notochord; NT : Neural tube, GR : Genital ridges; MS : Mesonephros) H&E, Bar (A) = 100 μm , Bar (B) = 10 μm

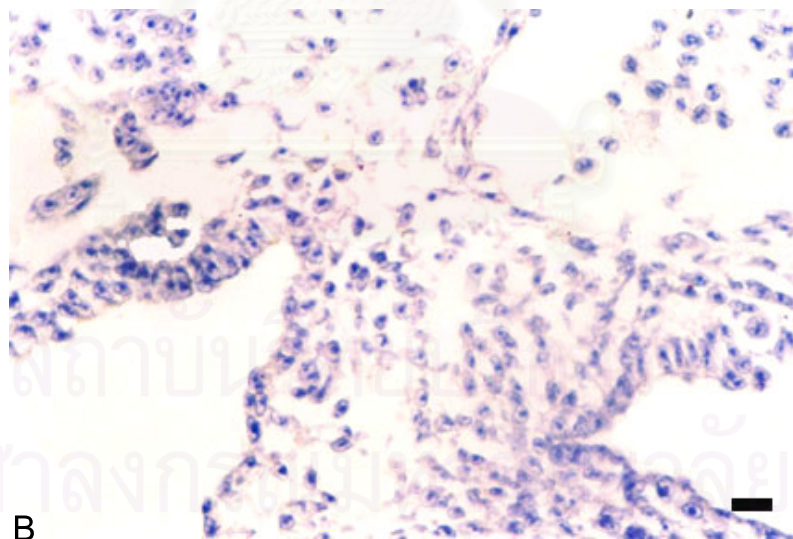
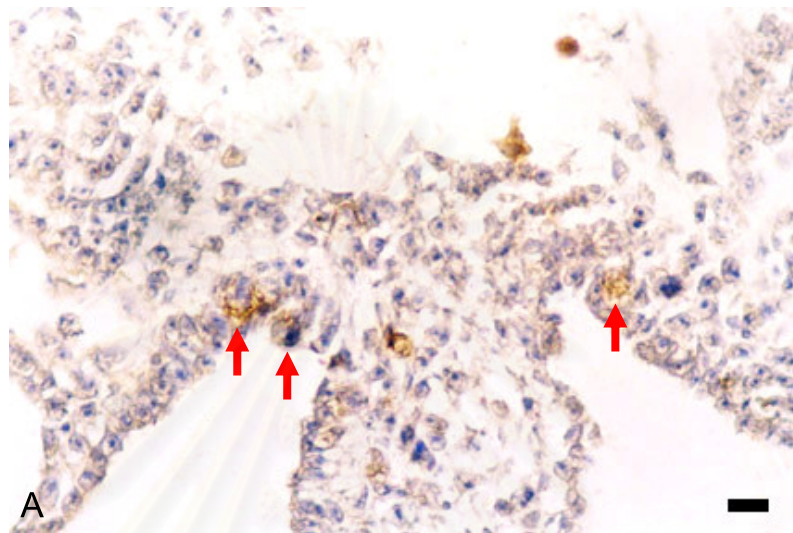
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยและพัฒนา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 27 ภาพตัดขวาง (cross section) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอายุฟัก 3 วัน (ระยะที่ 21) กลุ่มที่ย้อมด้วย WFA lectin (*Wisteria floribunda* Agglutinin) สังกเกต PGCs ที่เกิดปฏิกิริยา (ลูกศรสีแดง) ตรงบริเวณ genital ridges (A) และกลุ่ม negative control (B) H&E, Bar = 10 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

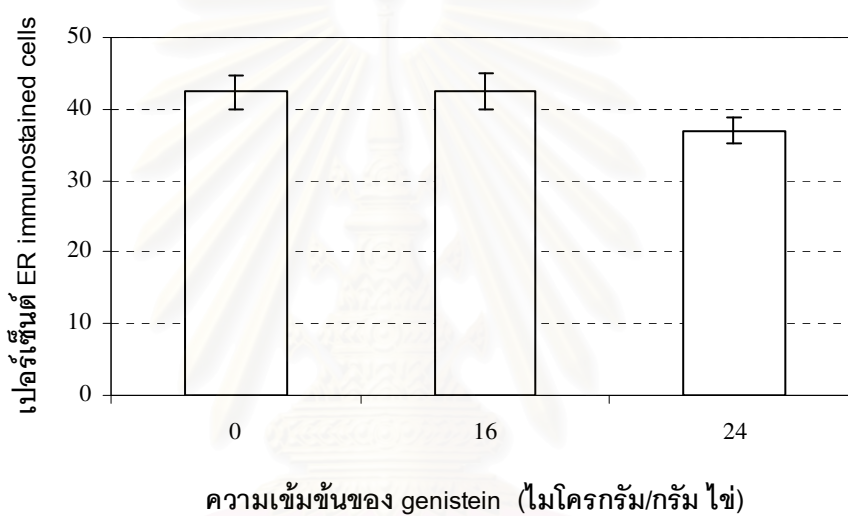
4.3 ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอในกระต่ายญี่ปุ่นเพศผู้

จากการย้อมเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ (male left gonad) เพื่อตรวจสอบเซลล์ที่มีโปรตีน estrogen receptor (positive ER-immunostained cells) ที่บริเวณ germinal epithelium ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ER พบว่า germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ (ภาพที่ 29A) ประกอบด้วยเซลล์บุผิวชนิดแบนบาง (squamous cells) จนถึงชนิดทรงลูกบาศก์ (cuboidal cells) จัดเรียงตัวหนาประมาณ 1-2 ชั้น และพบว่าเซลล์ของ germinal epithelium เหล่านี้มี โปรตีน ER (ER-immunostained cells) โดยเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาดูดสีน้ำตาลทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาซึมของเซลล์ (ภาพที่ 29C) เมื่อเปรียบเทียบจำนวน ER-immunostained cells ที่นับได้จากบริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 4) พบว่า เอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีจำนวน ER-immunostained cells น้อยกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (36.90 ± 1.82) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม (42.37 ± 2.46) ในขณะที่เอ็มบริโอที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีจำนวน ER-immunostained cells มากกว่าเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (42.47 ± 2.62) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม (42.37 ± 2.46) (ภาพที่ 28)

ตารางที่ 4 จำนวนของ ER-immunostained cells (mean \pm SEM) ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34) ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเอ็มบริโอที่นับ	จำนวนของ ER-immunostained cells
กลุ่มควบคุม (corn oil + 10%DMSO)	6	42.37 \pm 2.46
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	6	42.47 \pm 2.62
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	6	36.90 \pm 1.82

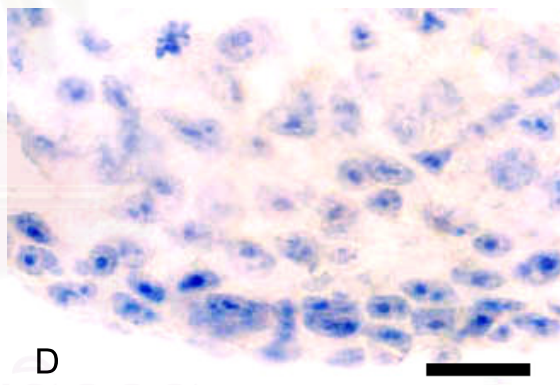
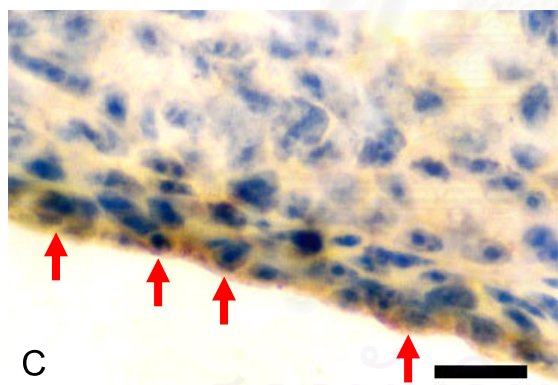
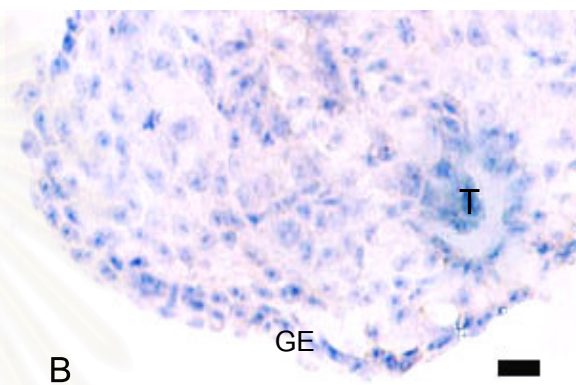
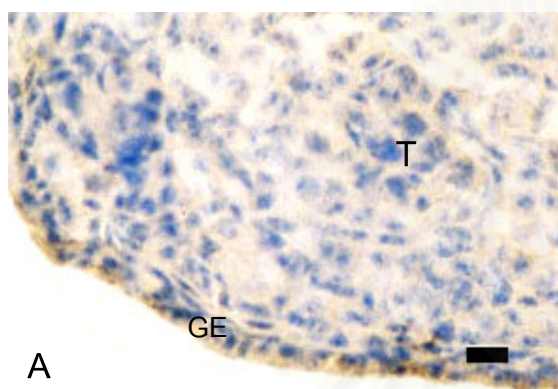
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์ของจำนวน ER-immunostained cells (mean \pm SEM) ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34) กลุ่มควบคุม (n = 6), กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (n = 6) และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (n = 6)

ภาพที่ 29 ภาพตัดขวาง (cross section) ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ (male left gonad) อายุฟัก 8 วัน (ระยะที่ 34) (A,C) แสดง ER-immunostained cells (ลูกศรสีแดง) บริเวณ germinal epithelium ที่เกิดปฏิกิริยาภายหลังจากการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ER (B,D) ไม่เกิดปฏิกิริยาในกลุ่ม negative control (GE : Germinal epithelium; T : Testicular cord) IHC-DABs, Haematoxylin counterstained, Bar = 10 μ m

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอในกระต่ายผู้เพศผู้และเพศเมีย

4.4.1 ลักษณะทางกายวิภาคของมุลเลอเรียน ดักส์ (Müllerian Ducts : MDs) ในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมีย

จากการศึกษาทางกายวิภาคของ MDs ของเอ็มบริโออายุฟัก 15 วัน ทั้ง 3 กลุ่มพบว่า เอ็มบริโอที่ได้รับ genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) เกิดความผิดปกติของ MDs ทั้ง 2 เพศ (ภาพที่ 31 และ 32) genistein ที่ระดับ 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ พบเอ็มบริโอเพศผู้ที่ผิดปกติจำนวน 5 ตัวใน 7 ตัว ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุมที่พบความผิดปกติ 2 ตัวใน 11 ตัว และเอ็มบริโอเพศเมียที่ผิดปกติจำนวน 3 ตัวใน 7 ตัว ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (ตารางที่ 5) เปอร์เซ็นต์ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีค่าเท่ากับ 71% และ 43% ตามลำดับ (ภาพที่ 30) สำหรับ genistein ที่ระดับ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ พบเอ็มบริโอเพศผู้ที่ผิดปกติจำนวน 7 ตัวใน 13 ตัว (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุมที่พบความผิดปกติ 2 ตัวใน 11 ตัว และเอ็มบริโอเพศเมียที่ผิดปกติจำนวน 7 ตัวใน 14 ตัว ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติ (ตารางที่ 5) เปอร์เซ็นต์ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีค่าเท่ากับ 54% และ 50% ตามลำดับ (ภาพที่ 30)

4.4.2 ลักษณะทางเนื้อเยื่อของอัณฑะข้างซ้าย (left testis) ของเอ็มบริโอเพศผู้

จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของอัณฑะข้างซ้ายและข้างขวาของเอ็มบริโอเพศผู้กลุ่มควบคุมอายุฟัก 15 วัน พบว่า มีชั้น cortex บาง ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์บุผิวจัดเรียงตัวหนาประมาณ 1-2 ชั้น (ภาพที่ 34A) ชั้น medulla ประกอบด้วยกลุ่มของท่อที่จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (testicular cord) กระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 34A) ภายใน testicular cord ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ Sertoli และเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (spermatogonia) ที่อยู่ในระยะ interphase สังเกตได้จากการมี chromatin ที่หดตัวแน่น (ภาพที่ 34B) บริเวณชั้น cortex ของเอ็มบริโอกลุ่มควบคุมไม่พบ spermatogonia

สำหรับเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) พบว่า อัณฑะข้างซ้ายเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปรากฏโครงสร้างของอวัยวะสร้าง

เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovotestis) เกิดขึ้นได้แก่ การมีชั้น cortex หนาและพบ oocyte-like germ cells ในระยะ meiotic prophase (ภาพที่ 34C,E) , ไซโทพลาซึมของ germ cells ย้อมติดสีแดง (eosinophilic cytoplasm) (ภาพที่ 34D,F) และเซลล์บุผิวของชั้น cortex เปลี่ยนจาก squamous cells ไปเป็น cuboidal หรือ columnar cells (ภาพที่ 34E,F) ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบได้ในรังไข่ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศเมียกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 34G,H) จำนวนเอ็มบริโอเพศผู้ที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ เท่ากับ 6 ตัวใน 7 ตัว ($p < 0.001$) และที่ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ เท่ากับ 11 ตัวใน 13 ตัว ($p < 0.001$) (ตารางที่ 6) เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิด ovotestis ในเอ็มบริโอที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีค่าเท่ากับ 86 % และ 85% ตามลำดับ (ภาพที่ 33)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

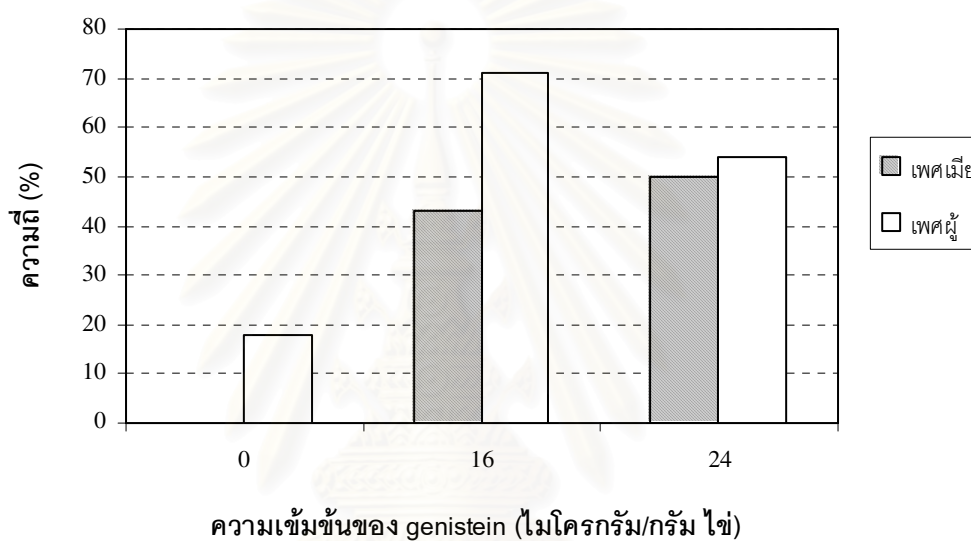
ตารางที่ 5 ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียอายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิด ความผิดปกติของ MDs ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

กลุ่มการทดลอง	เอ็มบริโอเพศผู้ที่มี MDs ผิดปกติ (%) ¹	เอ็มบริโอเพศเมียที่มี MDs ผิดปกติ (%) ¹
กลุ่มควบคุม (corn oil + 10%DMSO)	18 (2/11)	0 (0/13)
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความ เข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	71 (5/7) *	43 (3/7) *
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความ เข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	54 (7/13)	50 (7/14) **

¹ อัตราส่วน (ในวงเล็บ) = (จำนวนเอ็มบริโอที่ผิดปกติ / จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมด) ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอที่เกิดความผิดปกติในกลุ่มที่ได้รับ genistein เปรียบเทียบกับจำนวนเอ็มบริโอในกลุ่มควบคุม ทดสอบโดยใช้สถิติแบบ Fisher's exact test

* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

** ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.01$



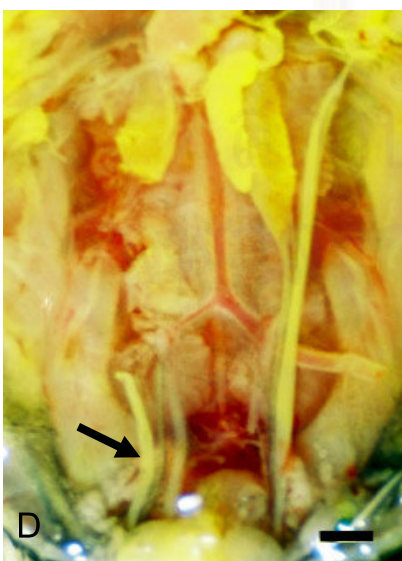
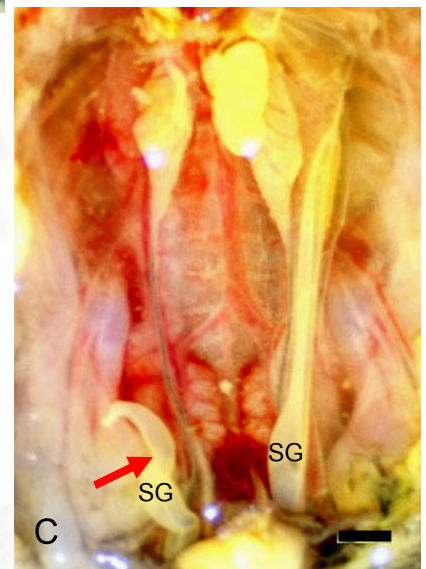
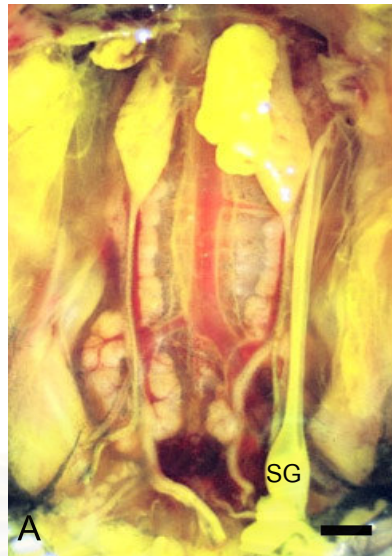
ภาพที่ 30 ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียอายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิดจากความผิดปกติของ MDs ภายหลังจากที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัมไข่ โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 31 ลักษณะทางกายวิภาคของ embryonic ducts ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศเมีย อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) (A) Müllerian Ducts : MDs (ลูกศรสีขาว) ของเอ็มบริโอ กลุ่มควบคุม (B,C) ความผิดปกติของ MDs ในเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (D,E) ความผิดปกติของ MDs ในเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ สังเกตการคงอยู่ของ MDs ข้างขวา (right MDs retention ; ลูกศรสีดำ) และการคงอยู่ของ MDs ข้างขวาที่มีต่อมสร้างเปลือกไข่ (shell gland: SG) (right MDs retention with shell gland; ลูกศรสีแดง)

Bar = 2 mm

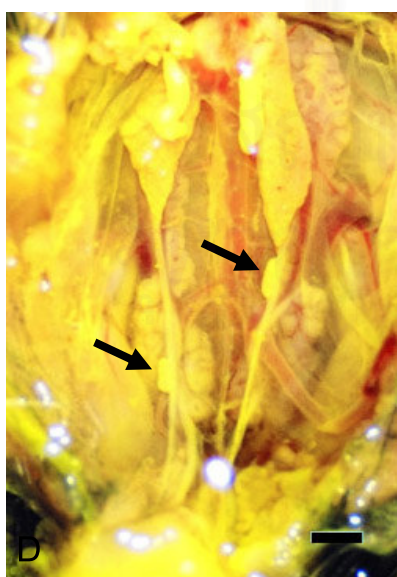
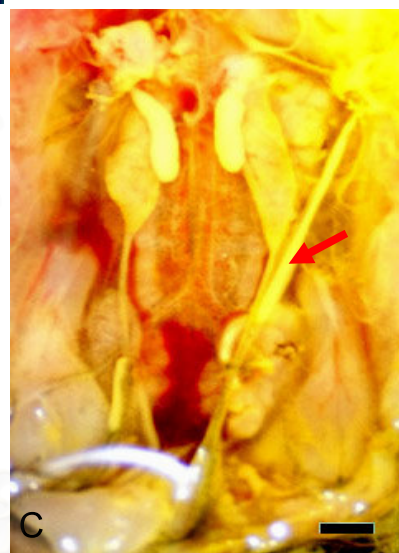
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ภาพที่ 32 ลักษณะทางกายวิภาคของ embryonic ducts ของเอ็มบริโอนกกระต่ายปีนเพศผู้อายุ
พัก 15 วัน (ระยะที่ 41) (A) Wolffian ducts : WDs (ลูกศรสีขาว) ของเอ็มบริโกลุ่ม
ควบคุม (B,C) ความผิดปกติของ embryonics ducts ในเอ็มบริโกลุ่มที่ได้รับ
genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (D,E) ความผิดปกติของ embryonic
ducts ในเอ็มบริโกลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ สังเกต
การเกิด cyst-like structure บน WDs (cyst -like structure on WDs; ลูกศรสีดำ) และ
การคงอยู่ของ MDs ข้างซ้าย (left MDs retention; ลูกศรสีแดง) Bar = 2 mm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

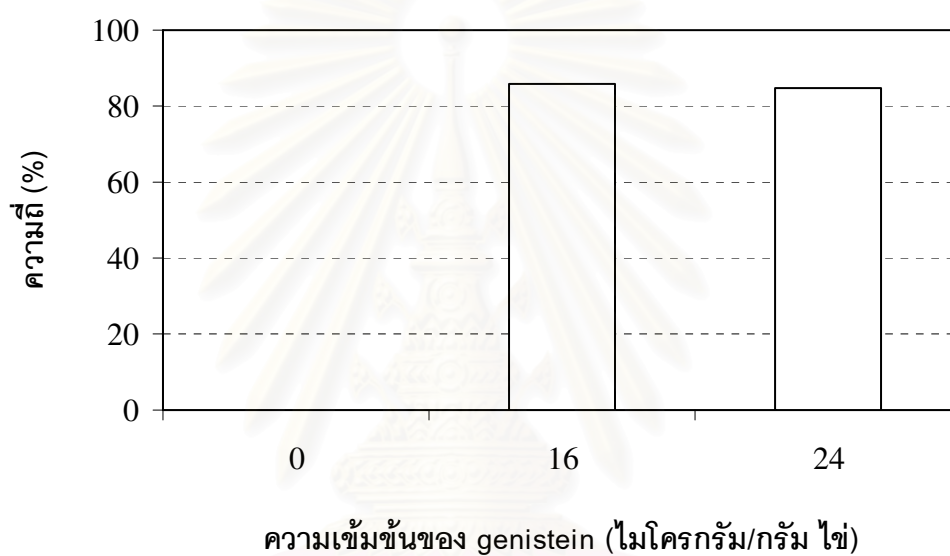
ตารางที่ 6 ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

กลุ่มการทดลอง	เอ็มบริโอเพศผู้ที่เกิด ovotestis (%) ^{1,2}
กลุ่มควบคุม (corn oil + 10%DMSO)	0 (0/11)
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	86 (6/7) ***
กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่	85 (11/13) ***

¹ อัตราส่วน (ในวงเล็บ) = (จำนวนเอ็มบริโอที่ผิดปกติ / จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมด) ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอที่เกิดความผิดปกติในกลุ่มที่ได้รับ genistein เปรียบเทียบกับจำนวนเอ็มบริโอในกลุ่มควบคุม ทดสอบโดยใช้สถิติแบบ Fisher's exact test

² ลักษณะของ ovotestis ได้แก่ การมีชั้น cortex หนา พบ oocyte-like germ cells ในระยะ meiotic prophase, ไซโทพลาซึมของ germ cells ย้อมติดสีแดง (eosinophilic cytoplasm) และ เซลล์บุผิวของชั้น cortex เปลี่ยนจาก squamous cells ไปเป็น cuboidal หรือ columnar cells

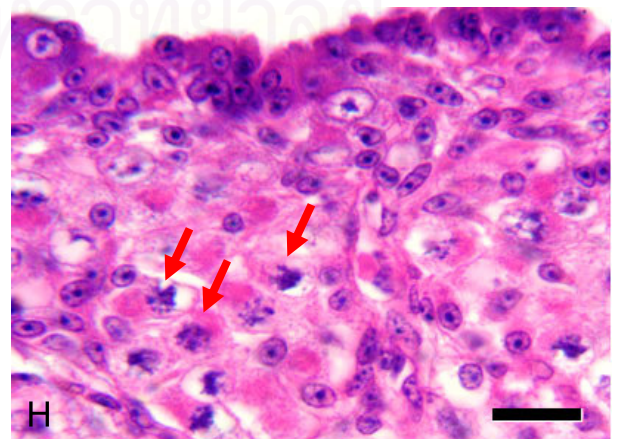
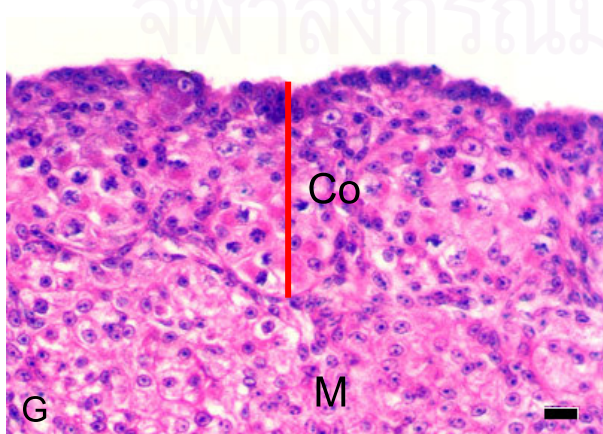
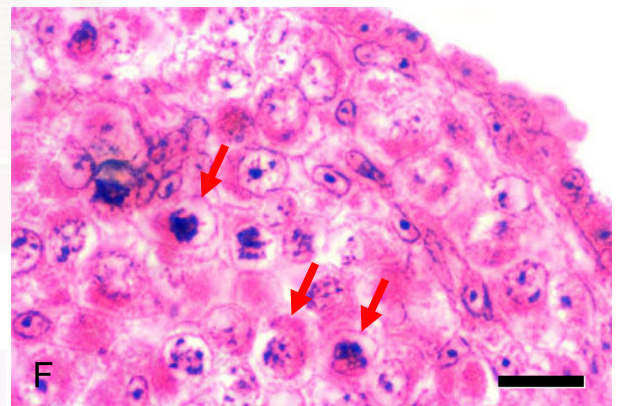
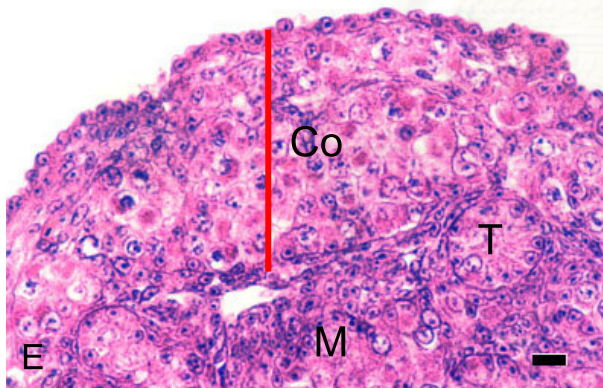
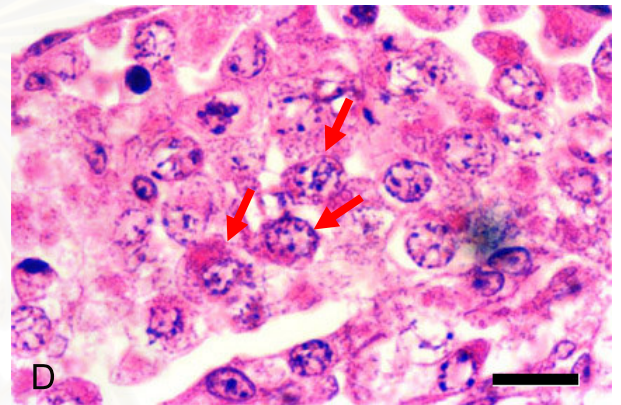
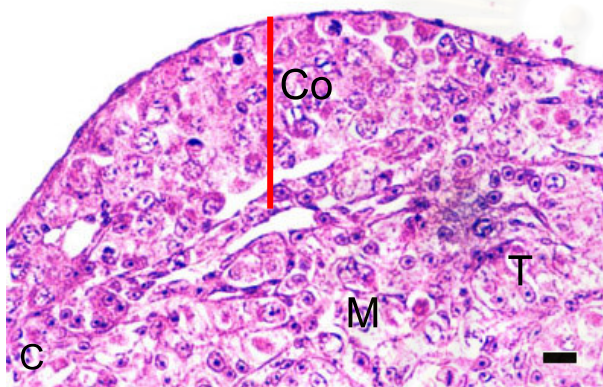
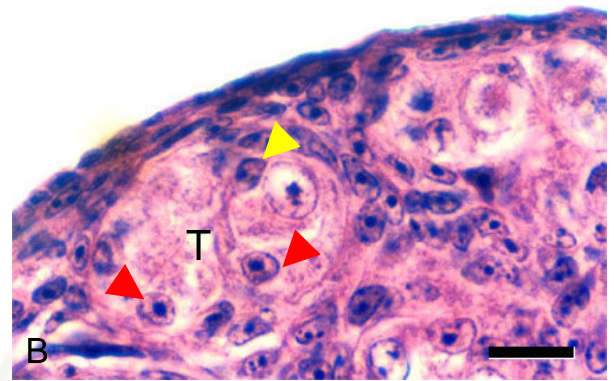
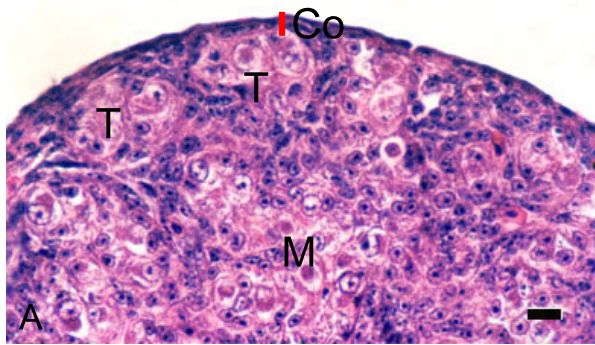
*** ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.001$



ภาพที่ 33 ความถี่ของจำนวนเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) ที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ โดยตรง ในไข่ (*in ovo*) ก่อนการเข้าฟัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 34 ภาพตัดขวาง (cross section) ของอัณฑะข้างซ้าย (left testis) ของเอ็มบริโอนกกระทา ฎีปนเพศผู้อายุฟัก 15 วัน (ระยะที่ 41) (A,B) อัณฑะข้างซ้ายของเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม สังเกตชั้น cortex บาง (Co) และชั้น medulla (M) พบ testicular cord (T) ที่มี spermatogonia (หัวลูกศรสีแดง) และเซลล์ Sertoli (หัวลูกศรสีเหลือง) (C,D) Ovotestis ของเอ็มบริโอเพศผู้กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ สังเกตชั้น cortex (Co) ที่หนาขึ้น พบ oocyte-like germ cells (ลูกศรสีแดง) ในระยะ meiotic prophase (มี nucleus ใหญ่และ eosinophilic cytoplasm) (E,F) Ovotestis ของเอ็มบริโอเพศผู้กลุ่มที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (G,H) รั้งไข่ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศเมียกลุ่มควบคุม H&E, Bar = 10 μ m



อภิปรายผลการศึกษา

- การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น (*Coturnix japonica*)

การศึกษากการเจริญของเอ็มบริโอสัตว์ปีกโดยใช้เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเป็นตัวแบบ (model) มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นมีขนาดเล็ก ใช้ระยะเวลาในการฟักน้อยกว่าเอ็มบริโอไก่ และมีผู้ศึกษาระยะต่างๆ ของเอ็มบริโอตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญ (Eyal-Giladi and Kochav, 1976) ไปจนถึงระยะที่ฟักออกมาเป็นตัว (Padgett and Ivey, 1960) เอาไว้แล้วเป็นอย่างดี

จากการศึกษากการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะแรกที่มีการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (PGCs) สามารถจำแนก PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นจากเซลล์ร่างกายได้จากที่ PGCs มีขนาดของเซลล์และขนาดของนิวเคลียสใหญ่กว่าเซลล์ร่างกาย มีไซโทพลาซึมใส รูปร่างของเซลล์ค่อนข้างกลมเมื่ออยู่ในเส้นเลือด dorsal aorta และ รูปร่างไม่แน่นอนเมื่ออยู่ที่บริเวณ genital ridges และสังเกตเห็นนิวคลีโอลัสได้ชัดเจน จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับการรายงานของ Yoshinaga et al. (1993) ที่ได้ศึกษาลักษณะ PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นและได้รายงานว่า สามารถแยก PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นออกจากเซลล์ร่างกายที่อยู่ใกล้เคียงได้ง่ายเนื่องจาก เซลล์มีขนาดใหญ่ เซลล์มีลักษณะกลมไปจนถึงลักษณะที่ไม่แน่นอน มีนิวคลีโอลัสที่เห็นได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม Nakamura et al. (1988) ได้กล่าวถึงลักษณะเพิ่มเติมของ PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นว่า ไม่พบ glycogen granules ในไซโทพลาซึมเนื่องจากเมื่อย้อมด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) ให้ผลเป็นลบ (PAS negative) ซึ่งแตกต่างจาก PGCs ของเอ็มบริโอไก่ที่เป็น PAS positive (Clawson and Domm, 1963; Meyer, 1964; Fujimoto et al., 1976)

ระยะ gonadal differentiation จากการศึกษากการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นในระยณะนี้พบว่า สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้จากลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในวันที่ 7 ของการฟัก โดยเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นใช้ระยะเวลาในการฟักนาน 17 วัน (สิทธิพล และคณะ, 2547ก; สิทธิพล และคณะ, 2547ข) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Shimada (2002) ในเอ็มบริโอไก่ที่กล่าวว่า ช่วงวันที่ 8-10 ของการ

พักเป็นช่วงแรกที่สังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมีย ทำให้สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้จากลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเอ็มบริโอไก่ใช้ระยะเวลาในการพักนาน 21 วัน (Hamburger and Hamilton, 1951)

ระยะสุดท้ายของการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายในตัวเอ็มบริโอคือระยะ gonadal growth และ maturation ระยะนี้สามารถสังเกตเห็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้นทั้งในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งเป็นระยะที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการเตรียมพร้อมในการผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย สอดคล้องกับการรายงานของ Clinton and Haines (1999) ที่ว่า ระยะที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการทำงาน (gonadal function) เกิดขึ้นหลังจากระยะ gonadal differentiation สำหรับการเกิด embryonic ducts ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นพบว่า สามารถสังเกตเห็น Wolffian ducts ของเอ็มบริโอเพศผู้และ Müllerian ducts ของเอ็มบริโอเพศเมียได้ประมาณวันที่ 7 ของการพัก (สิทธิพล และคณะ, 2547 ก) ในขณะที่เอ็มบริโอไก่เริ่มสังเกตเห็น Wolffian ducts และ Müllerian ducts ได้ประมาณวันที่ 9 ของการพัก (Romanoff, 1960)

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges)

การศึกษาค้นคว้านี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่า genistein (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) มีผลทำให้จำนวนของ PGCs ที่เคลื่อนที่มายังบริเวณ genital ridges ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและพบว่า จำนวน PGCs บริเวณ genital ridges ที่ลดลงแปรตามความเข้มข้นของ genistein (dose-dependent manner)

การที่ genistein ทั้ง 2 ขนาดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีผลทำให้พบ PGCs ใน genital ridges น้อยกว่าในกลุ่มควบคุมนั้น มีข้อสันนิษฐานดังนี้

1. Genistein มีผลทางตรง (direct effect) ต่อ PGCs โดยไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PGCs ในขณะที่เคลื่อนที่ไปฝังตัวที่ genital ridges ซึ่งคาดว่า genistein เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ร่างกายของ genital ridges ผลิต chemotactic factor ชนิด TGF β 1 (Godin et al., 1990; Godin and Wylie, 1991) ซึ่งสามารถไปจับกับ TGF β 1 receptor ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ PGCs ส่งผลให้เกิดกระบวนการ TGF β -smad signaling pathway ใน PGCs โดยมีการสังเคราะห์ smad protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่จะไปมีผลกระตุ้นการสังเคราะห์

โปรตีนที่อาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ microtubules ซึ่งเป็น cytoskeleton ที่มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ (Godin and Wylie, 1991) เนื่องจากมีรายงานว่า ขณะที่ PGCs เคลื่อนที่ไปฝังตัวยังบริเวณ genital ridges จะมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Swartz and Domm, 1972) จากการศึกษาของ Richards et al. (1999) กล่าวว่า TGF β 1 และ activin (growth factor ชนิดหนึ่ง) มีผลโดยตรงต่อ PGCs โดยไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PGCs ของเอ็มบริโอหนูเมาส์อายุ 8.5 วัน ทำให้จำนวน PGCs ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Godin and Wylie (1991) ที่พบว่า TGF β 1 สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PGCs ของเอ็มบริโอหนูเมาส์อายุ 8.5 วัน ในสภาพ *in vitro* ได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Fujioka et al. (2004) พบว่า TGF β 2 ก็สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PGCs ของเอ็มบริโอไก่อายุฟัก 6 วันได้ Kim et al. (1998) รายงานว่า genistein สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์และการเติบโตของเซลล์ได้โดย genistein ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ TGF β 1 ซึ่ง TGF β 1 สามารถทำงานได้ทั้งในเชิงกระตุ้นและยับยั้งการแบ่งเซลล์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (Roberts et al., 1990; Sathyamoorthy et al., 1998) นอกจากนี้มีข้อสันนิษฐานว่า TGF β 1 จะทำหน้าที่เป็น chemotactic factor ที่ชักนำให้เกิดการเคลื่อนที่ (chemotaxis) ของ PGCs ได้ จากการศึกษาของ Stebler et al. (2004) รายงานว่า SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ซึ่งเป็น growth factor เช่นเดียวกับ TGF β 1 ยังทำหน้าที่เป็น chemotactic factor ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ได้โดย SDF-1 จะทำงานผ่าน receptor ที่ชื่อ CXCR4 แล้วทำให้ PGCs สามารถรวมตัว (colonize) อยู่ที่บริเวณ genital ridges ได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้อธิบายว่า genistein น่าจะมีบทบาทไปรบกวน signaling pathway ของ chemotactic factor ชนิด TGF β 1 มากกว่า SDF-1 เนื่องจาก SDF-1 มีบทบาทต่อความอยู่รอดของ PGCs ในช่วงที่ PGCs ได้เคลื่อนที่มารวมตัวอยู่ใน genital ridges (PGCs colonization) เรียบร้อยแล้ว แต่ไม่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs (Molyneaux et al., 2003; Stebler et al., 2004)

2. Genistein อาจมีผลทางอ้อม (indirect effect) ต่อ PGCs โดยไปกระตุ้นการสะสมของสารนอกเซลล์ (extracellular materials : ECM) ได้แก่ fibronectin และ collagen fiber ที่บริเวณ hindgut และ dorsal mesentery ซึ่งเป็นเส้นทางการเคลื่อนที่ (migratory route) ของ PGCs ทำให้มีการสังเคราะห์ ECM มากขึ้น และมีผลให้ PGCs ยังคงอยู่ในบริเวณดังกล่าวโดยไม่เคลื่อนที่ต่อไปยังบริเวณ genital ridges โดยคาดว่า genistein ไปกระตุ้นกลไก TGF β -smad signaling pathway ผ่านตัวรับชนิด TGF β receptor type I ที่ชื่อ ALK5 ของกลุ่มเซลล์บริเวณ hindgut และ dorsal mesentery ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ ECM ชนิด fibronectin และ collagen type I มากขึ้น (Laping et al., 2002; Itoh et al., 2003) เนื่องจากมีรายงานว่า TGF β สามารถกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์ fibroblasts ของเอ็มบริโอไก่มีการสังเคราะห์ ECM ชนิด fibronectin และ

collagen เพิ่มขึ้น (Ignotz and Massague 1986) จากการศึกษาของ Chuva de Sousa Lopes et al. (2005) พบว่า เอ็มบริโอหนูเมาส์ที่ยื่นที่ควบคุมการสังเคราะห์ตัวรับ ALK5 ไม่ทำงาน (*Alk5^{-/-}*) มีจำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges มากกว่าเอ็มบริโอหนูเมาส์ปกติเนื่องจากบริเวณ hind gut มีปริมาณของ collagen fiber type I ลดลง จากการศึกษาในเอ็มบริโอไก่ พบว่า บริเวณ dorsal mesentery ไปจนถึงบริเวณ genital ridges พบ ECM ชนิด fibronectin และ collagen type IV ที่ทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะระหว่าง PGCs กับ ECM ระหว่างที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs ไปฝังตัวใน genital ridges (Urven et al., 1989) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ ECM บริเวณ migratory route ของ PGCs มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs และการฝังตัวใน genital ridges (D'costa et al., 2001) จึงอาจทำให้พบจำนวนของ PGCs ใน genital ridges มากขึ้นหรือน้อยลงด้วยเช่นกัน

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ไปฝังตัวใน genital ridges มี 2 ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ การชักนำจากสารเคมี (chemotaxis) และ การเปลี่ยนแปลงของ ECM ที่บริเวณ migratory route ผ่าน signaling pathway ของ TGF β 1 ที่เชื่อว่าเป็น chemotactic factor ที่ถูกหลั่งออกมาจากกลุ่มเซลล์ร่างกายบริเวณ genital ridges (Godin et al., 1990; Godin and Wylie, 1991) ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในสภาพ *in vitro* อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Chuva de Sousa Lopes et al. (2005) ในสภาพ *in vivo* ยืนยันอย่างแน่ชัดว่า TGF β 1 ไม่ได้เป็นทั้งตัวยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ PGCs และ chemotactic factor ในกระบวนการที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs เอ็มบริโอหนูเมาส์อายุ 8.5 วัน แต่ TGF β 1 มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์ ECM ตรง migratory route ของ PGCs

การศึกษาค้างนี้เป็นการศึกษาในตัวเอ็มบริโอ ดังนั้นคาดว่า genistein อาจทำให้จำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges ลดลงได้จากผลทางอ้อม (indirect effect) ของ genistein ต่อการเคลื่อนที่ PGCs ตามข้อสันนิษฐานที่ 2 มากกว่าข้อสันนิษฐานที่ 1 เนื่องจากผลการศึกษาที่ใช้ในการอ้างอิงตามข้อสันนิษฐานที่ 1 นั้นเป็นการศึกษาในสภาพ *in vitro* ทั้งสิ้น (Godin and Wylie, 1991; Richards et al., 1999 Fujioka et al., 2004) ในขณะที่ผลการศึกษาของ Chuva de Sousa Lopes et al. (2005) เป็นการศึกษาในตัวเอ็มบริโอ (*in vivo*)

นอกจาก genistein จะมีผลต่อการทำงานของ TGF β 1 หรือ TGF β 2 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์แล้ว Akiyama et al. (1987) รายงานว่า genistein ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ protein tyrosine kinase (PTK) ในการทำงานของ epidermal growth factor (EGF) receptor กับ PTK ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทต่อการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์

เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานถึงผลของ genistein หรือ endocrine disruptors ตัวอื่นที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นมาก่อนจึงขอเปรียบเทียบผลของ endocrine disruptors ต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ไม่ได้ แม้มีรายงานของ Liu et al. (2005) ซึ่งศึกษาผลของ daidzein ซึ่งเป็น phytoestrogen กลุ่มเดียวกับ genistein ที่มีต่อ ovarian germ cells ในเอ็มบริโอไก่และได้รายงานว่ daidzein สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ ovarian germ cells ของเอ็มบริโอไก่อายุ 18 วันในสภาพ *in vitro* ได้โดยออกฤทธิ์คล้ายกับ estrogen ผ่านทาง estrogen receptor (ER)

อย่างไรก็ดีไม่สามารถนำผลการศึกษาของ Liu et al. (2005) มาเปรียบเทียบกับผลของ genistein ต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นในการทดลองครั้งนี้ได้เนื่องจากระยะเวลาการพักของเอ็มบริโอที่ใช้แตกต่างกัน การออกฤทธิ์ของสารและกลไกการทำงานจึงอาจจะผ่าน pathway ที่แตกต่างกันได้ Liu et al. (2005) กล่าวว่า daidzein กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ ovarian germ cells โดยการทำงานที่ผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) ซึ่งนับเป็นข้อสันนิษฐานที่เป็นไปได้ เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถตรวจพบ mRNA ของโปรตีน ER ในเอ็มบริโอไก่ประมาณวันที่ 3.5 ถึง 4.5 ของการพัก (Smith et al., 1997) และสามารถตรวจพบ estrogen ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอในช่วงวันที่ 5.5 และ 6.5 ของการพัก และตรวจพบโปรตีน ER ในวันที่ 7.5 ของการพัก (Andrews et al., 1997) ดังนั้นการศึกษาผลของ daidzein ต่อเอ็มบริโอไก่โดยเก็บผลในวันที่ 18 ของการพักและพบว่า ovarian germ cells มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น และสันนิษฐานว่าเป็นกลไกการทำงานที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) จึงเป็นไปได้เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีน ER ได้มีการสังเคราะห์แล้ว

แต่สำหรับการศึกษาผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs มายัง genital ridges นั้นทำการเก็บผลการทดลองในวันที่ 3 ของการพัก ซึ่งเป็นระยะที่ PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวใน genital ridges สันนิษฐานว่าไม่ได้เป็นกลไกการทำงานผ่านโปรตีน ER เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาเจริญกับการผลิต mRNA ของโปรตีน ER การผลิต estrogen และการตรวจพบโปรตีน ER ในเอ็มบริโอไก่แล้ว เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นอายุ 3 วันยังไม่ควรจะมีโปรตีน ER และการทำงานของโปรตีน ER

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า genistein มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs มาฝังตัวที่ genital ridges โดยผ่านกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับ ER (ER-independent pathway) และ genistein ทำให้จำนวน PGCs ที่ genital ridges ลดลงโดยกลไกที่ทำงานผ่าน TGF β signaling pathway หรือไม่นั้นควรมีการทดลองเพื่อพิสูจน์ให้แน่ชัดต่อไป

การมี PGCs เคลื่อนที่มาฝังตัวที่ genital ridges น้อยลงอาจมีผลทำให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้น้อยลงกว่าที่ควรจะเป็นหรือนำไปสู่การเป็นหมันได้ (Zhang et al., 2002) นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองแสดงถึงผลของสารเคมีบางชนิดที่สามารถทำลาย PGCs และส่งผลให้เกิดความเป็นหมันได้ โดย Hallett and Wentworth (1991) ทำการทดลองให้ Busulfan (BU: 1,4-butanediol dimethanesulfonate) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ออกฤทธิ์จำเพาะในการทำลายเซลล์ PGCs ปริมาณ 420 ไมโครกรัม โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ของนกกระทาญี่ปุ่นก่อนการเข้าฟัก เมื่อนำอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของนกกระทาญี่ปุ่นตัวเต็มวัยอายุ 3 วันมาศึกษาไม่พบ oogonia ในเพศเมียและ spermatogonia ในเพศผู้ จากการศึกษาของ Aige-Gil and Simkiss (1991) โดยให้ BU *in ovo* แก่เอ็มบริโอไก่อายุฟัก 48 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบเอ็มบริโอเมื่ออายุฟัก 6 วัน พบว่า ความเข้มข้นของ BU ที่ใช้เป็นพิษต่อเซลล์ของ PGCs ของเอ็มบริโอไก่ (cytotoxic) ในระยะที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs และยังทำให้เอ็มบริโอไก่เกิดความเป็นหมันสูงถึง 94-100% ดังนั้นสารเคมีที่มีผลกระทบต่อจำนวนของ PGCs ในระยะเอ็มบริโออาจส่งผลให้ตัวเต็มวัยเกิดสภาวะความเป็นหมัน (sterility) ได้ในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของ genistein ที่อาจทำให้เกิดความเป็นหมันต่อเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นได้ โดยพิจารณาจากค่าดัชนีความเป็นหมัน (Index of Sterility, IS) พบว่า เอ็มบริโอที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ มีเปอร์เซ็นต์ของอัตราการเกิดความเป็นหมัน (sterility rate) เท่ากับ 19.0% และ 23.0% ตามลำดับ ในขณะที่ Mohsen and Ahmed (2002) พบว่า เอ็มบริโอไก่ที่ได้รับ Tamoxifen (ตัวยับยั้งการทำงานของ estrogen) ความเข้มข้น 200 และ 400 ไมโครกรัม *in ovo* มีเปอร์เซ็นต์ sterility rate เท่ากับ 16.0% และ 16.3% ซึ่งการทดลองดังกล่าว Mohsen and Ahmed ได้สรุปว่า Tamoxifen เป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดความเป็นหมัน (chemosterilizer) ได้ในเอ็มบริโอไก่ เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ sterility rate ของการศึกษาในครั้งนี้กับการศึกษาของ Mohsen and Ahmed แล้วมีค่าที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจก่อให้เกิดความเป็นหมันได้

