

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์และผล
ของอัลทรานซ์เรติโนอิกแอซิดต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์
ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในระยะดาร์วาร์ของกุ้งก้ามกราม

Study on ultrastructure of primordial germ cells and effect of all-trans
retinoic acid on primordial germ cells structure of
the giant freshwater prawn larvae

คณะผู้วิจัย

1. นางสาวนพคุณ ภักดีณรงค์
2. นางสาวกัลยารัตน์ สัพโส
3. นางสาวพนมพร รักษาภักดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย
จากงบประมาณรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2549

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย จากงบประมาณ
รายได้ปี พ.ศ. 2549 จนบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่สนับสนุนและส่งเสริมให้ผู้วิจัยได้ทำงาน
วิจัยโดยอำนวยความสะดวกให้การใช้วัสดุและอุปกรณ์ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สนอง จอมเกาะ รอง
คณบดีฝ่ายบริหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อนุญาตให้สร้างโรงเลี้ยงกุ้งก้ามกรามใน
บริเวณคณะวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูศรี ดลสัมมุข ที่
สนับสนุนให้ได้ทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณนวลอนงค์ นาคคง และศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ที่
ให้คำแนะนำและเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

คณะผู้วิจัย



บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา โครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์หลังจากได้รับสารอัลทรานซ์เรติโนอิกแอซิดของกิ้งก่ากรม *Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879 พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์อยู่ทางด้านหน้าของหัวใจ เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจนย้อมติดสี Toluidine blue จาก ลักษณะของนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก และเยื่อหุ้มชั้นใน มี Nuclear pore complex เชื่อมต่อระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสซึม พบ Heterochromatin กระจาย มีนิวคลีโอลัสอยู่ติดเยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสมีทั้งบริเวณทึบและบริเวณสว่าง ไซโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบสัดส่วนกับนิวเคลียส ภายในพบ ไมโทคอนเดรีย ขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมรี, เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ชนิดขรุขระ เป็นเส้นสั้นๆ กระจายทั่วไซโตพลาสซึม, พบกอลจิบาอิมพาราดีส ซึ่งมีจำนวนชั้นเรียงกันไม่มาก, ไรโบโซม กระจายทั่วไซโตพลาสซึม พบแกรนูล แทรกอยู่ระหว่างไมโทคอนเดรียทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของลูกกิ้งก่ากรมระยะใกล้ฟัก หลังจากเลี้ยงใน สารอัลทรานซ์เรติโนอิกแอซิดที่ระดับต่างๆ คือ 10, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ในชุดควบคุม มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ซึ่งไม่แตกต่างจากในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสารอัลทรานซ์เรติโนอิกแอซิดที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าในชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยสารอัลทรานซ์เรติโนอิกแอซิดเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ได้พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย โอโอไซต์ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ภายในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในชุดควบคุมและชุดที่เลี้ยงด้วยสารเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีอแกแนลน้อย ในชุดที่เลี้ยงด้วยสารเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบอแกแนลจำนวนมากประกอบด้วย ไรโบโซม, ไมโทคอนเดรีย, เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และแวกซิสโอล ในชุดที่ได้รับสารเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย โอโอไซต์ คือ เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ ตามบริเวณขอบนิวเคลียส ลักษณะไซโตพลาสซึมทึบ จากการวิจัยนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ากรมได้ต่อไป



Abstract

The objectives of hatched larvae this study were to observe and monitor the ultrastructure of primordial germ cells (PGCs) in newly after treated with all-trans retinoic acid of the giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879. Upon microscopic observation, the results showed that PGCs locate at anterior of the heart. They are large cells. Nucleoli are distinct observed. They are light stained with toluidin blue. Transmission electron microscope observation the nucleus of PGCs compose of bilayer nuclear membrane, outer and inner membrane. There are nuclear pore complex connecting the nucleus and the cytoplasm. The peripheral nucleoli appeared is dense and loose electron band boundaries. Heterochromatin disperses in the middle of nucleus. The cytoplasm contains many organelles such as few large-oval shape mitochondria, short lines of rough endoplasmic reticulum (RER), few layer of golgi apparatus, many free ribosome and few granules that always intermingled with mitochondria and located at the either poles of PGCs. The structure of PGCs newly hatched larvae in was studied after in treated with 15% artificial seawater (ASW) served at control and 10, 50, 100 or 150 $\mu\text{g/ml}$ for 2 days. Under light microscope (LM) observation, the results show that structure of similar to that PGCs in 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ AtRA treated embryos. but PGCs in 150 $\mu\text{g/ml}$ AtRA treated embryo are different from those in control and others treatments. Surprisingly PGCs in 150 $\mu\text{g/ml}$ treated embryos develop to be oocytes. Under transmission electron microscopic study, The results show that PGCs in control, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ AtRA treated embryos compose of small amount of organelles but those in 100 $\mu\text{g/ml}$ AtRA treated embryos show bilayer of nuclear membrane, nuclear pore complex, ribosome, mitochondria, rough endoplasmic reticulum and large vacuole. In 150 $\mu\text{g/ml}$ AtRA treated embryos, the PGCs develop to be oocytes. They are large round nucleus with heterochromatin. The cytoplasm is dense. This study can use for giant freshwater prawn culture.



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ภูมิหลัง	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตการศึกษา	2
1.5 ระยะเวลาทำการศึกษา	3
1.6 สถานที่ทำการศึกษา	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 Primordial germ cells	4
2.2 วิตามินเอ	5
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	20
3.1.1 เครื่องมือ	20
3.1.2 อุปกรณ์	20
3.1.3 สารเคมี	21
3.2 ขั้นตอนและวิธีการวิจัย	22
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง	16
3.2.2 การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อเก็บตัวอย่าง	22
3.2.3 การเตรียมตัวอย่าง	23
3.2.4 การวิเคราะห์ผล	25
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	
4.1 ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์	26



4.2 ผลการทดสอบ LC ₅₀ (The median lethal concentration) ที่ 48 ชั่วโมง	28
4.3 ผลการศึกษาลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	31
4.4 ผลการศึกษาลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน	36
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	42
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	44
5.3 ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	58
ประวัติขónักวิจัย	
สรุปรายงานการใช้จ่ายเงิน	



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 Phase-contrast micrograph of <i>Macrobrachium rosenbergii</i> PGCs from 6.5-day-old embryo	5
ภาพที่ 2 โครงสร้างอนุพันธ์ของวิตามินเอแบบต่างๆ	8
ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของสารวิตามินเอ	10
ภาพที่ 4 เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามระยะลาร์วาร์ อายุ 1 วัน (LM)	26
ภาพที่ 5 เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามระยะลาร์วาร์ อายุ 1 วัน (TEM)	27
ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้ในการทดสอบ LC ₅₀ ที่ 48 ชั่วโมงและอัตราการตายของเอ็มบริโอ	29
ภาพที่ 7 ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้ในเลี้ยงและเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอ	30
ภาพที่ 8 ภาพแสดงเอ็มบริโอของกุ้งก้ามกรามอายุ 20 วัน	33
ภาพที่ 9 ภาพแสดงเอ็มบริโอของกุ้งก้ามกรามอายุ 20 วัน	34
ภาพที่ 10 ลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	39
ภาพที่ 11 ลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน อายุ 1, 7, 14 และ 21 วัน	41
ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่นที่ อายุ 1, 7, 14 และ 21	41



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กึ่งก้ามกรามเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัมอาร์โทรโพดา คลาสครัสเตเชีย มีลำตัวยาวประมาณ 30 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 370-400 กรัม (บรรจง เทียนรัมย์, 2535:2) มีลักษณะลำตัวยาว มีเปลือกหุ้มตัว (ประจวบ หล้าอุบล, 2529:1) ลำตัวแบ่งออกได้ 3 ส่วน คือ หัว ออก และท้อง ส่วนหัวและส่วนอกรวมกันเป็นปล้องเดียว ทางส่วนหางมีหนามสองอัน สองข้างแก้มมีร่องปรากฏอยู่ชัดเจนมีหลายชนิด อาศัยตามแหล่งน้ำจืดที่มีทางติดต่อกับทะเล โดยปกติในกึ่งก้ามกรามเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย ก้ามของตัวผู้จะมีขนาดใหญ่ ก้ามของตัวเมียจะมีขนาดเล็ก เปลือกหุ้มตัวส่วนท้องของตัวผู้แคบ ของตัวเมียวาง และตัวผู้ยังมี แอพเพนดิค มัสกูลิน่า แทรกอยู่ระหว่าง โคนขาว่ายน้ำ คู่ที่ 2 (บรรจง เทียนรัมย์, 2535)

กึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยในกระบวนการสร้างเริ่มต้นจากเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells, PGCs) เป็นกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความสำคัญในการพัฒนาขั้นพื้นฐานในกึ่งก้ามกราม มีการรายงานถึงลักษณะ PGCs ของตัวอ่อนสัตว์มีกระดูกสันหลัง ยกตัวอย่างเช่น ไก่, กบ, นก, ปลา, หนู, สัตว์พวกจิงโจ้ และมนุษย์ PGCs มีขนาดใหญ่และมีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมขนาดใหญ่ เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ส่วนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีการศึกษา PGCs ในแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* และ นีมาโทด, *Caenorhabditis elegans* ซึ่งมีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกันกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Damrongphol and Jarocensastraraks, 2000) ส่วนการศึกษา PGCs ในกึ่งก้ามกรามนั้นยังไม่เคยมีผู้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีการรายงานถึงลักษณะการเจริญของ PGCs แต่ลักษณะของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์นั้นเห็นเพียงลักษณะ โครงสร้างของเซลล์กว้างๆเท่านั้นไม่สามารถจำแนก PGCs ได้อย่างชัดเจนเนื่องจาก กึ่งก้ามกรามที่อายุแรกๆมีเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับ PGCs เคลื่อนที่ปะปนกัน

เนื่องจากการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกึ่งก้ามกราม ยังไม่ได้มีการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และผลของวิตามินเอที่มีผลต่อโครงสร้างระดับจุลกายภาคของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เป็นที่น่าสนใจ นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์

วิตามินเอเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อยแต่ก็ขาดไม่ได้ พบมากใน นม เนย ไข่ น้ำมันตับปลา ผักสีเขียวและผลไม้ที่มีสีส้ม วิตามินเอไม่ได้ให้พลังงานหรือสร้างเนื้อเยื่อโดยตรง



แต่ทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตเป็นไปอย่างปกติ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ โดยมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (Eitenmiller and Landen, 1994: 4) มีผลต่อการเจริญของอวัยวะและรังไข่ของหนู (Hui and Kim, 2003) และที่สำคัญยังมีผลทำให้จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งก่ามกรามในระยะเอ็มบริโอเพิ่มขึ้น (Pakdeenaromg N, 2005: 32) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า วิตามินเอมีผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา โครงสร้างเซลล์ระดับจุลกายวิภาคและผลของวิตามินเอต่อ โครงสร้างของ เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ในกิ้งก่ามกราม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสายพันธุ์และการเพิ่มผลผลิตกิ้งก่ามกรามซึ่งอาจจะสามารถแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพันธุ์กิ้งก่ามกรามในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในระดับจุลกายวิภาคและผลของสาร all-trans retinoic acid ต่อการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งก่ามกราม

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในระดับจุลกายวิภาค
2. ทราบผลของวิตามินเอที่มีต่อลักษณะ โครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งก่ามกราม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ขอบเขตของการศึกษา

1. ทำการวิจัยศึกษาเปรียบเทียบ โครงสร้างละเอียดของเซลล์ในเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราม ก่อนฟักโดยให้วิตามินเอเป็นเวลา 2 วัน ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 10, 50, 100 และ 150 $\mu\text{g/ml}$
2. ศึกษาลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งก่ามกรามระยะก่อนและหลังฟักในระดับจุลกายวิภาค
3. กิ่งที่ใช้ในการทดลอง คือ กิ่งก่ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879)จากสถาบันประมงน้ำจืดมหาสารคาม



ระยะเวลาทำการศึกษา

เดือนมิถุนายน-เดือนกรกฎาคม 2549 รวบรวมข้อมูลเตรียมวัสดุอุปกรณ์
เดือนสิงหาคม 2549 ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการทดลองและเก็บข้อมูล
เดือนกันยายน 2549 เริ่มทำการเขียนงานวิจัย

สถานที่ทำการศึกษา

1. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
2. ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
3. ห้องวิจัย เรืองก้องกัณทราม SC2 408/3