อย่างไรก็ตามในขณะที่ PGCs มีการเคลื่อนที่เพื่อมาฝังตัวใน genital ridges นั้น ตัว PGCs เองยังคงมีศักยภาพในการแบ่งเซลล์อยู่ และแม้เมื่อ PGCs ฝังตัวใน genital ridges แล้วก็ยังมีศักยภาพในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ จึงยังสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเพื่อการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริออนกกระต่ายญี่ปุ่นเพศผู้

ในเอ็มบริโอสัตว์ปีก estrogen มีบทบาทสำคัญในระยะ gonadal differentiation มีการรายงานว่ เอ็มบริโอสัตว์ปีกเพศผู้ที่ได้รับสารเคมีที่ออกฤทธิ์คล้ายกันกับ estrogen (exoestrogen) ในช่วงก่อนระยะ gonadal differentiation สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) ได้ (Clinton and Haines, 1999; Brunström et al., 2003)

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่า genistein ที่ระดับความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ ทำให้จำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ของเอ็มบริออนกกระต่ายญี่ปุ่นเพศผู้อายุฟัก 8 วัน ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน ER-immunostained cells ของเอ็มบริโอกลุ่มควบคุม ในขณะที่ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ ทำให้จำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium เพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยปกติกลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายและข้างขวาของเอ็มบริโอไก่เพศผู้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในช่วงวันที่ 7 - 8 ของการฟักและหากเอ็มบริโอได้รับ estrogen หรือ exoestrogen จะมีผลทำให้จำนวนเซลล์บริเวณ germinal epithelium เพิ่มมากขึ้น (Romanoff, 1960) ดังนั้นคาดว่าที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ เป็นความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ในเชิงกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium มีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ เป็นความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ในเชิงยับยั้งการแบ่งเซลล์ด้วยกลไกการทำงานผ่าน ER ในทั้ง 2 ความเข้มข้น ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้เป็นไปในทางเดียวกับผลการทดลองของ Wang et al. (1996) ที่พบว่า genistein ความเข้มข้นต่ำ (10^{-8} - 10^{-6} โมลาร์) กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ Breast cancer (MCF-7) ในขณะที่ genistein ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 10^{-5} โมลาร์) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ MCF-7 ด้วยกลไกการทำงานผ่าน ER

จากการที่เซลล์บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายในเอ็มบริโอเพศผู้อายุฟัก 8 วันให้ผลบวกในการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน ER (ER-positive cells) และความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลทั้งในเชิงเพิ่มและลดจำนวน ER-immunostained cells (biphasic effects) ทำให้เชื่อว่ากลุ่มเซลล์บริเวณนี้เป็นกลุ่มเซลล์เป้าหมายของ estrogen (estrogen target cells) (González-Morán, 2005) ที่ทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ estrogen receptor (ER) จึงทำให้ genistein ซึ่งเป็นตัวรบกวนการทำงานของ estrogen (estrogen mimic) สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งกระตุ้นการเพิ่มและลดจำนวน ER-immunostained

cells และการสังเคราะห์โปรตีน ER ของกลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium ได้ สันนิษฐานว่า genistein ที่ระดับความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. Genistein ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเข้าไปจับกับโปรตีน ER ที่อยู่ภายในเซลล์บริเวณ germinal epithelium ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย แล้วกระตุ้นให้เซลล์บริเวณ germinal epithelium ผลิตโปรตีน ER เพิ่มขึ้น (Anderson et al., 1999) ทำให้พบจำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium เพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายหลังจากที่ได้รับ genistein ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ

2. Genistein ที่ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีกลไกการทำงานคล้ายกับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ แต่มีความแตกต่างกันโดยคาดว่า genistein ที่ความเข้มข้นนี้สูงมากพอที่ทำให้มีปริมาณของ genistein ที่จะสามารถแย่ง estrogen ในการจับกับโปรตีน ER แล้วออกฤทธิ์เป็นตัวต้านการทำงานของ estrogen (anti-estrogenic effect) ทำให้เซลล์บริเวณ germinal epithelium สังเคราะห์โปรตีน ER น้อยลง (Anderson et al., 1999) ในขณะที่ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ อาจมีปริมาณในระดับที่ไม่แย่ง estrogen ในการจับกับโปรตีน ER จึงออกฤทธิ์เป็นตัวเสริมการทำงานของ estrogen (estrogenic effect) จากผลของ genistein ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของจำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium นี้คาดว่าเป็นการทำงานของ genistein แบบ biphasic effect ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาของ Jefferson et al. (2002) ที่พบว่า หนูเม้าส์แรกคลอดที่ได้รับ genistein จากการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังปริมาณ 1 ไมโครกรัม/ตัว/วัน มีปริมาณโปรตีน ER ที่รังไข่มากกว่าหนูเม้าส์แรกคลอดที่ได้รับ genistein ปริมาณ 10 ไมโครกรัม/ตัว/วัน จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค immunohistochemistry

อาจกล่าวได้ว่าผลของ genistein ที่มีต่อกลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิดจากการทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) โดยสามารถยืนยันข้อเสนอดังกล่าวได้จากการยับยั้งด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ER ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้พบ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ ในขณะที่ Andrews et al. (1997) ไม่พบ ER-immunostained cells ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอไก่เพศผู้จากการยับยั้งด้วยเทคนิค immunohistochemistry คาดว่าผลการทดลองของ Andrews et al. (1997) ขัดแย้งกับผลการทดลองในครั้งนี้เนื่องจากการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ER ต่างชนิด (ER subtypes) และได้แอนติบอดีมาจากต่าง clone ในการทดลองครั้งนี้ใช้ mouse monoclonal antibody, clone AER304 ซึ่งเป็น clone ที่

นิยมใช้กันในทางการค้า (commercial clone) ที่สามารถจับกับโปรตีน ER ของไก่ (chicken cross reactivity) ในขณะที่ Andrews et al. (1997) ใช้ rat monoclonal antibody, clone H22Spy ที่สามารถจับกับโปรตีน ER ของสัตว์ปีก (avian cross reactivity) นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ใช้เทคนิคการกระตุ้น antigen (antigen retrieval) เพื่อให้ antibody สามารถจับกับ antigen ได้เพิ่มขึ้นด้วยวิธี microwave ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก จึงทำให้การศึกษาในครั้งนี้สามารถตรวจพบ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ได้

เอ็มบริโอไก่อายุประมาณวันที่ 7.5 ของการฟักมีการแสดงออกของยีน ER ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายมากกว่าข้างขวาในเอ็มบริโอทั้งสองเพศแต่สามารถตรวจพบ mRNA ของยีน ER และโปรตีน ER ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายในเอ็มบริโอเพศเมียมากกว่าเอ็มบริโอเพศผู้ (Andrews et al., 1997; Smith et al., 1997; Nakabayashi et al., 1998) การที่เอ็มบริโอเพศเมียสามารถตรวจพบ mRNA ของยีน ER และโปรตีน ER ที่บริเวณดังกล่าวได้มากกว่าเอ็มบริโอเพศผู้เนื่องจากการทำงานร่วมกันของ estrogen กับ ER มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้บริเวณ germinal epithelium เจริญไปเป็นชั้น cortex ที่หนาของรังไข่ (thick ovarian cortex) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของรังไข่ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศเมีย (Nakabayashi et al., 1998; González-Morán, 2005)

สำหรับเอ็มบริโอเพศผู้เริ่มตรวจพบ mRNA ของยีน ER ได้ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายในวันที่ 7 ของการฟัก (Nakabayashi et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่สามารถตรวจพบโปรตีน ER ได้ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ในวันที่ 8 ของการฟัก อย่างไรก็ตามอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างขวาของเอ็มบริโอเพศผู้ก็มี mRNA ของยีน ER ด้วยเช่นกันแต่มีในปริมาณที่น้อยกว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายมาก (Andrews et al., 1997)

ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้จึงสอดคล้องข้อเสนอที่ว่า ผลของ genistein ที่มีต่อกลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium เกิดจากการทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) และเป็นรายงานครั้งแรกที่สามารถตรวจพบ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอในกระเพาะปัสสาวะเพศผู้

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น เพศผู้และเพศเมีย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเป็นตัวแบบ (model) เพื่อทดสอบผลของ genistein ที่สามารถออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับ estrogen (estrogenic effect) ต่อระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น จากการให้ genistein โดยตรงในไข่ (*in ovo*) ด้วยการฉีดสารผ่านบริเวณที่เป็นไข่แดง (yolk sac injection) ก่อนการเข้าฟัก (วันที่ 0 ของการฟัก) พบว่า genistein สามารถชักนำให้อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ (reproductive organs) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเกิดความผิดปกติ ผลของความผิดปกติในครั้งนี้จากกล่าวได้ว่าเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นสามารถนำ genistein เข้าสู่ตัวเอ็มบริโอได้ในระดับที่สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติ (effective doses) ต่อการเจริญของ reproductive organs

ความแตกต่างของเพศ (sexual differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นสามารถสังเกตได้จากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonads) ประมาณวันที่ 8 ของการฟัก (สิทธิพล และคณะ 2547ก) อวัยวะของระบบสืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นที่นำมาศึกษาถึงผลของ genistein ในครั้งนี้ได้แก่ มุลเลอร์เรียน ดักส์ (Müllerian Ducts : MDs) ของเอ็มบริโอเพศเมีย และอัณฑะข้างซ้าย (left testis) ของเอ็มบริโอเพศผู้ เนื่องจากการได้มีการศึกษาผลของ exoestrogen ที่ทำให้เกิด estrogenic effects ได้แก่ *o,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (*o,p'*-DDT), Ethynylestradiol (EE₂), Diethylstilbestrol (DES), Bisphenol A (BPA) และ Tetrabromobisphenol A (TBBPA) ซึ่งก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการเจริญของอวัยวะดังกล่าวเอาไว้แล้วเป็นอย่างดี (Berg et al., 1998; Berg et al., 1999; Berg et al., 2001; Shibuya et al., 2004; Shibuya et al., 2005)

การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่า genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ สามารถชักนำให้อัณฑะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิดโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovotestis) และ MDs ของเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียเกิดความผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวแปรตามความเข้มข้นของ genistein (dose-dependent manner) จากความผิดปกติที่เกิดขึ้นต่ออวัยวะดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการเป็นตัวบ่งชี้การเกิด estrogenic effect ของ genistein ได้ ตัวบ่งชี้ของการเกิด estrogenic effect ของ genistein ที่ดีที่สุดในการศึกษานี้คือการเปลี่ยนแปลงของอัณฑะข้างซ้ายที่ปรากฏโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovotestis) ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้คล้ายกับความผิดปกติที่ Fry and Toone (1981) พบในเอ็มบริโอของ California gull เพศผู้ที่ได้รับ *o,p'*-DDT ความเข้มข้น 20

ไมโครกรัม/กรัม ไซ *in ovo* ก่อนการเข้าฟัก ทำให้ MDs ทั้งสองข้างยังคงอยู่และอันตะเกิด ovotestis ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นเครื่องบ่งชี้การเกิดสภาพของเพศเมีย (feminization)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิด ovotestis ของอันตะข้างซ้ายของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้ที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไซ มีค่าเท่ากับ 86% และ 85% ตามลำดับซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การเปลี่ยนแปลงสภาพของอันตะข้างซ้ายไปเป็น ovotestis ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้เกิดเนื่องจากการมีระดับของ estrogen หรือ exoestrogen ที่สูงกว่าระดับฮอร์โมน androgen มากในขณะที่กำลังมี gonadal differentiation จากทฤษฎี dihormonal theory ของ Willier (1952) กล่าวว่า ฮอร์โมนสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศเมียจะสังเคราะห์ estrogen มากกว่า androgen ในขณะที่เอ็มบริโอเพศผู้จะสังเคราะห์ androgen มากกว่า estrogen ซึ่งปริมาณของ androgen ที่มากกว่าจะไปกระตุ้นการเจริญของเซลล์ในชั้น medulla และยับยั้งการเจริญของเซลล์ในชั้น cortex ดังนั้นการเกิด ovotestis ที่อันตะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ อาจเกิดจาก genistein ทำหน้าที่เสริมการทำงานของ estrogen (estrogen agonist) หรือกระตุ้นให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศผู้มีการสังเคราะห์ estrogen ส่งผลให้เอ็มบริโอเพศผู้มีระดับของ estrogen สูงขึ้น เนื่องจากการรายงานที่ อันตะข้างซ้ายของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นที่เกิด ovotestis ภายหลังจากที่ได้รับ DES *in ovo* มีการสร้าง estrogen ได้สูงกว่า androgen เมื่อเปรียบเทียบกับอันตะของเอ็มบริโอเพศผู้ปกติที่สร้าง androgen ได้สูงกว่า (Scheib and Reys-Bron, 1979; Teng and Teng, 1979)

กลไกการทำงานของ genistein ที่ทำให้อันตะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิด ovotestis ได้นั้นสันนิษฐานว่า genistein ออกฤทธิ์ในเชิง estrogenic effect ต่้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ตั้งแต่ในระยะ gonadal differentiation โดยการจับกับโปรตีน ER ที่อยู่ในเซลล์บริเวณ germinal epithelium แล้วกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ชั้น cortex ของอันตะข้างซ้ายหนาขึ้น เนื่องจากการรายงานที่ บริเวณ germinal epithelium ของอันตะข้างซ้ายของเอ็มบริโอไก่เกิดเป็นชั้น cortex ที่หนาขึ้น ภายหลังจากที่เอ็มบริโอได้รับ exoestrogen *in ovo* (Fry and Toone, 1981; Perrin et al., 1995; Berg et al., 1998; Berg et al., 1999, Berg, 2000; Berg et al., 2001; Shibuya et al., 2004; Shibuya et al., 2005) ผลที่เกิด ovotestis ขึ้นสามารถยืนยันได้จากจำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium เพิ่มขึ้นภายหลังจากที่เอ็มบริโอได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไซ นอกจากการเพิ่มจำนวนของ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เอ็มบริโอมีอันตะข้างซ้ายที่หนาแล้ว คาดว่ายังทำให้ชั้น cortex ที่หนาตัวเกิดโครงสร้างทางเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

เพศเมีย (cortical tissue) อีกด้วย การที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิด ovotestis ได้นั้น อาจเกิดจากกลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium มีปริมาณของโปรตีน ER มากพอที่ทำให้ทั้ง estrogen ในเอ็มบริโอเพศผู้ที่มีปริมาณน้อยกว่าในเอ็มบริโอเพศเมียในสภาวะปกติ (Willier, 1952; Woods and Erton, 1978) และ genistein ที่เอ็มบริโอได้รับสามารถจับกับโปรตีน ER ได้มากขึ้นแล้วชักนำให้อัณฑะข้างซ้ายเกิด ovotestis โดยมีลักษณะทางเนื้อเยื่อของชั้น cortex ที่บ่งบอกสภาพความเป็นเพศเมีย (feminization) มีการรายงานที่เอ็มบริโอไก่เพศผู้ที่ได้รับ 17β -estradiol *in ovo* ในระยะ gonadal differentiation ทำให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการสังเคราะห์ mRNA ของยีน ER บริเวณ germinal epithelium เพิ่มขึ้นและอัณฑะข้างซ้ายเกิด ovotestis (Nakabayashi et al., 1998) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าผลของ genistein ที่ทำให้อัณฑะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิด ovotestis เกิดจากการทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway)

นอกจาก genistein จะมีผลทำให้อัณฑะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิด ovotestis แล้วในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า genistein มีผลทำให้ MDs เกิดความผิดปกติในเอ็มบริโอทั้งสองเพศ คาดว่า genistein มีกลไกการทำงานที่ทำให้ MDs เกิดความผิดปกติตามข้อสันนิษฐานดังต่อไปนี้

1. การคงอยู่ของ MDs ในเอ็มบริโอเพศผู้ โดยปกติในเอ็มบริโอเพศผู้ MDs ทั้งสองข้างจะสลายไป (regression) จนหมดในวันที่ 12 ของการฟัก (Teng, 1987) ด้วยอิทธิพลของ anti-Müllerian hormone (AMH) หรือ Müllerian inhibiting substance (MIS) ที่ถูกสร้างจากอัณฑะทั้ง 2 ข้างของเอ็มบริโอเพศผู้ (Hutson et al., 1981; Teng, 1987) คาดว่า การที่ MDs ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ยังคงอยู่เพียงข้างเดียวนั้นเกิดจาก genistein สามารถต้าน (against) การทำงานของ MIS ที่ตำแหน่งของ MDs โดย genistein ออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับ estrogen (estrogenic effect) ด้วยการจับกับโปรตีน ER ภายในเซลล์ของ MDs ในระยะที่เริ่มจะมีการสลายของ MDs แล้วทำหน้าที่เป็น transcription factor กระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ basement membrane ของ MDs ได้แก่ laminin และ collagen type IV (Ikawa et al., 1984) เนื่องจาก estrogen มีบทบาทในการป้องกันการสลายตัวของ MDs ข้างซ้าย (MDs regression) จากการศึกษาของ MacLaughlin et al. (1983) พบว่า MDs ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียมีโปรตีน ER มากกว่า MDs ข้างขวา และสามารถยืนยันได้ว่า MDs เป็นอวัยวะเป้าหมายของ estrogen (Hutson et al., 1982) ในการป้องกันการสลายตัวของ MDs ได้จากการศึกษาของ Doi and Hutson (1988) ซึ่งพบว่า เอ็มบริโอไก่เพศผู้ที่ได้รับ Diethylstilbestrol (DES) *in ovo* ในวันที่ 5 ของการฟักมี MDs ข้างซ้ายคงอยู่ (retention) โดย DES ออกฤทธิ์ผ่านโปรตีน ER ภายในเซลล์ของ MDs สำหรับ MDs ข้างขวาพบว่ายังคงอยู่เช่นเดียวกันแต่เหลือน้อยมากเมื่อเทียบกับ MDs ข้างซ้ายเนื่องจาก MDs ข้างขวามีโปรตีน ER

น้อยกว่าข้างซ้าย (MacLaughlin et al., 1983) genistein จึงออกฤทธิ์ให้ MDs ข้างขวาคงอยู่น้อยกว่า MDs ข้างซ้าย ดังนั้นอาจกล่าวได้ผลของ genistein ที่ทำให้ MDs ของเอ็มบริโอเพศผู้ยังคงอยู่เกิดจากการทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway)

นอกจาก genistein ทำให้ MDs ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้คงอยู่แล้ว genistein ยังทำให้เกิด cyst-like structure ที่มีลักษณะเป็นก้อนเนื้ออยู่บน Wolffian ducts (WDs) ทั้ง 2 ข้าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Willier et al. (1935) ที่พบว่า เอ็มบริโอเพศผู้ที่ได้รับ theelin (สารที่ออกฤทธิ์คล้ายกับ estrogen ที่ถูกสร้างจากรังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม *in ovo* ในวันที่ 2 ของการฟัก มีการคงอยู่ของ MDs ที่มีลักษณะเป็นก้อน (cyst-like structure) อยู่ทั้ง 2 ข้างของ WDs นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Berg et al. (1999) ที่พบว่า เอ็มบริโอทารกกระทิงป่าเพศผู้ที่ได้รับ DES ความเข้มข้น 2 นาโนกรัม/กรัม ไข่ *in ovo* ในวันที่ 3 ของการฟัก มีการคงอยู่ของ MDs ที่มีลักษณะเป็นก้อนอยู่ทั้ง 2 ข้างภายในช่องท้อง

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงกลไกของการเกิด cyst-like structure บริเวณ WDs ของเอ็มบริโอสัตว์ปีกเพศผู้ แต่สันนิษฐานว่า genistein ที่ใช้ในการศึกษานี้ทำให้เกิด cyst-like structure ได้โดยอาจไปกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์บริเวณ WDs มีวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ที่ผิดปกติและทำให้กลุ่มเซลล์บริเวณ WDs มีการแบ่งเซลล์มากกว่าปกติส่งผลให้พบลักษณะของก้อนเนื้อ (cyst) เกิดขึ้นที่ WDs

2. การคงอยู่ของ MDs ในเอ็มบริโอเพศเมีย โดยปกติในเอ็มบริโอเพศเมีย MDs ข้างขวาจะสลายไป (regression) ด้วยอิทธิพลของ anti-Müllerian hormone (AMH) หรือ Müllerian inhibiting substance (MIS) ที่ถูกสร้างจากรังไข่ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศเมีย (Hutson et al., 1981) คาดว่า การที่ MDs ข้างขวาของเอ็มบริโอเพศเมียยังคงอยู่แต่ไม่สมบูรณ์นั้นเกิดจาก genistein ออกฤทธิ์ผ่านกลไกเช่นเดียวกับข้อสันนิษฐานที่ 1 อย่างไรก็ตามการคงอยู่ของ MDs ข้างขวาของเอ็มบริโอเพศเมียที่ได้รับ genistein เป็นแบบไม่สมบูรณ์ (partially MDs retention) เมื่อเปรียบเทียบกับ MDs ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศเมียกลุ่มควบคุมที่ MDs คงอยู่อย่างสมบูรณ์ (completely MDs retention) ตามปกติ เนื่องจากรังไข่ข้างขวาเกิดการสลายตัวจึงทำให้ขาดแหล่งสร้าง estrogen ที่จะช่วยในการป้องกันการสลายตัวของ MDs (Hutson et al., 1982; Doi and Hutson, 1988) จาก anti-Müllerian hormone (AMH) หรือ Müllerian inhibiting substance (MIS) ที่ถูกสร้างจากรังไข่ข้างซ้าย (Hutson et al., 1981) นอกจากนี้ยังสันนิษฐานว่า การที่ genistein ทำให้ MDs ข้างขวาคงอยู่อาจเกิดจากการออกฤทธิ์แบบ estrogenic effect โดยทำงานผ่านโปรตีน ER ตามข้อสันนิษฐานที่กล่าวมาแล้ว ยังคาดว่า genistein เมื่อมาจับกับโปรตีน ER ภายในเซลล์ของ MDs ข้างขวาแล้วอาจมีการส่งสัญญาณไปทำให้การสังเคราะห์ mRNA ของยีน

MMP-2 (metalloproteinase-2) ที่จะสร้างเอนไซม์ MMP-2 ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีนใน ECM บริเวณ basement membrane ของ MDs (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1999; Vu and Werb, 2000) ลดลงเพียงบางส่วน จึงทำให้ MDs ข้างขวายังคงอยู่อย่างไม่สมบูรณ์ (partially MDs retention) จากการศึกษาของ Ha et al. (2004) พบว่า เอ็มบริโอไก่ที่ได้รับ DES *in ovo* ในวันที่ 4 มี MDs ข้างขวาคงอยู่เนื่อง DES ทำให้ระดับ mRNA ของยีน MMP-2 ที่ MDs ข้างขวา ลดลง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าผลของ genistein ที่ทำให้ MDs ข้างขวาของเอ็มบริโอเพศเมียยังคงอยู่เกิดจากการทำงานผ่านกลไกที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) เช่นเดียวกัน

ความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัมไข่) มีศักยภาพสูงกว่า Bisphenol A (BPA) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติก ในการชักนำให้เกิดความผิดปกติของ reproductive organs ของเอ็มบริโอในนกกระทาญี่ปุ่น จากการศึกษาของ Berg et al. (2001) รายงานว่า เอ็มบริโอในนกกระทาญี่ปุ่นทั้งเพศผู้และเพศเมีย ที่ได้รับ BPA ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/กรัมไข่ *in ovo* ในวันที่ 3 ของการฟัก BPA ทำให้ MDs ของเอ็มบริโอในนกกระทาญี่ปุ่นทั้งสองเพศเกิดความผิดปกติและชักนำให้เกิด ovotestis ใน เอ็มบริโอไก่ ได้มีการศึกษาถึงศักยภาพของ xenoestrogens และ phytoestrogens ในการจับกับ ER ของนกกระทาญี่ปุ่นพบว่า genistein มีศักยภาพในการจับทั้ง ER α และ ER β ได้สูงกว่า BPA (Hanafy et al., 2004; Hanafy et al., 2005) ดังนั้นจากการศึกษาของ Hanafy et al. (2004) และ Hanafy et al. (2005) จึงสนับสนุนกับคำกล่าวข้างต้นที่ว่า genistein มีศักยภาพสูงกว่า BPA ทั้งในการจับกับ ER และการเกิด estrogenic effect ต่อ reproductive organs ของ เอ็มบริโอในนกกระทาญี่ปุ่น

Endocrine disruptors ส่วนใหญ่ละลายได้ใน lipid (lipophilic substances) (Brunström and Öberg 1982; Berg, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการฉีด genistein *in ovo* ผ่านบริเวณที่เป็นไข่แดง (yolk) เนื่องจาก yolk มีองค์ประกอบเป็นพวก lipid และเป็นเส้นทางที่ เอ็มบริโอจะนำไปใช้เป็นสารอาหารในการเจริญ อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงตามธรรมชาติ โอกาสที่เอ็มบริโอจะได้รับ genistein ในปริมาณที่มากเช่นในการศึกษาค้างนี้อาจมีน้อยมาก ยกเว้นในกรณีที่แม่นกกระทาได้รับ genistein จากถั่วเหลืองซึ่งใช้เป็นอาหารเลี้ยงแต่เพียงอย่างเดียวติดต่อกันเป็นเวลานาน หรือแม่นกกระทาอาจมีความผิดปกติของระบบย่อยอาหารที่สามารถ นำ genistein ผ่านเข้าเซลล์ได้มากผิดปกติ แล้วถูกลำเลียงไปตามกระแสเลือดในระยะที่มีการ สะสม yolk (vitellogenesis)

ถึงแม้ว่ามีโอกาสน้อยที่เอ็มบริโอจะได้รับปริมาณของ genistein มากเกินไปผ่านทาง การกินถั่วเหลืองจากตัวแม่ แต่จากการรายงานในเอ็มบริโอสัตว์ปีกพบว่า เอ็มบริโอในนกกระทาญี่ปุ่นมีความเสี่ยงที่จะได้รับ genistein ในปริมาณมากจนเกินไปจากการกินถั่วเหลืองของแม่นก

กระทำ โดยแม่จนกระทั่งที่ได้รับ genistein จากการกินเข้าไป genistein จะถูกลำเลียงไปตามกระแสเลือดแล้วไปสะสมที่ yolk (Lin et al., 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาในไก่ที่พบว่า แม่ไก่ที่กินถั่วเหลืองที่มีสารพวก isoflavones มากจะถูกลำเลียงตามกระแสเลือดแล้วไปสะสมที่ yolk ด้วยเช่นกัน (Saitoh et al., 2001; Saitoh et al., 2004) สำหรับในเอ็มบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โอกาสที่เอ็มบริโอจะได้รับ genistein มาจากการได้รับผ่านทางรก (placental transfer) (Doerge et al., 2001) หรือจากการดูดนมแม่ (lactational transfer) (Fritz et al., 1999, Lewis et al., 2003)

จากการทดลองในครั้งนี้อยู่ในไข่แดงสามารถส่งผลกระทบต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญไปจนถึงระยะสุดท้ายของการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ โดย genistein มีการทำงานผ่านกลไกที่แตกต่างกันในแต่ละระยะดังนี้

ระยะแรก (PGCs migration) genistein มีกลไกการทำงานที่ไม่ขึ้นกับตัวรับของ ER (ER-independent pathway) เนื่องจากเอ็มบริโอในระยะนี้ยังไม่มีฮอร์โมน estrogen ดังนั้นการทำงานของ genistein ในระยะนี้จึงไม่เป็นการออกฤทธิ์ในเชิงเสริมการทำงาน (agonist) และในเชิงยับยั้งการทำงาน (antagonist) ต่อ estrogen ซึ่งผลของ genistein ในระยะนี้สันนิษฐานว่าเป็นผลในเชิงกระตุ้นการทำงานของ TGF β 1 ให้มีการสังเคราะห์ ECM ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs เพิ่มมากขึ้น ทำให้ PGCs สะสมอยู่ตรงบริเวณ migratory route ไม่เคลื่อนที่ต่อไปยังบริเวณ genital ridges จึงพบจำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ระยะที่สอง (Gonadal differentiation) genistein มีกลไกการทำงานที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) เนื่องจากเอ็มบริโอในระยะนี้มีการสังเคราะห์ estrogen เกิดขึ้นแล้วสันนิษฐานว่า genistein ไปกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium ให้สังเคราะห์โปรตีน ER เพิ่มขึ้น ทำให้ genistein จับกับโปรตีน ER ร่วมกันกับ estrogen ในการออกฤทธิ์เสริมการทำงานของ estrogen (estrogen agonist) ส่งผลให้พบจำนวน ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเอ็มบริโอที่ได้รับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ สำหรับผลของ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม สันนิษฐานว่ามีการทำงานที่ตรงข้ามกับ genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ (biphasic effect)

ระยะสุดท้าย (Gonadal growth and maturation) genistein มีกลไกการทำงานที่ขึ้นกับ ER (ER-dependent pathway) อย่างชัดเจน เนื่องจากการเจริญของ reproductive organs ในระยะนี้อยู่ภายใต้การทำงานของ estrogen ซึ่งผลของ genistein ที่มีต่อเอ็มบริโอในระยะนี้

สันนิษฐานว่า genistein ทำให้ัณฑะข้างซ้ายเกิด ovotestis โดยออกฤทธิ์เสริมการทำงานของ estrogen (estrogen agonist) กระตุ้นให้เซลล์บริเวณ germinal epithelium แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดชั้น cortex ที่หนา นอกจากนี้ genistein ยังช่วยเสริมระดับของ estrogen ที่ัณฑะข้างซ้ายให้สูงขึ้น ส่งผลให้ชั้น cortex ที่หนาเกิดโครงสร้างทางเนื้อเยื่อเป็นเพศเมีย (ovotestis) ซึ่งบ่งชี้การเกิดสภาพความเป็นเพศเมีย (feminization) ของเอ็มบริโอเพศผู้ สำหรับผลของ genistein ที่มีต่อการคงอยู่ของ MDs ทั้งในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียสันนิษฐานว่า genistein ออกฤทธิ์เสริมการทำงานของ estrogen (estrogen agonist) โดยจับกับโปรตีน ER ภายในเซลล์ของ MDs แล้วกระตุ้นให้ MDs มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและทำให้ mRNA ของยีน MMP-2 ที่สังเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ลดลง ทำให้มีเอนไซม์ MMP-2 ที่จะย่อย ECM บริเวณ basement membrane ของ MDs ลดลง ส่งผลให้ MDs ของเอ็มบริโอคงอยู่ (MDs retention)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และผลของ genistein ต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอของกบกระต่ายญี่ปุ่น สรุปได้ดังนี้

- การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal development) ของเอ็มบริโอของกบกระต่ายญี่ปุ่น (*Coturnix japonica*)

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอของกบกระต่ายญี่ปุ่นประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cell migration) เป็นการเคลื่อนที่ของ PGCs จากแหล่งกำเนิดนอกตัวเอ็มบริโอ (extraembryonic region) มาฝังตัวในตำแหน่งที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges) เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 1-2 วัน
2. การเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมีย (Gonadal differentiation) เป็นระยะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมีย จากระยะที่ไม่สามารถแยกเพศได้ (indifferent stage) จนถึงระยะที่สามารถแยกเพศของเอ็มบริโอได้ด้วยลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เกิดในเอ็มบริโอระยะฟัก 6-8 วัน
3. การเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) เป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นของกลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ และกลุ่มเซลล์ร่างกายที่อยู่ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ส่งผลให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดในเอ็มบริโอระยะ 11-15 วัน

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges)

PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นให้ผลบวก (positive cells) ภายหลังจากการย้อมด้วย WFA lectin (*Wisteria floribunda* Agglutinin) และพบ positive PGCs ได้ที่บริเวณ genital ridges ทั้งสองข้าง ซึ่ง WFA lectin สามารถนำมาใช้เป็น marker ในการหาตำแหน่ง PGCs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นในช่วงที่มีการเคลื่อนที่ของ PGCs (PGCs migration) ได้

Genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถส่งผลกระทบต่อการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นได้ตั้งแต่ในระยะแรก (PGCs migration) โดยทำให้จำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges ลดลง และมีดัชนีที่บ่งบอกความเป็นหมัน (Index of sterility) ในระดับต่ำ ซึ่งเป็นผลที่ขึ้นกับความเข้มข้นของ genistein (dose-dependent manner) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ไม่น้อยที่เปอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นหมันของเอ็มบริโอที่เป็นผลจาก genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้นของการศึกษาในครั้งนี้จะส่งผลให้ตัวเต็มวัยเกิดความเป็นหมัน