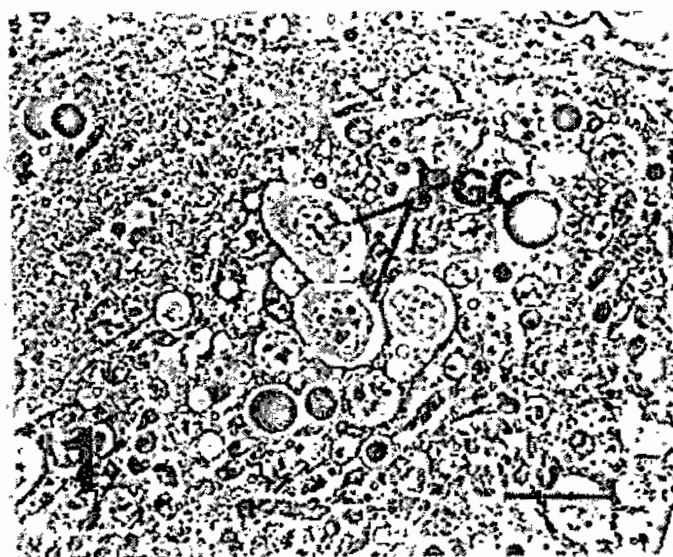
บทที่ 2

เอกสารและ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Primordial Germ Cells

Germ cells เป็นเซลล์ของตัวอ่อนที่สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างซึ่งจะมีการเจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Azim, 2004) Primordial Germ Cells (PGCs) หรือ เซลล์สืบพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์นั้นในระยะแรกจะมีการเคลื่อนที่เข้าไปเจริญใน gonad พร้อมกับเจริญของ gonad (Gilbert, 1997) ใน *Xenopus* PGCs จะเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า somatic cell มีนิวเคลียสเป็นวงกลมเล็กและมีแผ่นไข่แดงในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก (Ogiso-Ono and Ikenishi, 1999) ในไก่ PGCs มีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ประมาณ 12-18 μm ภายในไซโตพลาสซึมมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก (Chang *et al.*, 2005) ในหนู PGCs เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ (10-20 μm) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่กว่าส่วนของไซโตพลาสซึม เมื่อเทียบกับ somatic cell (Lec *et al.*, 2000) ใน Zebra fish พบ PGCs อยู่ในส่วนทางด้านบนของ body cavity อยู่กันเป็นกลุ่มประมาณ 10-20 เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรีสามารถแยกได้จาก somatic cell ได้ตามขนาดคือมีขนาด 12 μm และมีหน้าตาที่ต่างกันด้วยภายใน PGCs มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ประมาณ 6-10 μm เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียสชัดเจน (Maack and Segner, 2003) ในแมลง *Allacma fusca* (L.) PGCs ที่อยู่ในกระบวนการแบ่งเซลล์ของออบริโอจะกระจายในไข่แดงเรียงกันเป็นคู่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์และกระจายอยู่ในระหว่างแกรนูลซึ่งเป็นพื้นที่เล็กกว่าก่อนไปทางด้านบนของไข่แดง (Klag and Swiatek, 1999) ส่วน PGCs ของกิ้งก่ามกรามนั้น เป็นกลุ่มเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ มีการอยู่กันเป็นกลุ่ม เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีนิวเคลียสกลม ขนาดใหญ่ มองเห็น นิวคลีโอไลชัดเจน (Dainrongphol and Jaroensastraraks, 2000) เมื่อแบ่งส่วนของลำตัวเป็น 6 ปล้อง ซึ่งพบในปล้องที่ 3 ของลำตัว (Adiyodi, 1983)





ภาพที่ 1 Phase-contrast micrograph of *Macrobrachium rosenbergii* PGCs from 6.5-day-old embryo

(ที่มา; Damrongphol and Jaroensastraraks , 2000)

2.2 วิตามินเอ

วิตามินเอเป็นวิตามินที่ละลายในไขมันปรากฏอยู่ในธรรมชาติ 2 รูปแบบ คือ วิตามินเอและแคโรทีน (carotene) เนื่องจากสามารถใช้รักษาโรคนัยน์ตาอักเสบ (xerophthalmia) แคโรทีนเป็นสารแรกเริ่มของวิตามินเอที่ต้องอาศัยปฏิกิริยาของเอ็นไซม์โคออกซีจีเนส (dioxygenase) และเรตินินรีดักเตส (retinene reductase) ในการเปลี่ยนรูปให้อยู่ในรูปของเรตินอล (retinol) ที่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ ในกรณีที่มีความผิดปกติของร่างกายที่ไม่สามารถใช้แคโรทีนได้ โอกาสของการขาดวิตามินเอจะสูง

2.2.1 ประวัติการค้นพบวิตามินเอ

Hopkins, 1912 ได้เลี้ยงหนูด้วยอาหารบริสุทธิ์ปรากฏว่าหนูเจริญเติบโตช้า แต่ถ้านม (whole milk) ลงไปเล็กน้อยในอาหารจะทำให้เติบโตปกติ ในเวลาใกล้เคียงกันนี้ Osborne and Mendel ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของหนูโดยเลี้ยงอาหารบริสุทธิ์ร่วมกับไขมันชนิดต่างๆ ปรากฏว่าถ้าใช้ไขมันจากน้ำมันหมูหรือน้ำมันพืชแอลมอนด์ หนูไม่มีการเจริญเติบโต นัยน์ตาแห้งอักเสบจนเป็นหนองแต่ถ้านม น้ำมันคัปลา ไขมันจากเนยหรือไข่แดงลงไปด้วยหนูจะเจริญเติบโต โรคของนัยน์ตาก็หายไปแสดงว่าน้ำมันคัปลา ไขมันจากเนยและไข่แดงมีสารรักษาอาการดังกล่าวได้



Collum and Davids, 1915 ได้สกัดเนยและไขแดงด้วยอีเทอร์ ได้สารสำคัญที่ช่วยให้หนู เจริญเติบโตและรักษาโรคภัยไข้เจ็บตาอักเสบ (Xerophthalmia) ได้ และตั้งชื่อว่า fat soluble A

Steenbook, 1919 พบอาหารที่ประกอบด้วยผักสีเหลือง ช่วยในการเจริญเติบโตและช่วยในการ สืบพันธุ์ของวัวด้วย (ทดลองโดยให้กินข้าวโพดเหลืองเปรียบเทียบกับข้าวโพดขาว)

ค.ศ. 1928 ค้นพบแคโรทีน ซึ่งเป็นสารสีเหลืองของพืชเป็นครั้งแรกเริ่มของวิตามินเอ

Karrer, 1931 ได้แยกเรตินอล (Vitamin A alcohol) ได้เป็นครั้งแรก

Milas, 1946 สามารถสังเคราะห์เรตินอลได้

(สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541)

2.2.2 แหล่งวิตามินเอในอาหาร

วิตามินเอจากสัตว์มักพบในรูปสารประกอบประเภทเรตินอยด์ ซึ่งมีเรตินอลเป็นตัวแสดงฤทธิ์ ของวิตามินเอในร่างกาย แหล่งอาหารที่สำคัญและเป็นอาหารที่มีวิตามินเอมากคือ นม เนย ด้ับ และ ไข่แดง เนื้อสัตว์มีวิตามินเอน้อยมาก ปริมาณของวิตามินเอที่พบในน้ำมันตับปลา มีมากน้อยแตกต่างกัน ไปตามชนิดของปลา น้ำมันตับปลาจากปลาฮาโลบัทมีวิตามินเอมากกว่าน้ำมันตับปลาจากปลาค็อด (Cod) 150 เท่า วิตามินเอในน้ำมันตับปลาทูน่ามีมากกว่าในน้ำมันตับปลาค็อด 450 เท่า

วิตามินเอจากพืชอยู่ในรูปสารประกอบประเภทแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็น โปรวิตามินเอ ร่างกาย จะต้องเปลี่ยนเป็นวิตามินเอก่อนจะนำไปใช้ พบมากในพืชใบเขียวเข้ม ผักและผลไม้สีเหลือง เช่น มะม่วงสุก มะละกอสุก ฟักทอง มันฝรั่งหวาน แครอท มะเขือเทศ ส่วนผักสีเขียวที่มีโปรวิตามิน ได้แก่ บร็อคโคลี่ ตำลึง ผักบุ้ง ผักคะน้า ผักโขม ผักและผลไม้ที่มีสรรพคุณในการให้วิตามินเอของ ตามลำดับจากมากมาคือ มันเทศสีเหลือง ผักคะน้า ผักชี ผักบุ้ง ฝรั่งแห้ง มะละกอ ถั่วฝักยาว ผักกาดหอม มะเฟือง กะหล่ำปลี และกล้วยหอม (สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541)

หน่วยของวิตามินเอ จัดเป็น International Unit (IU) และ Retinoic equivalents (RE) IU นั้น จำแนกเป็น IU_a ซึ่งเป็นหน่วยของวิตามินเอที่มาจากแหล่งสัตว์และ IU_c ซึ่งเป็นหน่วยวิตามินเอที่มาจากแหล่งพืช โดยที่

1 IU_a (International Unit ของ performed vitamin A) = 0.3 ไมโครกรัมของเรตินอล



1 IUc (International Unit ของ provitamin A carotenoid) = 0.6 ไมโครกรัมของเบต้าแคโรทีน หรือ 0.33 Iua (สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541)

2.2.3 วิตามินเอที่พบในธรรมชาติ

วิตามินเอที่พบทั่วไปในธรรมชาติมี 2 รูปแบบ คือ

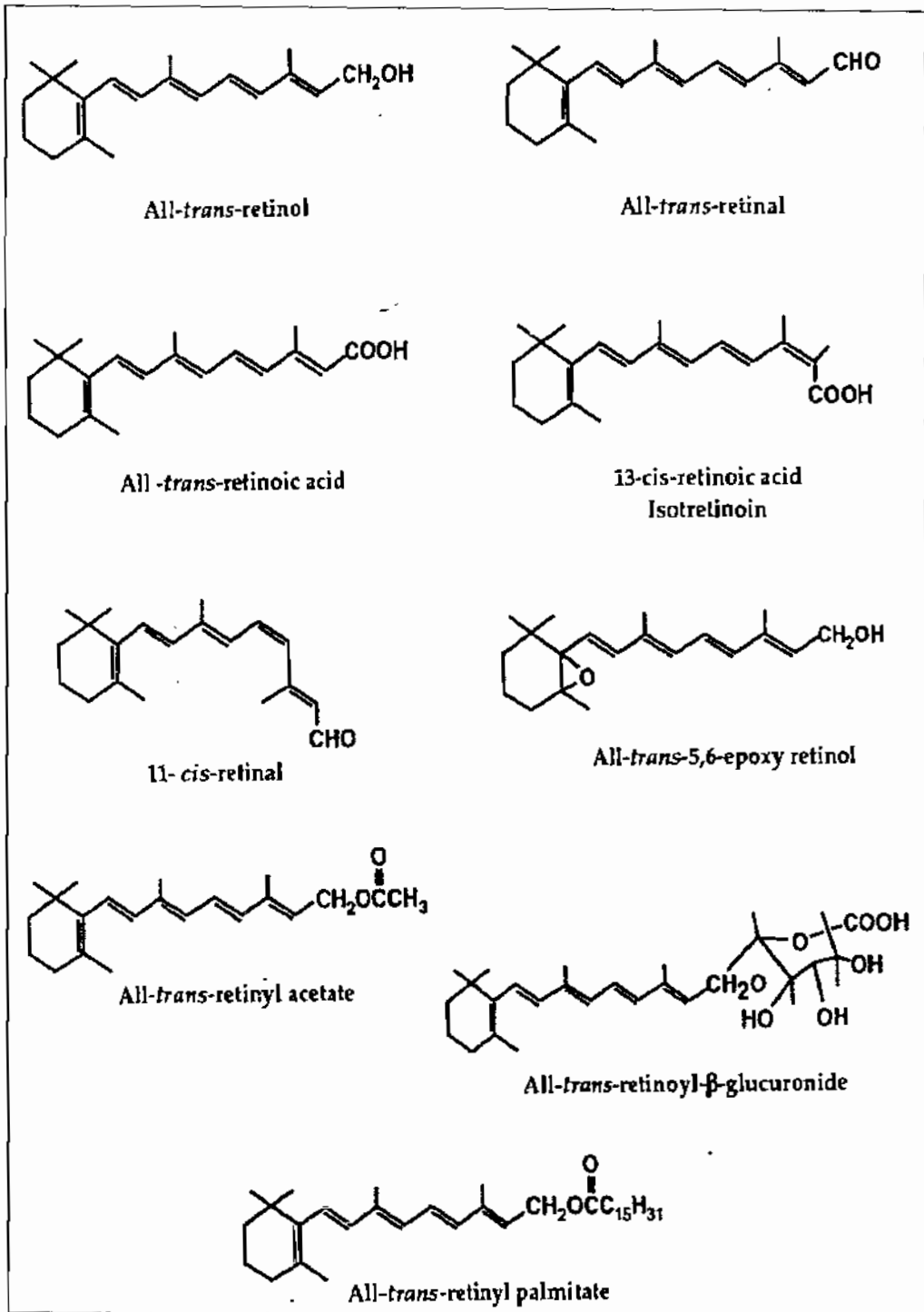
1. วิตามินเอ 1 (Vitamin A1 หรือ retinol) พบมากในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในตับของปลาน้ำเค็ม
2. วิตามินเอ 2 (3-dehydroretinol, dehydrovitamin A1, retinol2) พบมากในตับปลาน้ำจืด มี biological activity ประมาณครึ่งหนึ่งของวิตามินเอ 1