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้

กลุ่มเซลล์บริเวณ germinal epithelium ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ข้างซ้ายของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้เป็นกลุ่มเซลล์เป้าหมายของ estrogen ทำให้พบ ER-immunostained cells ได้ที่บริเวณ germinal epithelium ภายหลังจากการย้อมโปรตีน ER ด้วยเทคนิค immunohistochemistry

Genistein ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ ทำให้จำนวนของ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่ genistein ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ ทำให้จำนวนของ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ลดลง ซึ่งผลของ genistein ที่มีต่อจำนวน ER-immunostained cells นี้เป็นผลที่แปรตามความเข้มข้นของ genistein (dose-dependent manner) ซึ่งในระยะนี้ genistein สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้ง 2 แบบ (biphasic effect) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของ ER-immunostained cells ที่บริเวณ germinal epithelium ที่เกิดจาก genistein ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/กรัม ไข่ อาจใช้เป็นจุดสังเกตของการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) ของเอ็มบริโอในระยะ gonadal differentiation ได้

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริออนกระต่ายปุ่นเพศผู้และเพศเมีย

Genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับ estrogen (estrogenic effects) โดยส่งผลให้เกิดความผิดปกติทั้งในระดับกายวิภาคและระดับเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ (reproductive organs) ในระดับกายวิภาค genistein ทำให้ Müllerian ducts ของเอ็มบริออนกระต่ายปุ่นทั้งสองเพศยังคงอยู่ (MDs retention) ในระดับเนื้อเยื่อ genistein ทั้ง 2 ความเข้มข้น (16 และ 24 ไมโครกรัม/กรัม ไข่) ทำให้ลักษณะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิดโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovotestis) อาจสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เอ็มบริโอเพศผู้เกิดสภาพความเป็นเพศเมีย (feminization) และทำให้เกิดความผิดปกติของ MDs ทั้งในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งการคงอยู่ของ MDs ในเอ็มบริโอเพศผู้และเพศเมียสามารถใช้เป็นจุดวัด (end point) ในการทดสอบการออกฤทธิ์แบบ estrogenic effect ของ genistein นอกจากนี้การเกิด ovotestis ที่ลักษณะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้ยังสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้การเปลี่ยนเพศและการออกฤทธิ์แบบ estrogenic effect ของ genistein ที่มีต่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริออนกระต่ายปุ่นในระยะนี้ได้ ดังนั้นความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นระดับความเข้มข้นที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติ (adverse effect levels หรือ effective doses) ต่อ reproductive organs ของเอ็มบริออนกระต่ายปุ่น

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้มีข้อเสนอแนะสำหรับแต่ละหัวข้อของการศึกษาดังต่อไปนี้

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells migration) มายังบริเวณที่จะมีการเจริญเป็นอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (genital ridges)

เพื่อยืนยันข้อสันนิษฐานที่ว่า genistein ทำให้จำนวน PGCs ที่บริเวณ genital ridges ลดลงเกิดจากการทำงานของ genistein ที่กระตุ้นการทำงานของ TGF β 1 ให้มีการสังเคราะห์ ECM ที่มีบทบาทต่อการเคลื่อนที่ของ PGCs เพิ่มมากขึ้น ทำให้ PGCs สะสมอยู่ตรงบริเวณ migratory route ไม่เคลื่อนที่ต่อไปยังบริเวณ genital ridges ควรทำการศึกษาต่อไปว่าที่บริเวณ migratory route มีปริมาณโปรตีน TGF β 1 เพิ่มขึ้นได้โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ที่ย้อมกลุ่มเซลล์บริเวณ migratory route ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน TGF β 1 แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีโปรตีน TGF β 1 ของกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หรืออาจใช้เทคนิคอณูชีววิทยาในการตรวจสอบปริมาณ mRNA ของยีน TGF β 1 บริเวณ migratory route ที่คาดว่าอาจจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากที่เอ็มบริโอได้รับ genistein เข้าไป

สำหรับการตรวจสอบว่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีความเป็นหมันของเอ็มบริโอที่ได้รับ genistein เข้าไปจะส่งผลให้ตัวเต็มวัยเกิดความเป็นหมันได้จริง อาจทำได้โดยรอให้เอ็มบริโอเจริญเป็นตัวเต็มวัย ในระยะที่สามารถผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้แล้วจึงทำการนับเซลล์สืบพันธุ์ (gamete counting) ของกลุ่มที่ได้รับ genistein เปรียบเทียบกับตัวเต็มวัยปกติเพื่อยืนยันว่าตัวเต็มวัยผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้ต่ำกว่าปกติ ซึ่งวิธีการนี้มีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาเวลานานกว่าที่จะให้เอ็มบริโอเจริญเป็นตัวเต็มวัย จนถึงระยะที่ผลิตเซลล์สืบพันธุ์ได้

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal differentiation) ของเอ็มบริออนกระต่ายป่าเพศผู้

การใช้เทคนิค immunohistochemistry ในการย้อมโปรตีน ER บริเวณ germinal epithelium เพื่อตรวจสอบว่า genistein มีผลทำให้เอ็มบริโอเพศผู้เกิดการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) ได้หรือไม่ นั้นค่อนข้างมีปัจจัยจำกัดหลายอย่างเช่น ชนิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ER ของเอ็มบริโอชนิดนั้นๆ และการตรวจสอบการเปลี่ยนเพศของเอ็มบริโอที่ระดับโปรตีนนั้นอาจมีข้อด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตรวจสอบที่ระดับยีน ดังนั้นการตรวจสอบว่า genistein มีผลในระยะ

gonadal differentiation ต่อเอ็มบริโอเพศผู้โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศที่ระดับของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่นั้นควรทำการศึกษาต่อไปในระดับ mRNA เช่น การที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เกิดการเปลี่ยนเพศไปเป็นเพศเมียภายหลังจากที่ได้รับ genistein อาจมีระดับของ mRNA ของยีน ER ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศผู้มากขึ้น ซึ่งอาจทำการตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization เพื่อดูการแสดงออกของยีน ER ได้จากเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรืออาจตรวจสอบยีน aromatase ที่สร้างเอนไซม์ aromatase ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์ estrogen ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization ได้เช่นเดียวกัน

- ผลของ genistein ที่มีต่อการเติบโตและการเจริญเต็มที่ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และระบบสืบพันธุ์ (Gonadal growth and maturation) ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเพศผู้และเพศเมีย

เพื่อยืนยันข้อสันนิษฐานที่ว่า genistein ทำให้ MDs ของเอ็มบริโอคงอยู่ด้วยการทำให้ mRNA ของยีน MMP-2 ที่สังเคราะห์เอนไซม์ MMP-2 ลดลง อาจทำได้ด้วยการเปรียบเทียบการแสดงออกของ mRNA ของยีน MMP-2 โดยการเก็บเอา MDs ของเอ็มบริโอกลุ่มที่ได้รับ genistein กับกลุ่มควบคุมมาทำการสกัดเอา mRNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามขั้นตอนของเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่อไป

ความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษานี้ทำให้ลักษณะข้างซ้ายของเอ็มบริโอเพศผู้เกิด ovotestis ซึ่งยังคงมีลักษณะร่วมของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียที่เป็นการบ่งบอกสภาพความเป็นเพศเมีย (feminization) แต่เพียงบางส่วน (partially sex reversed) ดังนั้นหากต้องการใช้ genistein เป็นสารเคมีในการชักนำให้เอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นเกิดการเปลี่ยนเพศจากเพศผู้ไปเป็นเพศเมียเพื่อต้องการเพิ่มผลผลิตไข่ ควรปรับความเข้มข้นของ genistein ให้สูงขึ้นในระดับที่สามารถชักนำให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอเพศผู้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรังไข่ได้อย่างสมบูรณ์ (completely sex reversed) ซึ่งความเข้มข้นของ genistein ที่ใช้ในการศึกษานี้เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษาพยาธิสภาพของ reproductive organs มากกว่าที่จะนำมาใช้เป็นสารเคมีในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนเพศอย่างสมบูรณ์ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่น

จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจาก genistein จะมีผลต่อ reproductive organs ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นแล้ว genistein ยังมีผลต่อ non-reproductive organs ได้แก่ bursa of Fabricius ซึ่งเป็นอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกัน (immune organs) ของสัตว์ปีก จากการสังเกตพบว่า genistein ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ bursa of Fabricius ของเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นมีขนาดใหญ่ขึ้น สำหรับการศึกษาดังผลของ genistein หรือ endocrine disruptors ตัวอื่นที่มีต่อการเจริญของ bursa of Fabricius ในเอ็มบริโอนกกระทาญี่ปุ่นหรือเอ็มบริโอสัตว์ปีกจึงควรจะทำการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สิทธิพล อินทรพัฒน์, อัจฉรียา ไศละสูต และ อรวรรณ สัตยาลย์. 2547ก. การศึกษาการเจริญของ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอของกระทาญี่ปุ่น *Coturnix japonica* ด้วยวิธีกายวิภาค ศาสตร์และเทคนิคทางมิถุวิทยา. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4 , หน้า 109. 10-11 สิงหาคม 2547 ณ โรงแรมโลดส์ปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่.

สิทธิพล อินทรพัฒน์, อัจฉรียา ไศละสูต และ อรวรรณ สัตยาลย์. 2547ข. การหาตำแหน่งของ เซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์และการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเอ็มบริโอของ กระทาญี่ปุ่น *Coturnix japonica*. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30 , หน้า 45. 19-21 ตุลาคม 2547 ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุม อิมแพ็ค เมืองทองธานี กรุงเทพมหานคร.

ภาษาอังกฤษ

Abbott, U. K. 1967. Avian Developmental Genetics. New York: Crowell.

Aige-Gil, V. and Simkiss, K. 1991. Sterilization of avian embryos with busulphan. Res. Vet. Sci. 50: 139-144.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S. Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. 1967. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. The Journal of Biological Chemistry 22: 5592-5595.

Anderson, J. J. B., Anthony, M., Messina, M. and Garner, S. C. 1999. Effect of phyto-oestrogens on tissues. Nutrition Research Reviews 12: 75-116.

Ando, Y. and Fujimoto, T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood vascular system prior to migrating to the gonadal anlagen. Develop. Growth and Differ. 24(4): 345-352.

Andrews, J. E., Smith, C. A. and Sinclair, A. H. 1997. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. General and Comparative Endocrinology 108: 182-190.

Awoniyi, C. A., Roberts, D., Veeramachanemi, D. N. R., Hurst, B. S., Turker, K. E. and Schlaff, W. D. 1998. Reproductive sequelae in female rats after in utero and

- neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. Fertility and Sterility 70(3): 440-447.
- Axelsson, M., Kirk, D. N., Farrant, R. D., Cooley, G., Lawson, A. M. and Setchell, K. D. R. 1982. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(hydroxyphenyl)chroman] in human urine. Biochem J. 201: 353-357.
- Baillie, A. H., Ferguson, M. M. and Hart, D. McK. 1996. Developments in steroid histochemistry. New York: Academic Press.
- Baker, T. G. 1972. In: Austin, C. R. and Short, R. V., Frs (eds.), Reproduction in Mammals. Book I: Germ Cells and Fertilization. England: Cambridge University Press, pp. 1-13.
- Bancroft, J. D. and Gamble, M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. China: Churchill Livingstone.
- Barnes, S., Kim, H., DarleyUsmar, V., Patel, R., Xu, J., Boersma, B. and Luo, M. 2000. Beyond ER alpha and ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. J. Nutr. 130: 656-657.
- Berg, C. 2000. Environmental pollutants and the reproductive system in birds: developmental effects of estrogenic compounds. Thesis, Uppsala University, Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.
- Berg, C., Halldin, K., Brunström, B. and Brandt, I. 1998. Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. Toxicology Letters 102-103: 671-676.
- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A. K. Brandt, I. and Brunström, B. 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effect of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. The Science of the Total Environment 233: 57-66.
- Berg, C., Halldin, K. and Brunström, B. 2001. Effect of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2836-2840.
- Brandenberger, A. W., Tee, M. K., Lee, J. Y., Chao, V. and Jaffe, R. B. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 3509-3512.

- Browder, L. W., Erickson, C. A. and Jeffery, W. R. 1991. Organogenesis: gonad development and sex differentiation. Developmental Biology. Philadelphia: Saunders College Publishing. p. 661-683.
- Bruggeman, V., As, P. V. and Decuypere, E. 2002. Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 131: 839-846.
- Brunström, B., Axelsson, J. and Halldin, K. 2003. Effects of endocrine modulators on sex differentiation in birds. Ecotoxicology 12: 287-295.
- Brunström, B. and Halldin, K. 1998. EROD induction by environmental contaminants in avian embryo livers. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 121: 213-219.
- Brunström, B. and Örberg, J. 1982. A method for studying embryotoxicity of lipophilic substances experimentally introduced into hen's eggs. Ambio 11: 209-211.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature 389: 753-758.
- Burke, W. H. and Henry, M. H. 1999. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. Poultry Science 78: 1019-1033.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque, E. S., Janszen, D. B. and Heck, H. A. 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogen in sprague-dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta *in vitro*. Toxicological Science 51(2): 236-244.
- Colborn, T and Clements, C. 1992. Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. USA:Princeton Scientific Publishing.
- Cheek, A. O., Vonier, P. M., Oberdorster, E., Burrow, B. C. and Mclachlan, J. A. 1998. Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. Environ Health Perspect. 106(Suppl1): 5-10.
- Clawson, R. C. and Domm, L. V. 1963. Developmental changes in glycogen content of primordial germ cells in chick embryos. Proc. Exp. Biol. Med. 112: 533-537.

- Clawson, R. C. and Domm, L. V. 1969. Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo: A study of the stages definitive primitive streak through eight somites. Am. J. Anat. 125: 87-112.
- Cline, J. M., Franke, A. A., Register, T. C., Golden, D. L. and Adams, M. R. 2004. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. Toxicologic Pathology 32: 91-99.
- Clinton, M. 1997. Sex determination in birds. Roslin Institute Annual Report, pp. 55-59.
- Clinton, M. and Haines, L. C. 1999. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. Cell. Mol. Life. Sci. 55: 876-886.
- Chuva de Sousa Lopes, S. M., van den Driesche, S., Carvalho, R. L. C., Larsson, J., Eggen, B., Surani, M. A. and Mummery, C. L. 2005. Altered primordial germ cell migration in the absence of transforming growth factor β signaling via ALK5. Developmental Biology 284: 194-203.
- D'Costa, S., Pardue, S. L. and Petite, J. N. 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. Avian and Poultry Biology Reviews 12: 151-168.
- Danzo, B. J. 1998. The effects of environmental hormones on reproduction. Cell. Mol. Life. Sci. 54: 1249-1264.
- David, D. 1975. DDT and the germ cell population of embryonic bird gonads: treatment of the eggs at different incubation stages. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 280(6): 745-748.
- Delclos, K. B., Bucci, T. J., Lomx, L. G., Laterdresse, J. R., Warbritton, A., Weis, C. C. and Newbold, R. R. 2001. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. Reproductive Toxicology 15: 647-663.
- Didier, E. and Fargeix, N. 1976. Quantitative aspects of the colonization of the gonads by germ cells in the quail embryo (*Coturnix coturnix japonica*). J. Embryol. Exp. Morphol. 35: 637-648.
- Dixon, R. A. and Ferreira, D. 2002. Genistein. Phytochemistry 60: 205-211.

- Doerge, D.R., Churchwell, M. I., Chang, H. C., Newbold, R. R. and Delclos, K. B. 2001. Placental transfer of the soy isoflavone, genistein, following oral administration to Sprague–Dawley rats. Reproductive Toxicology 15:105–110.
- Doi, O. and Hutson, J. M. 1988. Pretreatment of chick embryos with estrogen in ovo prevents mullerian duct regression in organ culture. Endocrinology 122: 2888-2891.
- Drews, U. 1995. Color atlas of embryology. New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Dubois, R., Cuminge, D. and Smith, J. 1976. Interpretation of some recent results in experimental embryology and the problem of the germ line. Br. Soc. Cell. Biol. Symp. 1. London: Cambridge University Press. pp 61-93.
- Elbrecht, A. and Smith, R. G. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. Science 255: 467-470.
- Eldridge, A. C. and Kwolek, W. F. 1983. Soybean isoflavone: effect of environment and variety on composition. J. Agric. Food. Chem. 31: 394-396.
- Ellegren, H. 2001. Hens, cocks and avian sex determination: a quest for genes on Z or W?. EMBO reports 2(31): 192-196.
- England, M. A. and Matsumura, G. 1993. Primordial germ cells in the primitive streak stages chick embryo as studied by scanning electron microscopy. J. Anat. 183: 67-73.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1996. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.2300, Avian Reproduction Test. EPA 712-C-96-141. Washington DC: US Environmental Protection Agency.
- Eyal-Giladi, H. and Kochav, S. 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick I. General morphology. Developmental Biology 49: 321-337.
- Eyal-Giladi, H., Kochav, S. and Menashi, H. K. 1976. On the origin of primordial germ cells in the chick embryo. Differentiation 6(1): 13-16.
- Eyal-Giladi, H. Ginsburg, M. and Farbarov, A. 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. J Embryol Exp Morphol. 65: 139-147.
- Fang, C., Zhang, C., Xia, G. and Yang, W. 2002. Damaging effects of polychlorinated bisphenyls on chicken primordial germ cells. Reprod Fertil Dev. 14: 177-183.

- Foidart, A., Lakaye, B., Grisar, T., Ball, G. F. and Balthazart, J. 1999. Estrogen receptor beta in quail: cloning, tissue expression and neuroanatomical distribution. J. Neurobiol. 40: 327-342.
- Fritz, W. A., Coward, L., Wang, J., Lamartiniere, C. A. 1999. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. Carcinogenesis 19: 2151–2158.
- Fritz, W. A., Cotroneo, M. S., Wang, J., Eltoum. and Lamartiniere, C. A. 2003. Dietary diethylstilbestrol but not genistein adversely affects rat testicular development. J. Nutr. 133: 2287-2293.
- Fry, D. M. and Toone, C. K. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. Science 213: 921-923.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A. and Kiyofuji, R. 1976. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. Anat. Rec. 185: 139-154.
- Fujioka, T., Soh, T., Fujihara, N. and Hattori, M. A. 2004. Function of TGF β 2 in the growth of primordial germ cells and germinal ridge stromal cells during embryonic development. J. Exp. Zool. 301: 290-296.
- Gasc, J. M. 1980. Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. J Embryol Exp Morph. 55: 331-342.
- Gilbert, S. F. 2003. Developmental Biology. USA: Sinauer Associates, Inc.
- Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H. 1987. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo forming process. Development 101(2): 209-219.
- Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H. 1989. Primordial germ cell development in cultures of dispersed central disks of stage X chick blastoderms. Gamete Research 23: 421-427.
- Ginsburg, M., Hochman, J. and Eyal-Giladi, H. 1989. Immunohistochemical analysis of the segregation process of the quail germ cell lineage. Int. J. Dev. Biol. 33(3): 389-395.
- Godin, I., Wylie, C. and Heasman, J. 1990. Germinal ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development 108: 357-36.

- Godin, I. and Wylie, C. C. 1991. TGF β 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 113: 1451-1457.
- González-Morán, M. G. 2005. Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in the growing and regressing ovaries of newly hatched chicks. Journal of Molecular Histology, 36: 174-155.
- González-Morán, G. and Camacho-Arroyo, I. 2001. Immunohistochemical localization of progesterone receptor isoforms in the chick pre-follicular ovary. Anat. Histol. Embryol. 30: 153-158.
- Groenendijk-Huijber, M. M. 1960. Functional characteristics of the testicular hormone in the chick embryo. Anat. Rec. 137: 237-249.
- Guillette, L. J. and Gunderson, M. P. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine disrupting contaminants. Reproduction 112: 857-864.
- Ha, Y., Tsukada, A., Saito, N. and Shimada, K. 2004. Changes in mRNA expression of MMP-2 in the Müllerian duct of chicken embryo. General and Comparative Endocrinology 139: 131-136.
- Halldin, K. 2005. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. Domestic Animal Endocrinology 29(2): 420-429.
- Halldin, K., Axelsson, J. and Brunström, B. 2004. Effects of endocrine modulators on sexual differentiation and reproductive function in male Japanese quail. Brain Research Bulletin 65(3): 211-218.
- Halldin, K., Berg, C., Brandt, I. and Brunström, B. 1999. Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: effects of *in ovo* exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol. Environ Health Perspect 107(11): 861-866.
- Hallett, J. S. and Wentworth, B. C. 1991. The effects of busulfan on gonadal differentiation and development in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Poultry Science 70: 1619-1623.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Journal of Morphology 88: 49-92.

- Hanafy, A. M., Sasanami, T., Ichikawa, K., Shimada, K. and Mori, M. 2004. Estrogen receptor binding of xenoestrogen and phytoestrogens in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Journal of Poultry Science 41: 30-37.
- Hanafy, A. M., Sasanami, T. and Mori, M. 2005. Binding of xenoestrogens and phytoestrogens to estrogen receptor β of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Journal of Poultry Science 42: 238-244.
- Hart, C. A., Nisbet I. C. T., Kennedy, S. W. and Hahn, M. E. 2003. Gonadal feminization and halogenated environmental contaminants in common terns (*Sterna hirundo*): evidence that ovotestes in male embryos do not persist to the pre fledgling stage. Ecotoxicology 12: 125-140.
- Hayashi, A., Donahoe, P. K., Budzik, G. and Trelstad, R. 1982. Periductal and matrix glycosaminoglycans in rat Müllerian duct development and regression. Developmental Biology 92: 16-26.
- Hori, T., Asakawa, S., Itoh, Y., Shimizu, N. and Mizuno, S. 2000. Wpkci, encoding and altered from PKCI, is early female embryo: implication of its role in female sex determination. Mol. Biol. Cell. 11: 3645-3660.
- Hutson, J. M., Ikawa, H. and Donahoe, P. K. 1981. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken. Journal of Pediatric Surgery 16(6): 822-827.
- Hutson, J. M., Ikawa, H., Donahoe, P. K. 1982. Estrogen inhibition of mullerian inhibiting substance in the chick embryo. J Pediatr Surg. 17: 953-959.
- Hutson, J. M., Donahoe, P. K. and MacLaughlin, D. T. 1985. Steroid modulation of mullerian duct regression in the chick embryo. General and Comparative Endocrinology 57: 88-102.
- Ikawa, H., Trelstad, R. L., Hutson, J. M., Manganaro, T. F. and Donahoe, P. K. 1984. Changing patterns of fibronectin, laminin, type IV collagen, and basement membrane proteoglycan during rat Müllerian duct regression. Developmental Biology 102: 260-263.
- Ignotz, R. A. and Massague, J. 1986. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol. Chem. 261: 4337-4345.

- Itoh, S., Thorikay, M., Kowanetz, M., Moustakas, A., Itoh, F., Heldin, C. H. and ten Dijke, P. 2003. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor- β type 1 receptor-induced responses. J. Biol. Chem. 278: 3751-3761.
- Jefferson, W. N., Couse, J. F., Padilla-Banks, E., Korach, K. S. and Newbold, R. R. 2002. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) α expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER β -mediated and nonestrogenic actions. Biology of Reproduction 37: 1285-1296.
- Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y., Harumi, T., Hanada, H., Maruyama, K., Sakurai, M., Kuwana, T. and Naito, M. 1997. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor derived gametes in mixed sex germline chimera to the offspring in the chicken. Molecular Reproduction and Development 48: 501-510.
- Kannankeril, J. V. and Domm, L. V. 1968. Development of the gonads in the female Japanese quail. Am. J. Anat. 123: 131-146.
- Kanno, J., Kato, H., Iwata, T and Inoue, T. 2002. Phytoestrogen low diet for endocrine disruptor studies. J. Agric. Food Chem. 50: 3883-3885.
- Karagenc, L., Cinnamon, Y. Ginsgurg, M. and Petite, J. N. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. Dev Genet. 19(4): 290-301.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Crisp, P. F., Gray, L. E. Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. and Tilson, H. A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA sponsored workshop. Environ Health Perspect. 104(Suppl4): 715-740.
- Kim, H., Peterson, T. G. and Barnes, S. 1998. Mechanisms of action of the soy isoflavones genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. Am J Clin Nutr. 68: 1418-1425.
- King, R. A. 2002. Soy isoflavones in foods: Processing effects and metabolism. ASA Technical Bulletin 36: 1-10.
- Kleiner, D. E., Stetler-Stevenson, W. G. 1999. Matrix metalloproteinase and metastasis. Cancer Chemother. Pharmacol. 43: 42-51.

- Knobil, E. 1999. Hormonally Active Agents in the Environment. USA:National Research Council.
- Koes, R. E., Quattrocchio, F. and Mol, J. N. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plant: function and evolution. Bioessays 16: 123—132.
- Kozelka, A. W. and Gallagher, T. F. 1934. Effect of male hormone extracts, theelin and theelol on the chick embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31: 1143-1144.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 138: 863-870.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J. A. 1998. Interaction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139: 4252-4263.
- Kuwana, T., Maeda-Suga, H. and Fujimoto, T. 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. Anat. Rec. 215: 403-406.
- Kuwana, T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. Develop. Growth and Differ. 35(3): 237-243.
- Lakaye, B., Foidart, A., Grisar, T. and Balthazart, J. 1998. Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. NeuroReport 9: 2743-2748.
- Lampe, J. W., Karr, S. C., Hutchins, A. M. and Slavin, J. L. 1998. Urinary equal excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217: 335-339.
- Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J. F. and Olson, B. A. 2002. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF β type I receptor-deficient mice. EMBO J. 20: 1663-1673.
- Lee, B., Jung, E., Yun, Y., Kang, J., Baek, I., Yon, J., Lee, Y., Sohn, H., Lee, J., Kim, K. and Nam, S. 2004. Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. Journal of Reproduction and Development 50(4): 399-409.

- Lee, H., Karasanyi, N. and Nagele, R. G. 1978a. The role of the cell surface in the migration of primordial germ cells in early chick embryo: effects of concanavalin A. J. Embryol. Exp. Morph. 46: 5-20.
- Lee, H., Nagele, R. G. and Goldstein, M. M. 1978b. Scanning electron microscopy of primordial germ cells in early chick embryo. J. Exp. Zool. 205: 457- 462.
- Leopold, A. S., Erwin, M., Oh, J. and Browning, B. 1976. Phytoestrogen: adverse effects on reproduction in California quail. Science 191: 98-100.
- Lephart, E. D., West, T. W., Weber, K. S., Rhees, R. W., Setchell, K. D. R., Adlercreutz, H. and Lund, T.D. 2002. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. Neurotoxicology and Teratology 24: 5-16.
- Lewis, R. W., Brooks, N., Milburn, G. M., Soames, A., Stone, S., Hall, M. and Ashby, J. 2003. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. Toxicological Science 71: 74-83.
- Lillie, F. R. 1919. The Development of The Chick: An Introduction to Embryology. New York: Henry Holt and Company.
- Lin, F., Wu, J., Abdelnabi, M. A., Ottinger, M. A. and Giusti, M. M. 2004. Effects of dose and glycosylation on the transfer of genistein into the eggs of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). J. Agri. Food. Chem. 52: 2397-2403.
- Liu, H., Zhang, C. and Zeng, W. 2005. Estrogenic and antioxidant effects of a phytoestrogen daidzein on ovarian germ cells in embryonic chickens. Domestic Animal Endocrinology (in press).
- MacLaughlin, D. T., Hutson, J. M. and Donahoe, P. K. 1983. Specific estradiol binding in embryonic mullerian ducts: a potential modulator of regression in the male and female chick. Endocrinology 113: 141-145.
- Maraud, R. and Vergnaud, O. 1986. Development of interstitial cells in experimentally sex reversed gonads of genetically female chick embryos. General and Comparative Endocrinology 63: 464-470.
- Maraud, R., Vergnaud, O. and Rashedi, M. 1987. Structure of the right testis of sexually mature genetically female fowl experimentally maculinized during embryonic life and submitted to a posthatching left castration. General and Comparative Endocrinology 68: 208-215.

- Maraud, R., Vergnaud, O. and Rashedi, M. 1990. New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chick embryos. Am. J. Anat. 188: 429-437.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. and Capel, B. 1997. Male specific cell migration into the developing gonad. Curr. Biol. 7: 958-968.
- Matsumura, G. and England, M. A. 1993. Isolation of chick primordial germ cells from stages 4-8 embryos. Anat. Rec. 235: 604-610.
- Meyer, D. B. 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. Dev. Biol. 10: 154-190.
- McCarrey, J. R. and Abbott, U. K. 1979. Mechanism of genetic sex determination, gonadal sex differentiation, and germ cell development in animals. Advances in Genetics. New York: Academic Press.
- Mclachlan, J. A. 2001. Environmental signaling: What embryo and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. Endocrine Reviews. 22(3): 319-341.
- Mohmond, T. H. and Coleman, T. H. 1967. A comparison of the proportion of components parts of Bobwhite and Coturnix eggs. Poultry Sci. 46: 1168-1171.
- Mohsen, G. A. and Ahmed, R. A. 2002. Tamoxifen inhibits the migration of the primordial germ cells of the chick embryos with less mortality rate. Pakistan Journal of Biological Sciences 5(10): 1060-1062.
- Molyneaux, K. A., Zinszner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C. and Lehmann, R. 2003. The chemokine SDF1/CXCR12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. Development 130: 4279-4286.
- Muniesa, P. and Dominguez, L. 1990. A morphological study of primordial germ cells at pregastrular stages in the chick embryo. Cell Differentiation and Development. 31: 105-117.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakaomi, M., Usumi, K. and Ono, H. 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. Reproductive Toxicology 15: 399-411.
- Naito, M., Sano, A., Matsubara, Y., Harumi, T. Tagami, T., Sakurai, M. and Kuwana, T. 2001. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X

- blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite sex recipient gonads. Reproduction. 121: 547-552
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T. and Mizuno, S. 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryo. Journal of Molecular Endocrinology 20: 193-202.
- Nakagawa, S. 2004. Is avian sex determination unique?: clues from a warbler and from chickens. Trends in Genetics 20(10): 479-480.
- Nakamura, M., Kuwana, T., Miyayama, Y. and Fujimoto, T. 1988. Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. Anat. Rec. 222: 90-94.
- Nakamura, M., Kuwana, T., Miyayama, Y., Yoshinaga, K. and Fujimoto, T. 1991. Ectopic colonization of primordial germ cells in the chick embryo lacking the gonads. Anat. Rec. 229: 109-115.
- Nakamura, M., Yoshinaga, K. and Fujimoto, T. 1992. Histochemical identification and behavior of quail primordial germ cells injected into chick embryos by the intravascular route. The Journal of Experimental Zoology 261: 479-483.
- Narbaitz, R. and Adler, R. 1966. Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. J. Embryol. Exp. Morph. 16(1): 41-47.
- Nieuwkoop, P. D. and Sutasurya, L. A. 1979. Primordial germ cells in the chordates. London: Cambridge University Press.
- Nishijima, K., Esaka, K., Ibuki, H., Ono, K., Miyake, K., Kamihira, M. and Iijima, S. 2003. Simple assay method for endocrine disrupters by *in vitro* quail embryos culture: nonylphenolacts as a weak estrogen in quail embryos. Journal of Bioscience and Bioengineering 95(6): 612-617.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1984. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guidelines 206: Avian Reproduction Test. Paris, France.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2000a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Proposal for a New Test Guideline: Avian Reproduction Toxicity Test in Japanese Quail or Northern Bobwhite. Paris, France.

- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2000b. Draft record from the 2nd OECD expert consultation on endocrine disrupting testing in birds. Nashville, USA.
- O'Neill, M., Binder, M. Smith, C., Andrews, J., Reed, K., Smith, M., Millar, C., Lambert, D. and Sinclair, A. 2000. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. Dev Genes Evol. 210: 243-249.
- Ono, T., Yokoi, R. and Aoyama, H. 1996. Transfer of male and female primordial germ cell of quail into chick embryonic gonads. Exp. Anim. 45(4): 347-352.
- Ono, T., Matsumoto, T. and Arisawa, Y. 1998. Production of donor derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese quail. Exp. Anim. 47(4): 215-219.
- Ono, T. and Machida, Y. 1999. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A 122: 255-299.
- Opalka, M., Kaminska, B., Ciereszko and Dusza, L. 2004. Genistein affects testosterone secretion by Leydig cells in roosters (*Gallus gallus domesticus*). Reproductive Biology 4(2): 185-193.
- Ottinger, M. A., Abdelnabi, M. A., Henry, P., McGary, S., Thompson, N. and Wu, J. M. 2001. Neuroendocrine and behavioral implication of endocrine disrupting chemicals in quail. Hormones and Behavior 40: 234-247.
- Ottinger, M. A., Abdelnabi, M. A., Quinn, M., Golden, N., Wu, J. and Thompson, N. 2002. Reproductive consequences of EDCs in birds What do laboratory effects mean in field species?. Neurotoxicology and Teratology 24: 17-28.
- Ottinger, M. A., Quinn Jr, M. J., Lavoie, E., Abdelnabi, M. A., Thompson, N., Hazelton, J. L., Wu, J. M., Beavers, J. and Jaber, M. 2005. Consequences of endocrine disrupting chemicals on reproductive endocrine function in birds: establishing reliable end points of exposure. Domestic Animal Endocrinology 29(2):411-419.
- Pace, H. C. and Brenner, C. 2003. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. Genome Biology 4(3): 1-6.
- Paggett, C. S. and Ivey, W. D. 1960. The normal embryology of Coturnix quail. Anat. Rec. 137: 1-11.