ในร่างกายมีอนุพันธ์ของวิตามินเอหลายรูปแบบ ได้แก่

1. อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปของแอลกอฮอล์ คือ เรตินอล (retinol) ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นการสืบพันธุ์
2. อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปของอัลดีไฮด์ คือ เรตินัล (retinal) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับสายตา
3. อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปของกรด คือ กรดเรติโนอิก (retinoic acid) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการเร่งการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไปหน้าที่ต่างๆ ของเนื้อเยื่อ แต่ไม่สามารถไปทำหน้าที่เกี่ยวกับการมองเห็นและระบบสืบพันธุ์ได้ กรดเรติโนอิกไม่สามารถเก็บสะสมในร่างกาย แต่จะถูกเมตาโบไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว (สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541)

สารแรกเริ่มของวิตามินเอ มีในสารที่เรียกว่า แคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นสารที่มีทั้งในพืชและเนื้อเยื่อของสัตว์ เชื่อว่า แคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์ได้จากพืชมีแคโรทีนอยด์ คือ พืชที่มีสีแดง เหลือง และส้ม แคโรทีนอยด์ที่พบในธรรมชาติมีมากกว่า 500 ชนิด แต่ประมาณ 30 กว่าชนิดเท่านั้นที่ให้ Vitamin A activity หรืออาจเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ การให้ Vitamin A activity ของแคโรทีนอยด์แต่ละตัวนั้นไม่เท่ากัน เบต้าแคโรทีนจะเป็นแคโรทีนอยด์ที่ให้ Vitamin A activity มากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ (สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541)





ภาพที่ 2 โครงสร้างอนุพันธ์ของวิตามินเอแบบต่างๆ

(ที่มา; Eitenmiller and Landen, 1994)



2.2.4 คุณสมบัติของวิตามินเอ

วิตามินเอบริสุทธิ์จะเป็นสารประกอบที่มีผลึกสีเหลืองซีด สำหรับแคโรทีนเป็นสารประกอบที่มีผลึกสีแดงเข้ม ทั้งวิตามินเอไม่ละลายน้ำแต่ละลายในคั้วทำละลายไขมัน ถูกทำลายได้ง่ายโดยการออกซิไดซ์หรือเมื่อได้รับความร้อนสูงมาก ๆ ในอากาศ แสงแดด แสงอัลตราไวโอเล็ต และไขมันที่เหม็นหืน แต่ทนความร้อนและกรดต่าง

วิตามินเอค่อนข้างคงตัว (stable) กว่าแคโรทีน ในการเก็บวิตามินจำพวกนี้จึงต้องใส่ขวดสีน้ำตาลและใส่สารต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (antioxidant) เช่น วิตามินอีไว้ด้วย วิตามินเอจะคงทนความร้อนได้ดีพอสมควร ในการประกอบอาหารหรือในการทำอาหารกระป๋อง วิตามินนี้จะถูกทำลายเสียไปแต่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

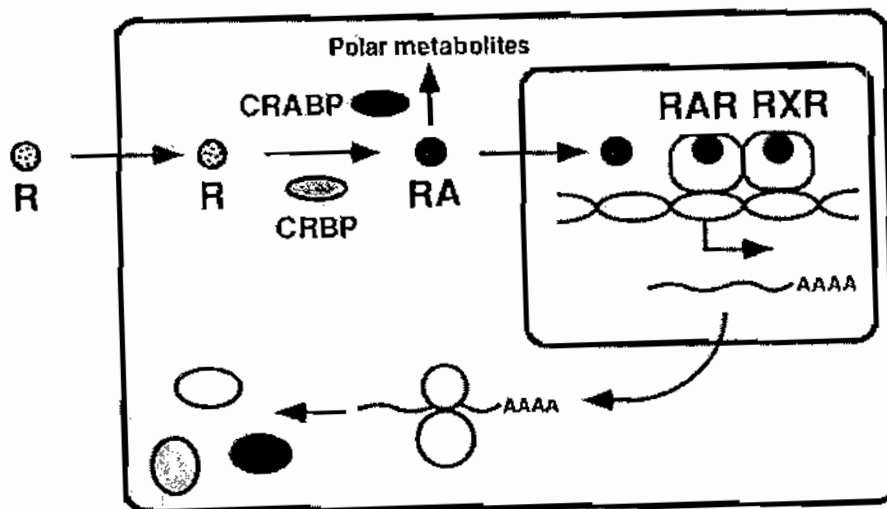
2.2.5 หน้าที่ของวิตามินเอต่อระบบสืบพันธุ์

วิตามินเอมีความจำเป็นต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ให้เป็นไปอย่างปกติ (ปราณี ผ่องแก้ว, 2539: 205) เช่น การสร้างตัวอสุจิ (spermatogenesis) ในเพศชาย และระบบประจำเดือนในเพศหญิง วิตามินเอมีความสำคัญต่อการพัฒนาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอ็มบริโอ เพศหญิงที่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ ถ้าได้รับวิตามินเอไม่เพียงพอจะทำให้เด็กมีโครงสร้างที่ผิดปกติ (สิริพันธ์ จุลกรังคะ, 2541:112) และถ้าได้รับวิตามินเอในปริมาณที่มากจะทำให้ คะโหลกศีรษะส่วนหน้า หัวใจ และระบบประสาทส่วนกลางของฟัฒนผิดปกติ ถึงแม้ว่าจะไม่ทราบปริมาณที่น้อยที่สุดที่ทำให้เพศหญิงที่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์ได้รับอันตรายแต่จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายๆ ท่าน ได้แสดงให้เห็นว่าการได้รับวิตามินเอมากกว่า 6000 RE (2000 IU) จะทำให้ได้รับอันตราย (Kretheher and Norman, 1997: 141) โดยวิตามินเอจะมีผลโดยตรงต่อเอ็มบริโอในระยะก่อนการฝังตัวในมดลูกและการพัฒนาของบลาสโตไซสต์ (Hung *et al.*, 2006)

RA receptors มี 2 ชนิด (types) ก็ือ Retinoic Acid Receptors (RARs) และ Retinoid X Receptors (RXRs) ซึ่งแต่ละชนิดประกอบด้วยชนิดย่อย (subtypes) ได้แก่ beta(β), alpha(α), และ gamma(γ) (Sharpe and Mason, 1999; 33) แต่ละชนิดจะมีการกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน และมีแบบแผนของการพัฒนาที่แสดงออกมาแตกต่างกัน (Beckett *et al.*, 1999 cited from Ang and Duester ,1997) RAR α , RAR β , และ RXRY พบใน gonocytes ของอวัยวะหนู และจะมีการขนส่ง RA ใน gonocytes ของอวัยวะหนูผ่านทาง RARs และ RXRs (Boulogne *et al.*, 1999: 1548) โดย RARs มีปฏิกิริยาต่อทั้ง all-trans retinoic acid (AtRA) และ 9-cis-RA ในขณะที่ RXRs เลือกทำปฏิกิริยากับ 9-cis-RA เท่านั้น ในการขนส่ง RA ไปยัง Target cells จะมีโปรตีนในการขนส่ง 2



ประเภทคือ CRABPs (cellular retinoic acid binding proteins) และ CRBPs (cellular retinoid binding proteins) ซึ่งสามารถพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Beckett *et al.*, 1999: 3-6; Dolle *et al.*, 1990: 1133-51; Mendelsohn *et al.*, 1992)



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของสารวิตามินเอ (ที่มา; Dakshinamurti, 1994)

เมื่อ Retinol (R) เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Active transport หรือ Passive diffusion, Retinol จะถูกออกซิไดซ์ เป็น Retinoic acid (RA) ที่พร้อมจะทำงาน หลังจากนั้น Retinoic acid จะแพร่ไปที่ นิวเคลียสและจับกับ Nuclear receptors (RARs, RXRs) ตรงบริเวณ RA-responsive genes อย่างจำเพาะ แล้วสังเคราะห์ mRNA ออกมานอกนิวเคลียส

Hox gene มีหน้าที่ในการระบุรายละเอียดและตำแหน่งในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอ และมีการตอบสนองต่อ RA โดยการจับของโปรตีนและ receptors ในเอ็มบริโอและเชื่อมกับ phenotype ระหว่าง RA การถูกทำลายของ RAR บางตัวในหนูทำให้หนูมี phenotype แสดงออกมาเหมือนกับรุ่นก่อนโดยเกิดจากการไม่ทำงานของ Hox genes ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า Hox genes คือ Targets ในการส่งสัญญาณของ RA (Chung and Cooney, 2003; Bowler *et al.*, 2006)



2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เรณู ยาชิโร (1990) ศึกษาความสัมพันธ์ต่าง ๆ ในช่วงการพัฒนารังไข่ของกึ่งกุลาคำ ระหว่าง คชันีรังไข่ คชันีอวัยวะสืบพันธุ์ขนาดของไข่ ชนิดของไข่และระดับโปรตีนไข่แดงในเลือด พบว่า ระดับโปรตีนไข่แดงในเลือดขึ้นสูงสุดในระยะพัฒนารังไข่ที่ 3 ก่อนไข่สุกเต็มที่ ส่วนคชันีรังไข่และ คชันีอวัยวะสืบพันธุ์ขึ้นสูงสุด ระยะที่ 4 ก่อนวางไข่ รังไข่ที่ยังไม่พัฒนา (ระยะ 0) มีแต่ไข่อ่อน (Primary oocyte) รังไข่กำลังพัฒนาขั้นต้น (ระยะ 1 และ 2) มีไข่อ่อนและไข่กำลังเจริญ (yolky oocyte) รังไข่ที่พัฒนาเกือบเต็มที่ (ระยะ 3) มีไข่ทั้ง 3 ชนิด ส่วนรังไข่ระยะสุดท้ายก่อนวางไข่ (ระยะ ที่ 4) มีแต่ไข่อ่อนและไข่แก่ (Cortical rod oocyte) โดยจำนวนของไข่แก่จะสูงสุดเมื่อใกล้วางไข่

อนุตรา อัครจามร(1991) การศึกษาทางเนื้อเยื่อของกึ่งกุลาคำ พบว่า การศึกษาเนื้อเยื่อปกติ ของกึ่งกุลาคำ (*Penaeus monodon*) ได้อธิบายลักษณะทางเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ ประกอบด้วย รังไข่ หรือ อัณฑะอยู่ในบริเวณด้านบนของคืบและคืบอ่อนมีลักษณะเป็น bilateral lobe ประกอบด้วย anterior lobe 1 คู่ และ lateral lobe 5 คู่ สำหรับรังไข่จะมี posterior lobe อีก 1 คู่ ภายใน รังไข่แบ่งออกเป็นพูเล็ก ๆ จำนวนมาก มีการพัฒนาของเซลล์ 5 ระยะ คือ oogonia, immature oocyte, early mature oocyte, mature oocyte และ ripe oocyte ท่อนำไข่เปิดออกที่ขาเดินคู่ที่ 3 ส่วนอัณฑะ ประกอบด้วย seminiferous tubule จำนวนมาก มีการพัฒนาของเซลล์ 5 ระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte spermatid และ spermatozoa ท่อนำอสุจิมีผนังแบ่ง ท่อออกเป็น primary lumen และ secondary lumen โดยผนังท่อและ ผนังแบ่งท่อด้วย glandular epithelium

บุญรัตน์ ประทุมชาติและคณะ (1997) ศึกษาลักษณะแตกต่างของเพศ อัตราส่วนเพศและ การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของกึ่งกุลาคำจากบ่อเลี้ยงแบบพัฒนา พบว่า กึ่งกุลาคำเพศผู้มีอัตราการ เจริญสูงกว่าเพศเมียเล็กน้อยในช่วง 66 วันแรกของการเลี้ยง โดยความแตกต่างจะเริ่มเมื่อกึ่งมีน้ำหนัก เฝือกเฉลี่ย 9.4 กรัม หรือความยาวของเปลือกคลุมหัวเฉลี่ย 23.25 มิลลิเมตร แต่หลังการเลี้ยงได้ 116 วัน กึ่งเพศเมียจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า โดยจะมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และพบว่ากึ่งเพศผู้มีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เร็วกว่าเพศเมียเมื่อเปรียบเทียบกึ่งอายุ เท่ากัน กล่าวคือจะพบ spermatid และ spermatozoa ในอัณฑะเมื่อกึ่งมีอายุ 135 วันในขณะที่กึ่งเพศ เมียจะมีการพัฒนาถึงระยะโอโอไซตระยะที่สองเท่านั้น

วนิดา ไตรพาณิชย์กุลและคณะ (1997) การศึกษาการสร้างเซลล์อสุจิของกึ่งกุลาคำ โดยใช้ กล้องจุลทรรศน์ ปรากฏว่าในหลอดสร้างเซลล์อสุจิ (semiferous tubule) มักพบ spermatogonia อยู่ ร่วมกับเซลล์สืบพันธุ์ระยะอื่นอีกเพียง 1 ระยะ เซลล์ primary spermatocyte ในระยะ prophase I มี ลักษณะเด่น คือ พบอินคลูชันบอดี (inclusion body) ขนาดใหญ่ 1 อัน อยู่ที่ขั้วหนึ่งของเซลล์ ระยะ



secondary spermatocyte แบ่งตัวต่อไปได้เซลล์ spermatid vesicle จำนวนมากภายในcytoplasmของ spermatid รวมกันกลายเป็น vesicle ขนาดใหญ่อยู่ที่ขั้วหนึ่งของเซลล์ นิวเคลียสเกิด condensation และ decondensation ตามลำดับ เกิดอะโครโซม แกรนูล (acrosome granule) ขึ้นภายใน vesicle ในระยะต่อมาเกิดการเจริญของหางเรียก spike ขึ้นต่อจากอะโครโซมัล แกรนูล vesicle ขนาดเล็กลงมีลักษณะคล้ายหวนรองรับส่วนล่างของนิวเคลียสเรียก cap โครงสร้างของเซลล์อสุจิที่เจริญเต็มที่ประกอบด้วย uncondensed nucleus ที่ฐานนิวเคลียสมี cap รองรับมี base อยู่ใจกลาง cap ที่หางเรียก spike ขึ้นต่อจาก base

Jery Klag and Piotr Swiatek (1999) ศึกษาความแตกต่างของPGCs ในระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์ในเอมบริโอของ *Allacma fusca* (L.) (Collembola: Symphypleona)พบว่า PGCs ที่อายุน้อยที่สุดของ *Allacma fusca* (L.) สามารถที่จะจำแนกได้ในเอมบริโอที่ระยะ Blastoderm ซึ่งกระจายในไข่แดง เรียงกันเป็นคู่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์และกระจายอยู่ในระหว่าง แกรนูลซึ่งเป็นพื้นที่เล็กๆก่อนไปทางด้านบนของไข่แดง มีการพัฒนาในชั้น mesoderm ของแถบเซลล์สืบพันธุ์ PGCs จะมีการอพยพผ่านทางด้านท้องของแถบเซลล์สืบพันธุ์และเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ mesoderm ทำให้กลุ่มเซลล์ทั้งสองกลุ่มอยู่ในส่วนซ้ายและขวาทางทางด้านท้องเซลล์ mesoderm อยู่ใกล้ชิดกันกับ PGCs จะอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นที่ 1ของเยื่อหุ้ม gonad และสร้างเป็นแผ่นบางๆแยกจากเซลล์ mesoderm PGCs จะเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่มจนหมดระยะการพัฒนาเอมบริโอ ปัจจุบัน พบว่า PGCs ไม่ได้อยู่กันเป็นคู่ๆแต่ยังคงแยกเป็นแขนงเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์

Damrongphol and Jaroensastraraks (2000) ศึกษาลักษณะการเจริญของ Primordial Germ Cells ใน กุ้งก้ามกราม พบว่า PGCs ในระยะแรกของเอมบริโอกุ้งก้ามกราม ที่1.5-2.5 วันของการพัฒนา เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ที่เห็นนิวคลีโอลชัดเจน มีส่วนของแกรนูลไซโตพลาสมน้อย ไม่ทำปฏิกิริยากับ periodic acid-Schiff และ alkaline phosphatase ที่เอมบริโอ 6.5 วัน PGCs จับกลุ่มกันที่ด้านหลังบนแถบด้านบนตอนกลางของไข่แดง ที่เอมบริโอ 14.5 วัน พบที่ด้านหน้าของหัวใจ ซึ่งไม่สามารถพบ PGCs ได้ทั้งใน อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้หรืออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มีเพียงระยะ spermatogonia ที่เซลล์มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ PGCs ในเอมบริโอ

Sobhon et al. (2001) และคณะศึกษาโครงสร้างการพัฒนาที่แตกต่างกันของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าชื่อ เพศผู้ *Haliothis asinina* พบว่า ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีการพัฒนา 14 ระยะ ตามโครงสร้างและรูปแบบการหดตัวของโครมาติน ระยะ spermatogonium มีรูปร่างของเซลล์กลมหรือรี มีขนาดประมาณ 8 μm นิวเคลียสมี euchromatin จำนวนมากมีเพียง heterochromatin ที่ขอบบางๆ ล้อมรอบนิวเคลียสไว้ ที่ระยะ primary spermatogocytes (PrSc) แบ่งเป็น 6 ระยะคือ Leptotene (LSc), Zygotene (ZSc), Pachytene(PSc), Diplotene (DSc), Diakinesis (DiSc)และ Metaphase



(MSc) ในระยะแรกเซลล์มีรูปร่างกลมและเพิ่มขนาดขึ้นเรื่อยๆ จาก 12-14 μm จากระยะ LSc เป็น PSc จากนั้นจะลดขนาดลง 10-7 μm จาก DSc เป็น MSc ซึ่ง LSc มีท่อนของ Heterochromatin เล็กๆ กระจายทั่วนิวเคลียส ส่วน ZSc มีท่อนโครมาตินที่มีความหนาและยาวเพิ่มขึ้น พบใหญ่ที่สุดใน PSc ระยะ secondary spermatocytes (SSc) มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 8 μm อยู่กันเป็นแถวชั้นระหว่าง spermatids กับ primary spermatogocytes แบ่งเป็น 4 ระยะคือ St1 มีรูปร่างของเซลล์กลมขนาดใหญ่ (ประมาณ 5-6 μm) นิวเคลียสมีเส้นใยโครมาตินกระจายสม่ำเสมอ St2 นิวเคลียสลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง กลายเป็นรูปรี เส้นใยโครมาตินอัดกันแน่น St3 นิวเคลียสยืดยาว เส้นใยโครมาติน ขยายตัวประมาณ 40 nm St4 ประมาณ 3 \times 2 μm นิวเคลียสยาวเพิ่มขึ้นมี acrosome กลุ่มที่ขั้วด้านหัวระยะ spermatozoon มีหัวเป็นรูปกรวย (ประมาณ 3 \times 1.5 μm) โครมาตินอัดกันแน่นสมบูรณ์ที่หัวคลุมด้วย acrosome รูปร่างคล้ายหมวก

Apisawetkan *et al.* (2001) และคณะ ศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียในหอย เป้าชื่อ *Haliotis asinina* พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในไข่มีการพัฒนาการ 6 ระยะ oogonium และระยะ oocyte อีก 5 ระยะ ระยะ oogonium มีรูปร่างคล้ายหอยแครงเซลล์มีขนาด 8-10 μm เกาะติดกับ trabecula นิวเคลียสมีท่อน Heterochromatin เรียงตามเยื่อหุ้มเซลล์มีนิวเคลียสขนาดเล็ก ในไซโทพลาซึม มี ribosome จำนวนมาก oocyte ระยะที่ 1 เป็นเซลล์กลม ขนาด 12-25 μm ในนิวเคลียส มี lampbrush chromosome ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยโครโมติน 3 ขนาด คือ 10-200, 40-60, 7-12 nm oocyte ระยะที่ 2 มีรูปร่างกลม ขนาด 25-35 μm ที่นิวเคลียสจะมีการเพิ่มการคลายตัวของโครมาตินและนิวคลีโอลัส มีไซโทพลาซึมมาก oocyte ระยะที่ 3 มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ขนาดประมาณ 35-70 μm lampbrush chromosome คลายตัวสมบูรณ์ เริ่มปรากฏแกรนูลของไข่แดงที่มีรูปร่างคล้ายไข่ oocyte ระยะที่ 4 มีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ เซลล์มีขนาด 50-80 μm ในนิวเคลียสโครมาตินคลายตัวสมบูรณ์ นิวคลีโอลัสขยายตัวสูงขึ้น ในไซโทพลาซึมมีหยดไขมัน (ขนาด 1.5-3 μm) oocyte ระยะที่ 5 คล้ายกับระยะที่ 4 มี vitelline-jelly coat หนา และมีลักษณะเป็นเส้นๆ มีรูปร่างไม่แน่นอน

Suwannarong (2003) ศึกษาผลของ N⁶, 2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphate (dbcAMP), leukemia inhibitory factor (LIF) และ forskolin (FRSK) ต่อการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์และการเจริญของเอมบริโอ กิ่งก้านการที่เพาะเลี้ยงใน *in vitro* พบว่าจากผลของการทดลองเห็นชัดว่า dbcAMP ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mM สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในเอมบริโอ ระยะ 5.5 วัน ได้ดีกว่า ระยะ 3.5 วัน ความผิดปกติ เกิดขึ้นกับการเจริญของเอมบริโอในระยะแรกเพราะความไวต่อ dbcAMP



ส่วนการเพาะเลี้ยงร่วมกับ LIF ในทุกความเข้มข้นมีผลเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งระยะอายุ 3.5 และ 5.5 วัน แต่ที่ความเข้มข้นระดับสูงของ LIF กลับลดอัตราเร็วในการเจริญของ คาโนเอมบริโอ แต่ในทางตรงข้ามการเพิ่มระดับของ cAMP โดยใช้ FRSK นั้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญหรือเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในเอมบริโอทั้งในระยะ 3.5 หรือ 5.5 วันจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า LIF มีความสำคัญต่อการควบคุมการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นจึงอาจใช้เป็นตัวเสริมในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอทั้งการรวม เพื่อกระตุ้นการเจริญของ เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์

Thompson *et al.* (1964) ได้ศึกษาผลของวิตามินคือการสืบพันธุ์ของหนู พบว่า หนูเพศเมีย ที่ขาดวิตามินเอจะมี estrous cycles ปกติ และจะเป็นหมัน แต่ถ้าไม่เป็นหมัน ฟัคัสจะถูกดูดเอาไว้ไม่ หลุดออกมา ความผิดปกติที่ตรวจพบครั้งแรก คือ การเกิด necrosis และรูปร่างแบบบางหลาย ลักษณะแทรกอยู่บริเวณ placental disk ของหนูที่ตั้งครรภ์ได้ 16 วัน การให้ retinol ภายหลังการ ตั้งครรภ์ได้ 10 วัน ส่งผลให้ลูกที่เกิดมามีสุขภาพที่ดี เนื่องจาก retinoic acid ได้ช่วยบำรุงในระยะแรก ของการตั้งครรภ์ เมื่อให้ retinol ในปริมาณที่น้อยมากในระหว่างการตั้งครรภ์ ตัวอ่อนที่เกิดมาจะตาย หรืออ่อนแอ แต่เมื่อให้วิตามินเอในปริมาณที่สูงขึ้นและนำลูกที่เกิดมาไปเลี้ยงในอาหารเสริมที่ไม่ใช่ นม พบว่า สามารถเลี้ยงได้ประสบความสำเร็จ หนูเพศผู้ที่ให้อาหารที่มี retinoic แต่ไม่ใช่ retinol จะมี ลักษณะเล็กและอัมพาตมักเกิด oedematous บ่อยๆ germinal epithelium กระจายได้หลุดออกไป และบาง spermatocytes และ spermatogonia ได้เกาะกันอยู่อย่างหนาแน่น seminal vesicles จะมี ลักษณะเล็กกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ retinol การให้อาหารที่มี retinol จะไปช่วยซ่อมแซม กระบวนการสร้างสเปิร์ม และส่งเสริมการพัฒนาของอัมพาตให้เป็นไปอย่างปกติ และยังทำให้ seminal vesicles เจริญได้ดีอีกด้วย

Pelt and Rooij (1990) ได้ศึกษาเนื้อเยื่อ sceminiferous ในหนูที่ขาดวิตามินเอหลังจากที่ได้รับ วิตามินเอเข้าไป พบว่า ใน seminiferous tubules ของหนูที่ขาดวิตามินเอยังคงมี spermatogonia เหลืออยู่ โดยเซลล์อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เป็นคู่ เป็นกลุ่ม 2 เซลล์ 8 เซลล์ หรือมากกว่านั้น การติด ฉลาก bromodeoxyuridine ที่เป็นตัวบ่งชี้ และ mitotic ตัวบ่งชี้ของเซลล์ พบ 9% และ 1% ตามลำดับ แสดงว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างช้าๆ การทำงานของวิตามินเอ (retinol-acetrate) มีผลใน reinitiation ของการสร้างสเปิร์ม อย่างเช่น เนื้อเยื่อพบเกิดขึ้นอย่างพร้อมๆ กัน อัตราการพัฒนาของ เซลล์สเปิร์มหลังจากที่ได้รับวิตามินเอเข้าไป 7-21 วัน สามารถพบสเปิร์มได้เหมือนกับในหนูปกติ และหลังจากที่วิตามินเอทำงานแล้ว 24-30 ชั่วโมง พบว่า ในตัวบ่งชี้ที่ติดฉลากมีรอยพับ a4-6 เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามตัวบ่งชี้ที่ติดฉลากจะต่ำลง ในขณะที่ mitotic ตัวบ่งชี้สูงขึ้น 10% และพบตัวบ่งชี้ สูงขึ้นอีกครั้งหลังจากนั้น 3 วัน ในระหว่าง 7 วัน หลังจากที่ได้รับวิตามินเอเข้าไปอัตราการพัฒนา



ของเซลล์สเปิร์มเป็นไปอย่างปกติ สามารถพิสูจน์ได้ว่า spermatogonia ได้คิดผลตก 24-30 ชั่วโมง หลังจากที่ได้รับวิตามินทำงานเป็น A1 spermatogonia และอีกประมาณ 3 ชั่วโมง จะหมุนเป็นระยะ s phase และการสร้างสเปิร์มของหนูที่ขาดวิตามินเอจะถูกยับยั้งในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ก่อนช่วง s phase ของ A1 spermatogonia หลังจากการทำงานของวิตามินเอ spermatogonia จะมีการแบ่งเซลล์ 6 ครั้ง ตามลำดับ และในที่สุดจะพัฒนาเป็น spermatids

Chuwa (1997) ได้ทำการศึกษาทดลองให้วิตามินเอ 10^{-5} mol และ 10^{-6} mol กับเอ็มบริโอระยะแรกของ *Rana nigromaculata* ทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันออกไป เอ็มบริโอปกติโดยทั่วไปจะมีส่วนหัวที่มีขนาดเล็ก จากการให้วิตามินเอ ได้เอ็มบริโอที่มีลักษณะส่วนหัวผิดปกติ 2 แบบ คือ สมองส่วนหน้าและส่วนกลางสั้น มีตาขนาดเล็ก และ ได้เอ็มบริโอไม่มีสมองส่วนหน้าและส่วนกลาง ไม่มีตา เอ็มบริโอที่ได้รับวิตามินเอที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีลำดับการพัฒนาที่เหมือนกัน ถ้าช่วงระยะเวลาในการทดลองที่ยาวนานจะมีอัตราการผิดปกติที่สูงขึ้น และมีการตายมากขึ้น สัดส่วนและลำดับของความผิดปกติได้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของวิตามินเอ เอ็มบริโอที่ได้รับวิตามินเอในระยะที่มีการพัฒนาระบบประสาท การเปลี่ยนแปลงในระยะบลาสตูล่าช่วงหลัง และช่วงกลางของระยะแกสตรูล่าจะมีขนาดเล็กกว่าและมีอัตราการเกิดที่ต่ำกว่า ในทำนองเดียวกันกับการทดลองอื่นๆ เอ็มบริโอของปลาการ์ฟท์ที่ได้รับวิตามินเอ ผลจะมีลักษณะที่คล้ายกัน วิตามินเอ 10^{-5} mol และ 10^{-6} mol ส่งผลต่อการพัฒนาของกระดูกสันหลัง ของเอ็มบริโอและรบกวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างของระบบประสาทส่วนกลาง เป็นสาเหตุทำให้เกิดความบกพร่องของโครงสร้างอวัยวะส่วนหน้า ได้แก่ อวัยวะรับความรู้สึกพวกตา และส่วนหลังของเอ็มบริโอมีลักษณะแหงอย่างรุนแรง

Cupp *et al.* (1999) ได้ศึกษาถึงผลของ retinoids ต่อการพัฒนาของอวัยวะของเอ็มบริโอหนูพบว่า เมื่อตรวจดูเนื้อเยื่ออวัยวะในเอ็มบริโอที่มีอายุ 13 วัน โดยใช้วิธี RAR-selective antagonist และใช้ all-trans retinoic acid ยับยั้งการสร้าง seminiferous cord อย่างสมบูรณ์ retinoid และ retinoic acid ไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่ออวัยวะ โดยตรงแต่ยับยั้งการแสดงออกของตัวกระตุ้นการเจริญ โดย retinoic acid ยับยั้ง Follicle stimulating hormone (FSH), epidermal growth factor (EGF) และ 10% calf serum ที่เป็นตัวกระตุ้นการเจริญของเนื้อเยื่ออวัยวะ การทดสอบสมมติฐานจะแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งของ retinoic acid ต่อการเจริญของอวัยวะซึ่งอาจจะขัดขวางตัวกระตุ้นการเจริญ (Transforming growth factor- β : TGF β) retinoids มีการทำงานบน TGF β mRNA โดย retinoic acid จะไปกระตุ้น TGF β mRNA ให้แสดงออกภายใน 24 ชั่วโมงและมีการแสดงออกของ TGF β 1 และ TGF β 2 เพิ่มขึ้น หลังจากการทำทดลองแล้ว 72 ชั่วโมง จากการสังเกตนี้แสดงให้เห็นว่า retinoic acid มีอิทธิพลต่อรูปแบบของ seminiferous cord และการเจริญของอวัยวะ การยับยั้งการแสดงออก



ของ retinoic acid อาจอยู่ในส่วนที่เข้าขัดขวางการเพิ่มการแสดงออกของยีน TGF β ในแบบที่เหมือนกัน

Morita and Jonathan (1999) ได้ศึกษาผลของ retinoic acid ต่อการแบ่งตัวของรังไข่ของฟิตัส พบว่า วิตามินเอมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง และการตายของเนื้อเยื่อต่างๆ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการพัฒนาของฟิตัส โดยได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อหาลักษณะการแสดงออกของ RA ต่อการตายของ germ cell ในเพศเมีย และการเกิด apoptosis พบว่า ในระหว่างการสร้างไข่ ประมาณ 90% ของ oogonia และ oocyte ที่มีในรังไข่ของฟิตัสเริ่มเกิด apoptosis กว่า 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ($P < 0.05$) โดยไม่มี trophic hormone เข้ามาช่วย การทดลองในทำนองเดียวกันได้ใช้การติดฉลากใน situ DNA ที่ปลาย 3' และเซลล์ที่กำหนด apoptosis ภูเก็ต 5-bromo-2' deoxyuridine รวมกันกับเซลล์ที่เพิ่มขึ้นที่กำหนดผลแสดงออกว่า RA มีคุณสมบัติเป็นทั้ง mitogen และ survival factor ของ germ cell ในเพศเมีย ยิ่งกว่านั้น RA สามารถกระตุ้น germ cell ให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการเพาะเลี้ยงรังไข่ของฟิตัสได้อย่างสมบูรณ์ ($P < 0.05$) โดยทำงานร่วมกันกับตัวยับยั้งของการถอดรหัส (α -amanitin, 0.1 $\mu\text{M}/\text{ml}$) หรือการสังเคราะห์โปรตีน (cyclohexamide, 1.0 $\mu\text{M}/\text{ml}$) โดยที่ RA เป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis ของ germ cell ยิ่งกว่านั้น การทำงานร่วมกันของรังไข่ในฟิตัสกับ 5 μM LY 294002 เป็นตัวยับยั้ง phosphatidylinositol 3'-kinase โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ RA ในการส่งเสริมการพัฒนาของ germ cell ($P < 0.05$)

Komada *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษารหัสของยีน E-MAP-115 (epithelial microtubule ที่ทำงานร่วมกันกับโปรตีนในจำนวน 115 kD) โดยใช้ RA ในการชักนำยีนให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ เพราะ nuclei ของ spermatid ได้เปลี่ยนรูปไปจากเดิม และ subsequent ของ germ cells ได้หายไปทีละน้อย ส่วน E-MAP-115 จะมีจำนวนคงที่ใน microtubules การรวมกันของ microtubules ที่กลายพันธุ์จะทำให้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ manchette ของ spermatids และ sertoli cell ผิดปกติ microtubule ที่ผิดปกตินี้ เป็นต้นเหตุให้ nuclei ของ spermatid ผิดปกติ และทำให้ germ cells ได้รับความเสียหาย ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า E-MAP-115 มีความสำคัญต่อการสร้างสเปิร์ม

Zhengwei *et al.* (2000) ได้ศึกษาผลของวิตามินเอต่อการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์และการผลิตไข่ของ Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) โดยให้อาหารที่มีวิตามินเอแก่ Japanese quail เพศเมีย 4 mg/kg (RA) หรือ retinyl acetate 5000 IU/kg (VA) หรือ 1400 IU/kg (VA_2) หลังจากให้อาหารที่มี RA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ Japanese quail จะมีท่อน้ำไขและรังไข่ที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ VA เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ($P < 0.05$) ทั้งยังมีน้ำหนักตัวที่มากกว่า และกลุ่มที่ได้รับ RA ยังวางไข่ครั้งแรกก่อนกลุ่มที่ได้รับ VA_2 ประมาณ 5 วัน และยังวางไข่



ในปริมาณที่มากกว่า ในทำนองเดียวกันกลุ่มที่ได้รับ RA มีการวางไข่ครั้งแรกก่อนกลุ่มที่ได้รับ VA_2 และมีการวางไข่ในปริมาณที่มากกว่าเช่นกัน

Livera *et al.* (2001) พบว่า Retinoic acid receptors ทำให้ RA มีผลต่อการพัฒนาของหนู โดย RA มีผลต่อการพัฒนาของ Leydig Sertoli และ germ cell ในเนื้อเยื่อของอัณฑะ ซึ่งได้ทดสอบกับ receptors โดยการเติม selective agonists และ antagonists ของ retinoic acid receptors (RARs) หรือ retinoic X receptors (RXRs) ในระบบการเพาะเลี้ยงอวัยวะเดียวกัน พบว่า $RAR\alpha$ agonist จำลองของ RA มีผลอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงฟิดัส หรือ neonatal testis ในขณะที่ $RAR\beta$, γ และ RXR agonist ไม่มีผล $RAR\alpha$ agonist ลดการผลิต testosterone ส่วนจำนวน gonocytes และ eAMP ยังตอบรับต่อ FSH ของอัณฑะของฟิดัส ผลนี้สามารถย้อนกลับได้โดย $RAR\alpha$ antagonist และไม่สามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดย $RAR\beta/\gamma$ antagonist อย่างไรก็ตาม $RAR\beta$ antagonist ก็ทำให้ Sertoli cell เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ในอัณฑะ และถูกชักชวนโดย $RAR\beta$ antagonist ส่วน $RAR\gamma$ และ RXR agonist ทั้งหมดไม่มีผลต่อการคัดเลือก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ผลของ RA ทั้งหมดต่อการพัฒนาของฟิดัสและ neonatal testis ถูกชักชวนโดยผ่านทาง $RAR\alpha$ ยกเว้นผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ Sertoli cell ที่ผ่านทาง $RAR\beta$

Leavcher *et al.* (2003) พบว่า อัณฑะของฟิดัสเกิดจากการขยายของ mesonephric และ coelomic epithelia ซึ่งอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม PGCs ซึ่งทำหน้าที่พัฒนาเป็นเซลล์สำคัญ 3 ชนิด คือ Leydig, Sertoli และ Germ cells โดยมี intra- และ extra-testicular factors ต่างๆ เป็นตัวควบคุมหน้าที่และการพัฒนาที่เกิดขึ้น สังกัดการพัฒนาของเซลล์ที่สำคัญทั้ง 3 ดังกล่าวได้จากการทดลองในหลอดทดลอง โดยใช้ regulators ที่แตกต่างกัน ได้แก่ gonadotropin releasing hormone, follicle stimulating hormone, transforming growth factor- β , insulin-like growth factor-1, anti-mullerian hormone, retinoic acid และ estrogen ผลการทดลอง พบว่า ลักษณะทางสรีระวิทยาของสัตว์ทดลองที่มีความเหมาะสมในการจำลองการเคลื่อนย้ายขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า อัณฑะส่วนใหญ่จะมีลักษณะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างออกไปจากอัณฑะของตัวอ่อนหรืออัณฑะของตัวเต็มวัย จนในที่สุดอัณฑะของฟิดัสจะไม่เจริญ เมื่อโตเต็มวัยจะมีอัณฑะขนาดเล็ก

Hui and Kim (2004) พบว่า retinoic acid ยับยั้งการพัฒนาของ XY gonad ในหนู โดยการย้ายกลุ่ม mesonephric cell และทำให้จำนวน gonocytes ลดลง การยับยั้งการพัฒนาของ XY gonad ในเอ็มบริโอโดย retinoic acid receptor α ($RAR\alpha$) สังเกตได้จากลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้น ซึ่งประกอบด้วย การเคลื่อนที่ของเซลล์จาก mesonephros ที่คือ ไปยัง gonad การเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างของ fetal sertoli cell และการอยู่รอดของ gonocytes ในการเพาะเลี้ยงส่วนของ



XY gonad ของเอ็มบริโอหนูอายุ 13 วันจากหนู all-trans-retinoic acid (AtRA) ยับยั้งการเคลื่อนย้ายของ mesonephric cell ไปยัง gonad นอกจากนี้ การใส่ AtRA จะลดการแสดงออกของการยับยั้ง Mullerian ที่เป็นส่วนสำคัญใน sertoli cells และลดจำนวน gonocytes อย่างกะทันหัน โดยได้มีการเพิ่ม apoptosis เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อ XY gonad ด้วย AtRA การหายไปของ gonocytes น่าจะเกิดขึ้นจากการเพิ่ม apoptosis ในทำนองเดียวกัน AM580 สังเคราะห์ส่วนประกอบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง RAR α อย่างจำเพาะ และ Ro41-5253 รั้งความสามารถในการยับยั้งของ AtRA บนการพัฒนาของ XY gonad จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า retinoic acid แสดงออกโดย RAR α ส่งผลในทางลบต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างของ fetal sertoli cell และการอยู่รอดของ gonocyte การเคลื่อนย้ายของกลุ่ม mesonephric cell ดังนั้น วิตามินเอจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาของ XY gonad

Kaplan (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลง germ cell เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในตัวหนู (in vivo) ของหนูเพศผู้ พบว่า PGCs ปรากฏในเอ็มบริโอประมาณวันที่ 7 โดยมีการขนาดและเคลื่อนที่ไปสู่ genital ridge โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ใน stem cells ของเซลล์ต้นกำเนิด ที่รู้จักกันคือ spermatogonia ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นของการสร้างสเปิร์ม การย้ายกลุ่มเซลล์ spermatogonia จะขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของ PGCs เพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ได้แก่ Fe, c-kit, vasa, DAZL, fragilis, miwi, Mill และ Mill2 โดยมีการแสดงออกอย่างจำเพาะ ในทำนองเดียวกันการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะมี marker ดัดดัดกับ germ cell ที่มีการพัฒนาไม่จำเพาะกับกิจกรรมของอัลคาไลด์ฟอสเฟต และมีการถอดรหัส factor Oct 3/4 และ $\beta 1$ - และ 6α - และ $\alpha 6$ -integrins การแสดงออกของ PGCs จนถึง spermatogonia จะขึ้นอยู่กับการทำงานของ bone morphogenetic protein (BMO)-4 จากความรู้ดังกล่าวทำให้นักวิจัยสามารถแยก germ cell จาก stem cell ของเอ็มบริโอได้ และนำเข้าไปในเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจริงและในหลอดทดลองได้

Yao *et al.* (2005) ศึกษาส่วนประกอบทางเคมีและระบบย่อยอาหารในระหว่างการพัฒนาของกิ้งก่ามกรามในระยะเอ็มบริโอ พบว่า โปรตีน ไขมัน และ คาร์โบไฮเดรต เป็นส่วนประกอบสำคัญในเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราม โดยโปรตีนในไข่แดงเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างส่วนใหญ่ คาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นแหล่งให้พลังงาน ในระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอส่วนประกอบของโปรตีนทั่วไปเพิ่มขึ้น ในขณะที่ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตและไขมันลดลง อัตราส่วนของกรดอะมิโนที่พบในแต่ละขั้นของการพัฒนาของเอ็มบริโอไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยสัดส่วนของกรดกลูตามิกสูงสุดในจำนวนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น และกรดอะมิโนลิซีนสูงสุดในจำนวน



กรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนี้ยังพบว่า การทำงานของเอ็นไซม์ทริปซิน, เปปซิน, อะไมเลส, และ เซลลูเลส เพิ่มขึ้นทั้งในระยะแรกและระยะหลังของการพัฒนา แต่ลดลงในระหว่างช่วงกลางของการพัฒนา การทำงานของเอ็นไซม์ไลเปสจะสูงขึ้นหลังจากระยะแกสตรูลา การทำงานของเอ็นไซม์เปปซิน, ทริปซิน, อะไมเลส, และเซลลูเลส สูงขึ้นในระยะ Zoca จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า สัตว์ส่วนทางชีวเคมีและการทำงานของเอ็นไซม์ย่อยอาหารมีความสัมพันธ์กับการเกิดสัญญาณวิทยาในระหว่างการพัฒนาของเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราม

Pakdenarong (2005) ได้ศึกษาผลของ RA ต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งก่ามกรามในระยะเอ็มบริโอและระยะลาร์วาร์ โดยนำเอ็มบริโออายุ 2 ชั่วโมง ไปเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่มีความเข้มข้นของสารอัลทรานซ์เรติโนอิกในระดับต่างๆ คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากการทดลองพบว่าเอ็มบริโอในกลุ่ม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือมีจำนวน 29.25 ± 0.9 เซลล์ต่อเอ็มบริโอ ในขณะที่ชุดควบคุมมีจำนวน 15.5 ± 0.8 เซลล์ต่อเอ็มบริโอ และ พบว่า ลาร์วาที่ฟักฟักกลุ่มนี้ มีเซลล์สืบพันธุ์บริเวณที่จะเจริญเป็นอวัยวะสืบพันธุ์มากกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ จากผลการทดลองต่อระยะลาร์วาอายุ 1 วันหลังฟักเมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่มีความเข้มข้นของสารอัลทรานซ์เรติโนอิกในระดับต่างๆ คือ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.001% ของสารละลายโคเมททิลซัลฟอกไซด์ในน้ำทะเลเทียม 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน พบว่าลาร์วาในกลุ่มที่ได้รับสารอัลทรานซ์เรติโนอิก 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันที่ 20



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) JEOL รุ่น JEM 1230
2. Magnetic bar and magnetic stirrer ยี่ห้อ Fisher Scientific
3. pH meter รุ่น Denver Instrument Model 215
4. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) OLYMPUS รุ่น CH30
5. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่ต่อพ่วงอุปกรณ์ถ่ายภาพ ZEISS 459300
6. ตู้เย็น
7. Ultramicrotome (RMC products) รุ่น Power tome X
8. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น MEMMERT
9. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์เดี่ยว (Stereomicroscope) รุ่น OLYMPUS SZ30
10. ตู้ดูดความชื้น ยี่ห้อ WEIFO
11. ตู้ดูดควัน (Fume cupboard) ยี่ห้อ NEWLAB
12. เครื่องตัดมีดแก้ว (Glass Knife Maker) RMC Products
13. เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่นเสียง (ultrasomic cleaner) รุ่น CREST 575 HT

3.1.2 อุปกรณ์

14. บีกเกอร์ (beaker)
15. ครอบขวดวง (cylinder)
16. ขวดรูปชมพู่ (flask) -
17. Flat mold รุ่น SIDI 2443
18. ไบมีด
19. กระจกสไลด์
20. แผ่นทำความร้อน (hot plate) ยี่ห้อ Fisher Scientific
21. Loop
22. Grid



23. มีดแก้ว (glass knife)
24. ตู้เลี้ยงปลาขนาด 8×16×10 นิ้ว
25. ชุดแอร์ปั๊มและกล่องกรอง
26. ถ้วยระเหยสาร (Evaporating dish)
27. กระชอนตักกุ้ง
28. เข็มเย็บ
29. Petri-dish
30. กุ้งมือยาง
31. กระจกทรง
32. กระจกชำระ
33. Aluminum foil
34. Parafilm
35. Micro-pipette

3.1.3 สารเคมี

1. 16% Paraformaldehyde
2. 2.5% Glutaraldehyde
3. Osmium tetroxide (OsO_4)
4. Ethanol alcohol
5. Methanol
6. Toluidine blue
7. Borax
8. Uranyl acetate ($\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
9. Lead citrate $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
10. 0.2 M HCl
11. 0.2 M sodium cacodylate
12. $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$
13. น้ำกลั่น
14. Chloroform
15. Acetone
16. NaOH pallet



17. NSA - Nonenyl Succinic Anhydride Modified
18. ERL 4206 – vinyl cyclohexene dioxide (VCHD)
19. DER 736 – diglycidyl ether
20. DMAE – dimethylaminoethanol
21. All trans retinoic acid Sigma Chemical (St Louis, MO, USA)
22. Dimethylsulfoxide (DMSO), Sigma Chemical (St Louis, MO, USA)
23. Artificial Seawater (ASW)
24. Epoxy tissue stain (Cat # 14950)

3.2 ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง คือลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* จากศูนย์พัฒนาและวิจัยประมงน้ำจืด สถาบันประมงน้ำจืดจังหวัดมหาสารคาม โดยทำการคงสภาพปฐมภูมิด้วย Kanovsky's fixative แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อเก็บตัวอย่าง

1. การทดสอบ LC₅₀ (The median lethal concentration)

1.1 เก็บพ่อพันธุ์กุ้งก้ามกรามที่มีน้ำหนัก 60-100 กรัม และแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่มีน้ำหนัก 25-30 กรัม จากหมู่บ้านคันธาราราชบุรี อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม นำมาแยกเลี้ยงในตู้กระจกขนาดความกว้าง 8 นิ้ว ความยาว 16 นิ้ว และความสูง 10 นิ้ว ที่มีน้ำอยู่ ¼ ของตู้ คูละ 1 ตัว จำนวน 10 ตู้

1.2 ให้อาหารชนิดเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง และเปลี่ยนน้ำให้เหลือปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำเดิมที่มีอยู่ทุกๆ 5-6 วัน

1.3 เมื่อตัวเมียลอกคราบพร้อมที่จะผสมพันธุ์ ย้ายตัวผู้ไปใส่ในตู้ที่มีตัวเมียอยู่เพื่อให้ตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กัน หลังจากตัวเมียได้รับการผสมพันธุ์แล้วจึงย้ายตัวผู้กลับตู้เดิม

1.4 หลังจากตัวแม่กุ้งได้รับการผสมพันธุ์แล้ว 24 ชั่วโมง นำไข่ที่ตกอยู่ที่หน้าห้องมาทดสอบ LC₅₀ (The median lethal concentration) เพื่อหาความเข้มข้นของ AIRA ที่ทำให้เอ็มบริโอของกุ้งก้ามกรามได้รับแล้วตาย 50%

โดยนำไข่ที่อยู่หน้าห้องของแม่กุ้งมาแยกให้กระจายเป็นไข่เดี่ยวๆ ภายใต้อ่าง จุลทรรศน์แบบใช้แสง (Sterco light microscope) และแบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 100 ฟอง นำแต่ละกลุ่มไปเลี้ยงในถ้วย



ระเหยสารขนาด 80 ml ที่มี 20 ml ของ สารละลาย AiRA ใน 15% ASW ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml และ 150 µg/ml ตามลำดับ และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน

1.5 นำเอ็มบริโอที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนตัวที่ตายออก บันทึกผลการทดลอง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในแม่งู 1 ตัว นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร AiRA ที่ใช้เลี้ยงและเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอ

2. การเลี้ยงเอ็มบริโอใน AiRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

2.1 เลือกระดับความเข้มข้นของ AiRA ที่ทำให้เอ็มบริโอตายน้อยกว่า 50% จากข้อ 3.3.1.1.5 เพื่อใช้เลี้ยงเอ็มบริโอ 4 ระดับความเข้มข้น ซึ่งระดับความเข้มข้นที่เลือก คือ 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml และ 150 µg/ml ตามลำดับ ให้เป็นชุดทดลอง และให้เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 15% ASW และ 0.6% DMSO ใน 15% ASW 100 ml เป็นชุดควบคุม

2.2 นำไขกึ่งก้ามกรามที่ได้รับการผสมแล้ว 24 ชั่วโมง มาแบ่งเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 200 ฟอง แยกเลี้ยงในถ้วยระเหยสารขนาด 80 ml ที่มี 20 ml ของ 15% ASW, 0.6% DMSO ใน 15% ASW 100 ml, และสารละลาย AiRA ใน 15% ASW ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml และ 150 µg/ml ตามลำดับ โดยนำชุดทดลองไปเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 วัน

2.3 เมื่อครบ 2 วัน นำชุดทดลองมาล้าง AiRA ออกด้วย 15% ASW 2-3 ครั้ง นับจำนวนตัวที่ตายออก เปลี่ยนสารที่ใช้เลี้ยงเป็น 15% ASW แทน AiRA จนกระทั่งถึงวันที่ 20 และนับจำนวนเอ็มบริโอที่ตายของชุดควบคุมออกแล้วเปลี่ยนสารละลาย 15% ASW โดยนับจำนวนไข่ที่ตายและเปลี่ยนสารละลาย 15% ASW ทุกวัน จนกระทั่งถึงวันที่ 20

2.4 หาเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอในแต่ละความเข้มข้นของสารที่ใช้เลี้ยงจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนเอ็มบริโอที่ตายทั้งหมดในแต่ละความเข้มข้นของสารที่ใช้เลี้ยง}}{\text{จำนวนเอ็มบริโอทั้งหมดที่เลี้ยงในแต่ละความเข้มข้นของสาร}} \times 100$$

2.5 นำข้อมูลอัตราการตายของเอ็มบริโอไปหาช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% ซ้ำอีกครั้ง ตามวิธีการวิเคราะห์แบบโพรบิต (Probit analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows version 11.0

2.6 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในแต่ละการทดลอง

3.2.3 การเตรียมตัวอย่าง

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีดังนี้

1. นำมาล้างน้ำยาของสภาพปฐมภูมิออก ด้วย Cacodylate buffer 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที



2. คงสภาพทึบด้วย Osmium tetroxide 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ 20 นาที
3. นำตัวอย่างที่ล้างเสร็จแล้ว ไปแช่ acetone ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้
 - 3.1 แช่ตัวอย่างใน 20% acetone 20 นาที
 - 3.2 แช่ตัวอย่างใน 40% acetone 20 นาที
 - 3.3 แช่ตัวอย่างใน 60% acetone 20 นาที
 - 3.4 แช่ตัวอย่างใน 80% acetone 20 นาที
 - 3.5 แช่ตัวอย่างใน 100% acetone 2 ครั้งๆ ละ 20 นาที
4. Infiltration แทนที่ dehydration agent ผสมพลาสติก (Spurr's resin) เพื่อให้รูปร่างและองค์ประกอบภายในคงรูป
 - 5.1 แทนที่ acetone ด้วยพลาสติกอัตราส่วนของ acetone : Spurr's 2:1 3 ชั่วโมง
 - 5.2 แทนที่ acetone ด้วยพลาสติกอัตราส่วนของ acetone : Spurr's 1:1 3 ชั่วโมง
 - 5.3 แทนที่ acetone ด้วยพลาสติกอัตราส่วนของ acetone : Spurr's 1:2 3 ชั่วโมง
6. Penetration ผ่านกระบวนการแทรกซึม ด้วย pure Spurr's 3 ครั้งๆ ละ 3 ชั่วโมง
7. Embedding ผึ่งตัวอย่างลงบน flat mould
 - 7.1 ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยตัวอย่างขึ้นมาครั้งละ 1 ตัวอย่าง จัดตัวอย่างลงบน flat mould ทั้งทางด้านหัวและท้าย จัดทำให้ตัวอย่างอยู่ในท่าคว่ำหรือหงายเท่านั้น (เพื่อสะดวกในการตัดเนื้อเยื่อ)
 - 7.2 เมื่อผึ่งตัวอย่างเสร็จแล้วนำมาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง
8. การตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อ จะตัดเนื้อเยื่อที่ขนาด 60 nm
 - 8.1 ตบแต่งเกลาน้ำบดแล้วตัดพลาสติกส่วนเกินออกให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู
 - 8.2 ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Ultramicrotome โดยทำการตัดแบบหนา ก่อน (thick section) ให้มีความหนา 1200-1500 nm ด้วยมีดแก้ว ซ้อนตัวอย่างที่ลอยอยู่ด้วยลูป นำมาวางบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นหยดไว้แล้ว นำสไลด์วางบนแผ่นความร้อน (hot plate) ที่ปรับระดับไว้ที่ระดับที่ 1 ให้น้ำกลั่นระเหยออกจนแห้ง หยดสี Toluidine blue หรือ Epoxy tissue stain ให้ท่วมเนื้อเยื่อ นำไปวางบนแผ่นความร้อนจนสังเกตเห็นขอบสีเริ่มไหม้เป็นสีเขียว นำมาล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ล้างด้วยกล่องจุลทรรศน์แบบสองตา เพื่อหาเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์
 - 8.3 นำสไลด์ที่พบเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ แล้วปิดผนึกสไลด์ด้วย Permount ทิ้งไว้ให้แห้งนำไปบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ต่อเชื่อมกล้องดิจิตอล



- 8.4 นำบล็อกที่ผ่านการตัดแบบหนา มาตัดแบบบางต่อด้วยมีดเพชรให้ได้ชั้นเนื้อเยื่อความบาง 60-90 nm แล้วใช้รูปซ้อนเนื้อเยื่อวางบน Grid
9. การย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย โลหะหนัก Uranyl acetate และ Lead citrate
- 9.1 ตัดพาราฟิล์มเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส พับขอบขึ้นวางใน petri-dish
- 9.2 ตัดกระดาษกรองเป็นรูปวงกลมเพื่อพับเป็นกรวยใช้กรอง Uranyl acetate ให้หยดลงบนพาราฟิล์ม เท่ากับ Gridที่จะย้อมในแต่ละครั้ง
- 9.3 วาง Grid ด้านที่มีตัวอย่างลงบน Uranyl acetate (UA) ปิดฝาจานแล้วครอบด้วยกล่องมีคานอย่างน้อย 10 นาที
- 9.4 นำ Grid ตัวอย่างจาก UA ชับน้ำจุ่มล้างด้วย 50% methanol จุ่มขึ้นลง 20 ครั้ง แล้วชับน้ำและล้างด้วยน้ำกลั่นกรองดื่ม 20 ครั้ง (ชับน้ำด้วยกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสามเหลี่ยม)
- 9.5 วาง Grid ด้านที่มีตัวอย่างลงบน Lead citrate นาน 15 นาที
- 9.6 หยิบ Grid จาก Lead citrate ชับน้ำจุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นกรองดื่ม 2 บีกเกอร์ โดยจุ่มขึ้นลงบีกเกอร์ละ 20 ครั้งชับน้ำให้แห้งสนิทเก็บใน Grid box
10. นำ Grid ตัวอย่างไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และ บันทึกภาพ

3.2.4 การวิเคราะห์ผล

บันทึกและแสดงผลการทดลองในลักษณะของรูปภาพ สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย



บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

4.1 ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial Germ Cells, PGCs)

4.1.1 ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, LM)

จากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของลูกกุ้งระยะวัยอ่อนจนถึงระยะวัยรุ่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของลูกกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนอายุ 1 วันปรากฏอยู่บริเวณติดกับ Hepatopancreas มีขนาดเท่ากับ $10.20 \pm 0.31 \mu\text{m}$ มีลักษณะรูปร่างกลม มีปริมาตรของไซโทพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับนิวเคลียส มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ รูปร่างค่อนข้างกลม ผลจากการย้อมสี 1% Toluidine blue เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่ชัดเจนแต่เห็น

นิวคลีโอลัสชัดเจน พบนิวคลีโอลัส 3-5 อัน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามระยะตัวอ่อน อายุ 1 วัน

bar = 10 μm

PGCs = Primordial Germ Cells Ht = Heart, Hp = Hepatopancreas, Yc = Yolk



4.1.2 ผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission electron microscope, TEM)

จากการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของลูกกุ้งก้ามกรามระยะลาร์วาร์ 1 วัน ลักษณะของนิวเคลียส มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นใน มี Nuclear pore complex เชื่อมต่อระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสซึม ภายในนิวเคลียสมีโครมาติน (Ct) แบบ Heterochromatin มีนิวคลีโอลัส (Nc) เกาะติดตามขอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสมีทั้งบริเวณที่บีบ (dense nucleolus, dNc) และบริเวณที่สว่างกว่า (light nucleolus, lNc) ในไซโตพลาสซึมมีปริมาณของไซโตพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับสัดส่วนกับนิวเคลียส พบ ไมโทคอนเดรีย (M) ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมรี ขนาดเล็ก 2-3 อัน, เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (RER) เป็นเส้นสั้นๆ กระจายทั่วไซโตพลาสซึม, พบกอลจิ แอมพาราตัส (Go) มีจำนวนชั้นเรียงกันอยู่น้อย, ไรโบโซม (Ri) กระจายทั่วไซโตพลาสซึม และพบแกรนูล (Gn) จำนวนน้อยอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน อายุ 1 วัน

bar = 2 μ m

C = cytoplasm, Ct = โครมาติน, dNc = dense nucleolus, Gn = แกรนูล,
Go = กอลจิ แอมพาราตัส, lNc = light nucleolus, M = ไมโทคอนเดรีย, N = nucleus,
Nc = นิวคลีโอลัส, RER = เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ชนิดขรุขระ, Ri = ไรโบโซม



4.2 ผลการทดสอบ LC_{50} (The median lethal concentration) ที่ 48 ชั่วโมง

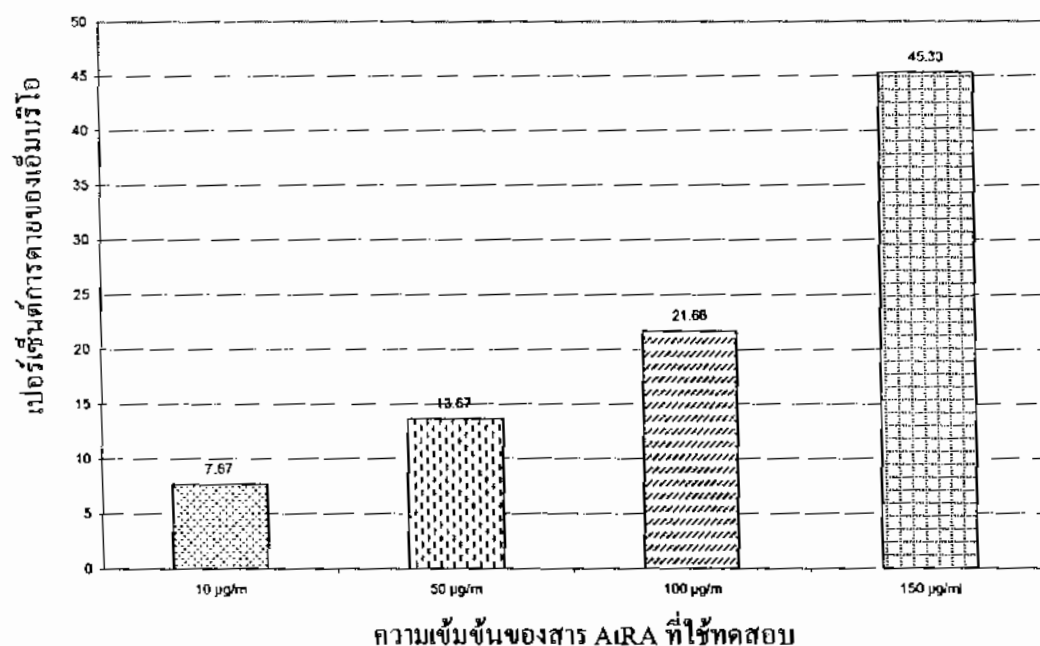
จากการทดสอบ LC_{50} เพื่อหาความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ทำให้เอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราคมตาย 50% โดยสารละลายมีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-150 $\mu\text{g/ml}$ (ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง) พบว่า อัตราการตายของเอ็มบริโอได้เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสาร ATRA โดยพบว่า ความเข้มข้นของสาร ATRA 150 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เอ็มบริโอมีอัตราการตายสูงที่สุดถึง 45.33% รองลงมา คือ 100 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ มีอัตราการตายเท่ากับ 21.66% และ 13.67% ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของสาร ATRA 10 $\mu\text{g/ml}$ เอ็มบริโอมีอัตราการตายน้อยที่สุด คือ 7.67% ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสาร ที่ใช้ทดสอบ LC_{50}	จำนวนเอ็มบริโอที่ตาย (ตัว)			รวม	เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ การตาย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3			
10 $\mu\text{g/ml}$	7	7	9	23	7.67	7.67
50 $\mu\text{g/ml}$	12	11	18	41	13.67	13.67
100 $\mu\text{g/ml}$	14	27	24	65	21.66	21.66
150 $\mu\text{g/ml}$	39	55	42	136	45.33	45.33

ดังนั้น LC_{50} ได้เท่ากับ $LC_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$



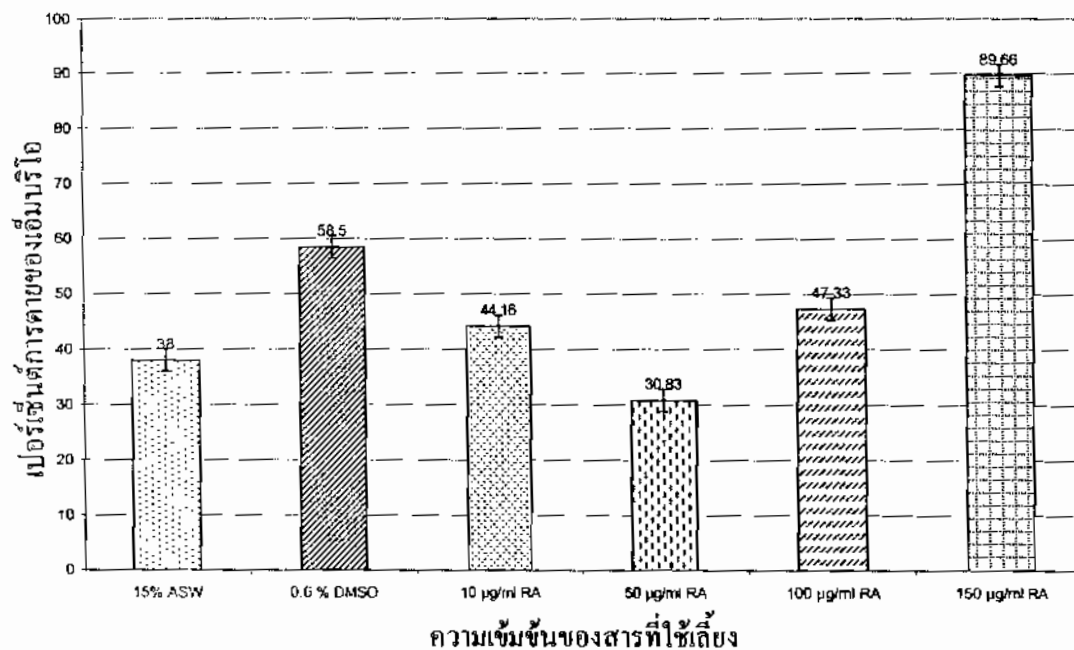


ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้ในการทดสอบ LC₅₀ ที่ 48 ชั่วโมงและอัตราการตายของเอ็มบริโอ

4.2.1 ผลการเลี้ยงเอ็มบริโอในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากการเลี้ยงเอ็มบริโอในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 15% ASW และ 0.6% DMSO ใน 15% ASW เป็นชุดควบคุมและเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml และ 150 µg/ml เป็นชุดทดลอง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) พบว่า ในชุดควบคุมเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 15% ASW มีอัตราการตายเพียง 38% ในขณะที่เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO ml มีอัตราการตายเท่ากับ 58.50% ในชุดทดลองเอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 150 µg/ml มีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 89.66% รองลงมา คือ 100 µg/ml และ 10 µg/ml มีอัตราการตายเท่ากับ 47.33% และ 44.16% ตามลำดับ ส่วนเอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 50 µg/ml มีอัตราการตายต่ำที่สุดคือ 30.83% และ พบว่า เอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 0.6% DMSO ใน 15% ASW, สาร ATRA เข้มข้น 10 µg/ml, 50 µg/ml และ 150 µg/ml มีอัตราการตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 15% ASW มีอัตราการตายไม่แตกต่างกันในทางสถิติกับเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน สาร ATRA เข้มข้น 10 µg/ml ในทำนองเดียวกัน เอ็มบริโอที่เลี้ยงใน ATRA เข้มข้น 10 µg/ml มีอัตราการตายไม่แตกต่างกันในทางสถิติกับเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 150 µg/ml





ภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้ในเลี้ยงและเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอ

จากกราฟแสดงให้เห็นว่าอัตราการตายของเอ็มบริโอมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้เลี้ยงเพิ่มขึ้น



4.3 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของ PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสภาวะ 20 วัน ที่เลี้ยงในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ในกลุ่มควบคุม ที่เลี้ยงใน 15% ASW (ภาพที่ 8A, B) พบอยู่ทางด้านหน้าของหัวใจ ด้านหลังระบบทางเดินอาหาร มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ มีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อย นิวเคลียสติดสีเข้ม เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน DMSO 0.6% ใน 15% ASW มีลักษณะคล้ายกัน คือ เป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ มีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อย นิวเคลียสติดสีเข้ม เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน (ภาพที่ 8C) ในกลุ่มทดลอง เอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$, PGC อยู่ที่ฐานของร่างกายในปล้องที่ 3 ใกล้เคียงกับ Hepatopancreas มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีเข้มเห็นนิวคลีโอลัสได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 8E, F) ลักษณะโครงสร้าง PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 9A, B) ไม่แตกต่างจาก PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ คือ มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีเข้มเห็นนิวคลีโอลัสได้อย่างชัดเจน มีปริมาณไซโตพลาสซึมน้อย แต่ PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ได้เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในถุง Gonad ส่วน PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ ได้มีการพัฒนา ไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายโอโอไซต์ (Oocytes) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ และมี Follicular cell เกิดขึ้น (ภาพที่ 9 C, D, E และ F)

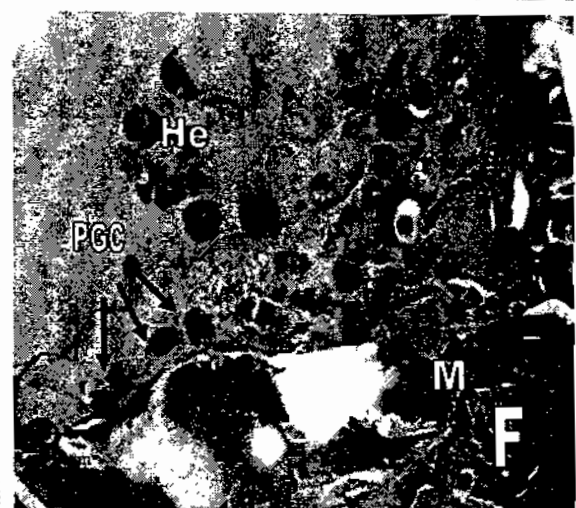
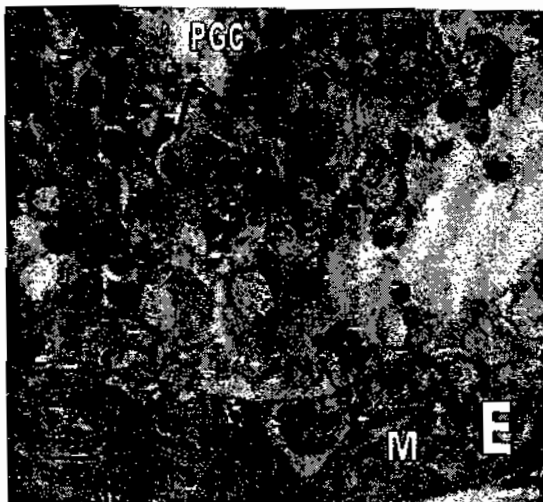
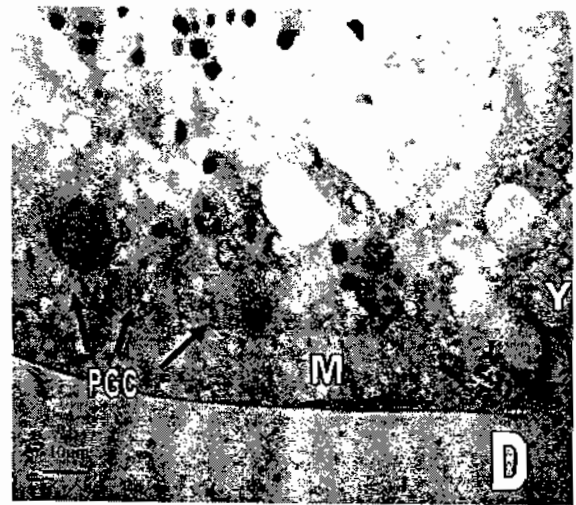
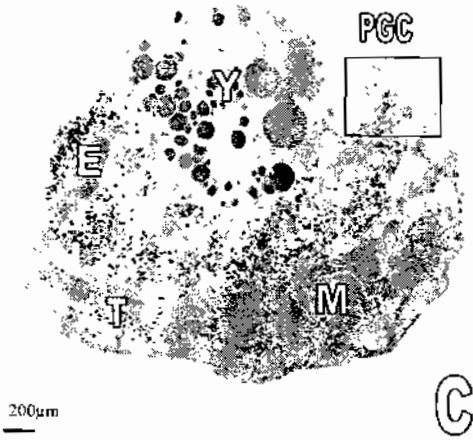
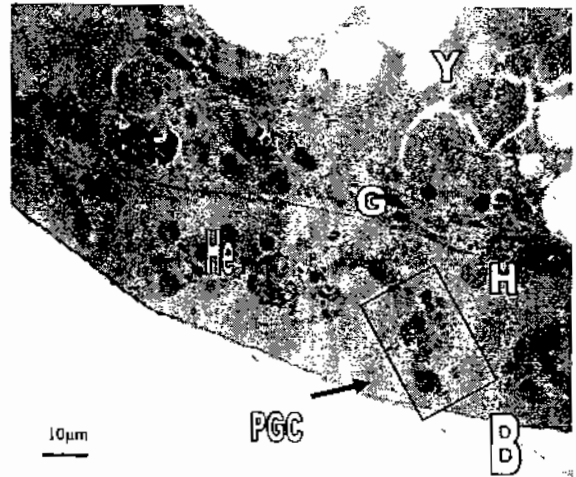
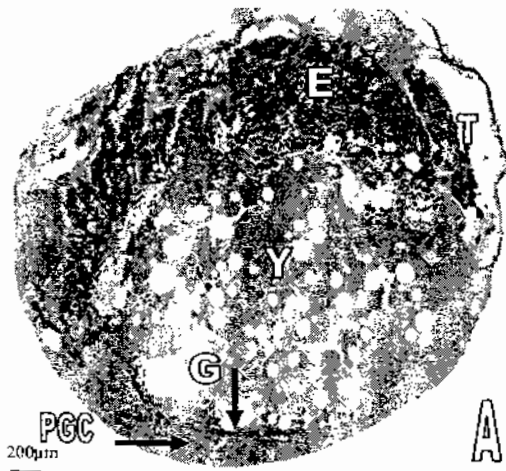


ภาพที่ 8 ภาพแสดงเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามอายุ 20 วัน และลักษณะโครงสร้างของเซลล์
ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

- A, B เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 15% ASW PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียส
ขนาดใหญ่ พบทางด้านหน้าของหัวใจ ด้านหลังระบบทางเดินอาหาร
- C, D เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO ใน 15% ASW PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาด
ใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ พบทางด้านหน้าของหัวใจ ด้านหลังระบบทางเดินอาหาร
- E เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 10 $\mu\text{g/ml}$ AiRA PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียส
ขนาดใหญ่ พบที่โคนขาเดินคู่ที่ 3
- F เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 50 $\mu\text{g/ml}$ AiRA PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียส
ขนาดใหญ่ พบที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 และได้เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในถุง Gonad

อักษรย่อ:	E	=	Eye
	G	=	Gut
	H	=	Hart
	He	=	Hepatopancreas
	M	=	Muscle
	PGC	=	Primordial germ cell
	T	=	Tail
	Y	=	Yolk





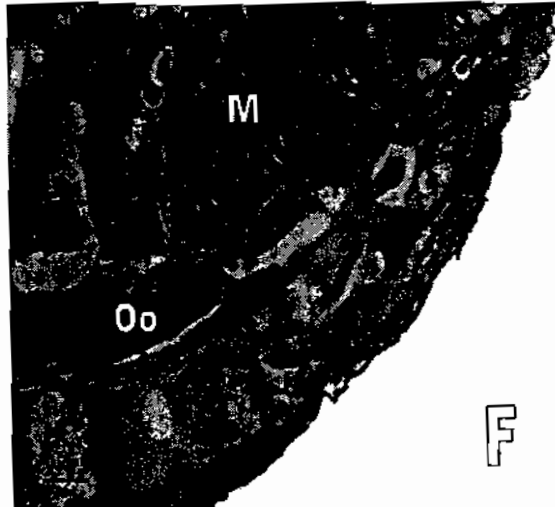
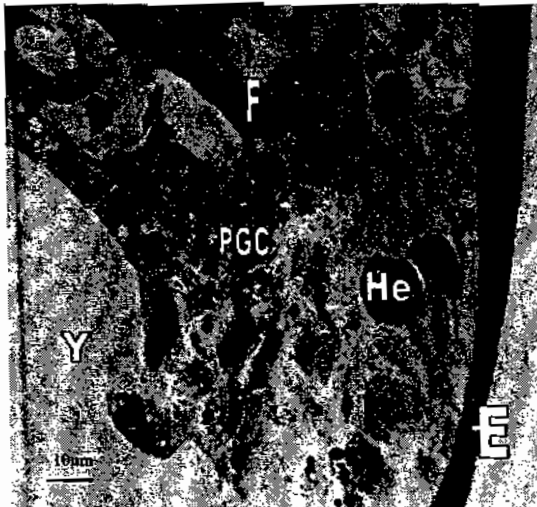
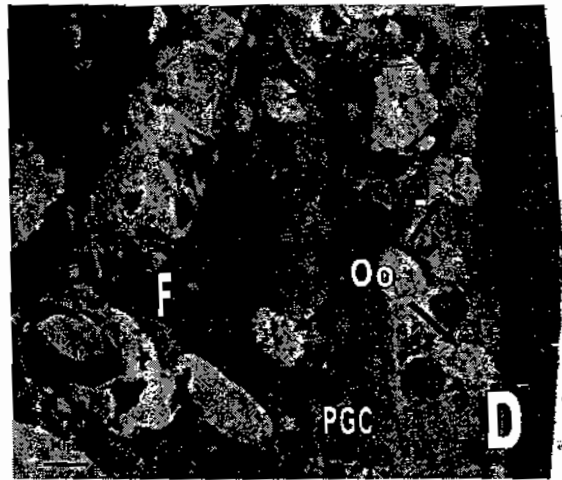
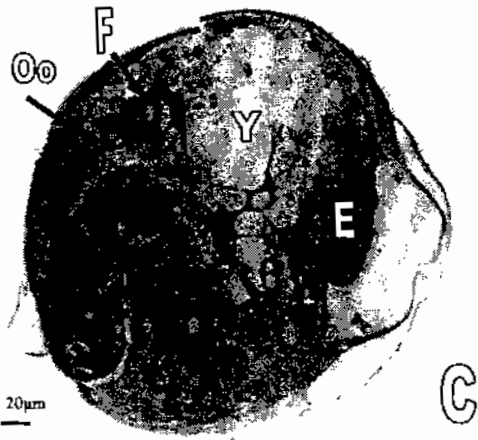
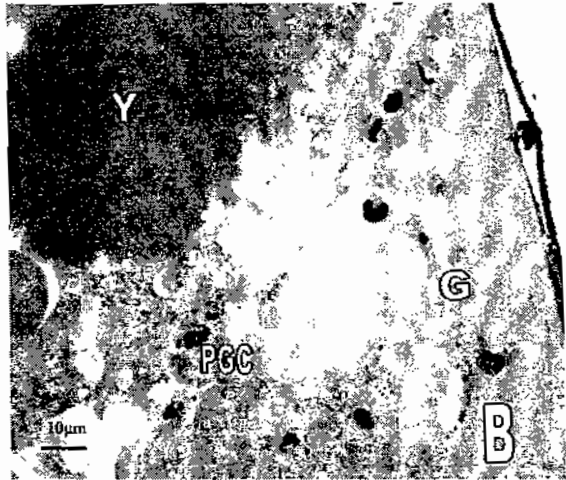