- Pardanaud, L., Buck, C. and Dieterlen-Lievre, F. 1987. Early germ cell segregation in the quail blastodisc. Cell Differ. 22(1): 47-59.
- Perez-Aparicio, F. J., Carretero, A., Navarro, M. and Ruberte, J. 1998. The lack of genital ridge vascularization in the early chick embryo: implication in the migration of the primordial germ cells. Anat. Rec. 251: 398-405.
- Perrin, F. M. R., Stacey, S., Burgess, A. M. C. and Mittwoch, U. 1995. A quantitative investigation of gonadal feminization by diethylstilboestrol of genetically male embryos of the quail *Coturnix coturnix japonica*. Journal of Reproduction and Fertility 103: 223-226.
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Liunggren, J., Gustafsson, J. A. and Carlquist, M. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptorbeta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. EMBO J. 18: 4608-1618.
- Poole, H. K. 1965. Egg shell pigmentation in Japanese quail: Genetic control of the white egg trait. J. Heredity 55: 136-138.
- Rashedi, M., Maraud, R. and Stoll, R. 1983. Development of the testis in female domestic fowls submitted to an experimental sex reversal during embryonic life. Biology of Reproduction 29: 1221-1227.
- Rashedi, M. and Maraud, R. 1987. Secretion of the anti-mullerian hormone by the gonads of experimentally sex reversed female chick embryos. General and Comparative Endocrinology 65: 87-91.
- Rashedi, M., Maraud, R., Piet, M., Castet, M. and Audine, M. 1990. Influence of heterospecific testis graft on the gonadal sex differentiation of female bird embryos. Cell Differentiation and Development 32: 167-174.
- Raymond, C. S., Kettlewell, J. R., Hirsch, B., Bardwell, V. J., Zarkower, D. 1999. Expression of *Dmrt1* in the genital ridges of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. Developmental Biology 215: 208-220.
- Reed, K. J. and Sinclair, A. H. 2002. FET-1: a novel W-linked, female specific gene upregulated in the embryonic chicken ovary. Mech. Dev. 119: 87-90.
- Richards, A. J., Enders, G. C. and Resnick, J. L. 1999. Activin and TGF β limit murine primordial germ cell proliferation. Developmental Biology 207: 470-475.

- Roberts A. B., Flanders K. C., Heine U. I., Jakowlew, S., Kondaiah, P., Kim S. J., and Sporn, M. B. 1990. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 327(1239):145-154.
- Romanoff, A. L. 1960. The Avian Embryo: Structural and Functional Development. New York: The Macmillan Company.
- Rowland, I. R., Wiseman, H., Sanders, T. A., Adlercreutz, H. and Bowey, E. A. 2000. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut flora. Nutrition and Cancer 36: 27-32.
- Rumsby, G. 1997. In: Rumsby, G. and Farrow, S. M. (eds.), Molecular Endocrinology: genetic analysis of hormones and their receptors. UK: Bios Scientific Publishers, pp. 179-202.
- Safe, S. H., Foster, W. G., Lamb, J. C., Newbold, R. R. and Kraak, G. V. D. 2000. Estrogenicity and endocrine disruption. Council for Agricultural Science and Technology.16: 1-16.
- Saito, S., Sato, T., Harada, H. and Takita, T. 2001. Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(10): 2220-2225
- Saito, S., Sato, T., Harada, H and Matsuda, T. 2004. Biotransformation of soy isoflavone-glycosides in laying hens: intestinal absorption and preferential accumulation into egg yolk of equol, a more estrogenic metabolite of daidzein. Biochimica et Biophysica Acta 1674: 122-130.
- Sanford, J. A. 1957. A Progress report of Coturnix quail investigations in Missouri. Proc. North. A. Wildlife. Conf. 22: 316-359.
- Sathyamoorthy, N., Gilsdorf, J. S. and Wang, T. T. 1998. Differential effect of genistein on transforming growth factor beta 1 expression in normal and malignant mammary epithelial cells. Anticancer Res. 18: 2449-2453.
- Scheib, D. 1983. Effects and role of estrogen in avian gonadal differentiation. Differentiation 23: 87-92.
- Scheib, D. and Reyss-Brion, M. 1979. Feminization of the quail by early diethylstilbestrol treatment: histoenzymological investigations on steroid dehydrogenases in the gonads. Arch Anat Microsc Morphol Exp. 68: 85-98.

- Scheib, D., Mignot, T. M. and Guichard, A. 1984. Effects of early tamoxifen treatment on hormonal content of 15-day quail embryo gonads. General and Comparative Endocrinology 56: 425-432.
- Setchell, K. D. R. 1998. Phytoestrogen: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 68: 1999-1346.
- Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J Nutr. 129(3): 758-767.
- Shaw, I. and McCully, S. 2002. A review of the potential impact of dietary endocrine disrupters on the consumer. International Journal of Food Science and Technology. 37: 471-476.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Wada, M., Sato, K. and Nunoya, T. 2004. A new screening model using F₁ (AWE X WE) Japanese quail embryo for evaluating sex reversal effects. J Toxicol Pathol. 17: 245-252.
- Shibuya, K., Mizutani, M., Sato, K., Itabashi, M. and Nunoya, T. 2005. Comparative evaluation of sex reversal effects of natural and synthetic estrogens in sex reversal test using F₁ (AWE X WE) Japanese quail embryos. The Journal of Poultry Science 42: 119-129.
- Shimada, K. 2002. Sex determination and sex differentiation. Avian and Poultry Biology Reviews 13(1): 1-14.
- Shutt, D. A. 1976. The effects of plant oestrogen on animal reproduction. Endeavour 35(126): 110-113.
- Singh, R. P. and Meyer, D. B. 1967. Primordial germ cells in blood smears from chick embryos. Science 156: 1503-1504.
- Smith, C. A., Andrews, J. E. and Sinclair, A. H. 1997. Gonadal sex differentiation in chicken embryo: expression of estrogen receptor and aromatase genes. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 60: 295-302.
- Smith, C. A., McClive, P. J., Western, P. S., Reed, K. J. and Sinclair, A. H. 1999. Conservation of a sex determining gene. Nature 402: 601-602.
- Smith, C. A. and Sinclair, A. H. 2001. Sex determination in the chicken embryo. J. Exp. Zool. 290: 691-699.

- Smith, C. A., Katz, M. and Sinclair, A. H. 2003. *DMRT1* is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryo. Biology of Reproduction 68: 560-570.
- Smith, C. A. and Sinclair, A. H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. Bioessays 26(2): 120-132.
- Song, Y., D'Costa, S., Pardue, S. L. and Petite, J. N. 2005. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. Molecular reproduction and development 70: 438-444.
- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K. A., Richter, U., Cojocaru, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M. and Raz, E. 2004. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. Developmental Biology 272(2): 351-361.
- Stevens, L. 1997. Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. Science Progress 80: 197-216.
- Suetsugi, M., Su, L., Karlsberg, K., Yuan, Y. and Chen, S. 2003. Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. Molecular Cancer Research 1: 981-991.
- Sutasurya, L. A., Yasugi, S. and Mizuno, T. 1983. Appearance of primordial germ cell in young chick blastoderms cultured *in vitro*. Develop. Growth and Differ. 25(5): 517-521.
- Swartz, W. J. and Domm, L. V. 1972. A study on division of primordial germ cells in the early chick embryo. Am. J. Anat. 135: 51-70.
- Swartz, W. J. 1975. Effect of steroids on definitive localization of primordial germ cells in the chick embryo. Am. J. Anat. 142: 499-514.
- Swartz, W. J. 1977. Effect of cyproterone acetate on primordial germ cell colonization of gonads in the chick embryo. General and Comparative Endocrinology 32: 474-480.
- Swartz, W. J. 1982. Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo. Anat. Rec. 202: 379-385.
- Swartz, W. J. 1985. Effects of cabaryl on gonadal development in the chick embryo. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 34: 481-485.

- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. Am. J. Anat. 15: 483-516.
- Teng, C. S. and Teng, C. T. 1979. Prenatal effect of the estrogenic hormone on embryonic genital organ differentiation. In: Hamilton, T. H., Sadler, W. A. and Clark, J. H. (eds.), Ontogeny of Receptors and Reproductive Hormone Action. New York: Raven Press, pp. 421-440.
- Teng, C. S. 1987. Quantification of Müllerian inhibiting substance in developing chick gonads by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Developmental Biology 123: 255-263.
- Teng, C. S. 1990. Quantitative change in fibronectin cultured Müllerian mesenchymal cells in response to diethylstilbestrol and Müllerian-Inhibiting Substance. Developmental Biology 140: 1-7.
- Touart, L. W. 2004. Factors considered in using birds for evaluating endocrine disrupting chemicals. ILAR Journal 45(4): 462-468.
- Trelstad, R., Hayashi, A., Hayashi, K. and Donahoe, P. K. 1982. The epithelial-mesenchymal interface of the male rat Müllerian duct: loss of the basement membrane integrity and ductal regression. Developmental Biology 92: 27-40.
- Tsuji, M., Shima, H., Yonemura, C. Y., Brydy, J., Donahoe, P. K. and Cunha, G. R. 1992. Effect of human recombinant Müllerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Müllerian duct regression in the rat. Endocrinology 131(3): 1481-1488.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T. and Noce, T. 2000. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. Development 127: 2741-2750.
- Turner, K. J. and Sharpe, R. M. 1997. Environmental oestrogen-present understanding. Reviews of Reproduction 2: 69-73.
- Ukeshima, A. 1994. Abandonment of germ cell in the embryonic chick ovary: TEM and SEN studies. Anat. Rec. 240: 261-266.
- Ukeshima, A. 1996. Germ cell death in the degenerating right ovary of the chick embryo. Zoological Science. 13(4): 559-563.

- Ukeshima, A., Kudo, M. and Fujimoto, T. 1987. Relationship between genital ridge formation and settlement site of primordial germ cells in chick embryos. Anat. Rec. 219: 311-314.
- Ukeshima, A. and Fujimoto, T. 1991. A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. Anat. Rec. 230: 378-386.
- Ukeshima, A., Yoshinaga, K. and Fujimoto, T. 1991. Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. J Electron Microsc. 40(2): 124-128.
- Urven, L. E., Abbott, U. K. and Erickson, C. A. 1989. Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ cells. Anat. Rec. 224: 14-21.
- Villalpando, I., Sanchez-Bringas, G., Sanchez-Vargas, I., Pedernera, E. and Villafan-Monroy, H. 2000. The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. General and Comparative Endocrinology 117: 325-334.
- Von Bogulawsky, K. 1994. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in paraffin sections. APMIS 102: 341-646.
- Vu, T. H., Werb, Z. 2000. Matrix metalloproteinase: effects of development and normal physiology. Genes Dev. 14: 2123: 2133.
- Wang, T. T., Sathyamoorthy, N. and Phang, J. M. 1996. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis 17: 271-275.
- Wartenberg, H., Lenz, E. and Schweikert, H. U. 1992. Sexual differentiation and the germ cell in sex reversed gonads after aromatase inhibition in the chicken embryo. Andrologia 24: 1-6.
- Wendy, N., Jefferson, B. S., Retha, R. and Newbold, B. S. 2000. Potential endocrine-modulating effects of various phytoestrogen in the diet. Nutrition 16: 658-662.
- Willer, B. H. 1952. Development of sex-hormone activity of the avian gonad. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 159-171.
- Willier, B. H., Gallagher, T. F. and Koch, F.C. 1935. Sex modification in the chick embryo resulting from injections of male and female hormones. Proc. Natl Acad. Sci. USA 21:625-631.

- Willier, B. H., Gallagher, T. F. and Koch, F.C. 1937. The modification of sex development in the chick embryo by male and female sex hormones. Physiological Zoology 10: 101-122.
- Witschi, E. 1935. Origin of asymmetry in the reproductive system of birds. Am. J. Anat. 56: 119-141.
- Woods, J. E. and Erton, L. H. 1978. The synthesis of estrogen in the gonads of the chick embryo. General and Comparative Endocrinology 36: 360-370.
- Woodard, A. E., Abplanalp, G., Wilson, W. O. and Vohra, P. 1973. Japanese quail husbandry in the laboratory (Coturnix coturnix japonica). Department of Avian Science, University of California, Davis, CA. 22pp.
- Woodard, A. E. and Wilson, W. O. 1963. Egg and yolk weight of Coturnix quail (*Coturnix coturnix japonica*) in relation to position in egg sequences. Poultry Sci. 42: 544-545
- Yoshimura, Y. and Nishikori, M. 2004. Identification of apoptotic oocytes in the developing ovary of embryonic and post-hatched chicks in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Journal of Poultry Science 41: 64-68.
- Yoshinaga, K., Fujimoto, T. Nakamura, M. and Terakura, H. 1992. Selective lectin-binding sites of primordial germ cells in chick and quail embryos. Anat. Rec. 233: 625-632.
- Yoshinaga, K., Nakamura, M. and Ukeshima, A. 1993. Ultrastructural characteristics of primordial germ cells in the quail embryo. Anat. Rec. 236: 547-552.
- Zhang, C., Fang, C., Liu, L., Xiu, G. and Qiao, H. 2002. Disrupting effects of polychlorinated bisphenyls on gonadal development and reproductive functions in chickens. J. Environ. Sci. Health 37(4): 509-519.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สูตรสารเคมี และสีย้อม

1. Rossman's fluid

Saturated solution of picric acid in ethanol	90.0	ml
neutral formalin	10.0	ml

2. 4% Paraformaldehyde

Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	27.6	g
Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	28.3	g
NaCl	8.76	g
KCl	200.0	mg
Distilled water	900.0	ml
Paraformaldehyde	40.0	g

3. Bouin's fluid

Glacial acetic acid	5.0	ml
40% Formaldehyde	25.0	ml
Saturated picric acid	75.0	ml

4. Phosphate buffer saline

Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13.8	g
Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	14.15	g
NaCl	4.38	g
KCl	100.0	mg
Distilled water	450.0	ml

5. Chick ringer solution

NaCl	7.0	g
KCl	0.37	g
CaCl ₂	0.18	g
Distilled water	1,000.0	ml

6. 0.01% Poly-L-lysine

Poly-L-lysine	0.01	g
Distilled water	100.0	ml

7. 10 mM Citric acid, pH 6.0

Tri-Sodium citrate (dihydrate)	2.94	g
Distilled water	1,000.0	ml
(ปรับ pH ด้วย 1 N HCl + Tween 20 0.5 ml)		

8. 0.15 M Phosphate buffer saline, pH 7.4

Stock I :

Sodium phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	42.59	g
NaCl	238.44	g
Distilled water	1,800.0	ml

Stock II :

Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	13.78	g
NaCl	79.48	g
Distilled water	1,000.0	ml

(ปรับ pH to 7.4 ด้วย 1 N HCl and 1 N NaOH)

9. Ehrich's Acid Haematoxylin

9.1	Haematoxylin	8.0	g
	95% Ethanol	400.0	ml

ผสมส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน คนให้ละลาย นำไปอุ่น ยกกลงแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

9.2	Potassium or ammonium alum	8.0	g
	Distilled water	400.0	ml

ผสมส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน คนให้ละลาย นำไปอุ่น ยกกลงแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

นำส่วนผสมข้อที่ 9.1 และ 9.2 เข้าด้วยกันแล้วเติม

	Glycerine	400.0	ml
	ผสมให้เข้ากันแล้วเติม		
	Glacial acetic acid	40.0	ml

เก็บสารนี้ไว้เป็นเวลาประมาณ 6 เดือน ก่อนนำมาใช้

10. Eosin

	Eosin-Y	0.5	g
	95% Ethanol	100.0	ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสิทธิพล อินทรพัฒน์ เกิดวันที่ 27 มีนาคม พ.ศ.2522 ที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 ในขณะที่ศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนในภาควิชาชีววิทยา ระหว่างปีการศึกษา 2545-2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย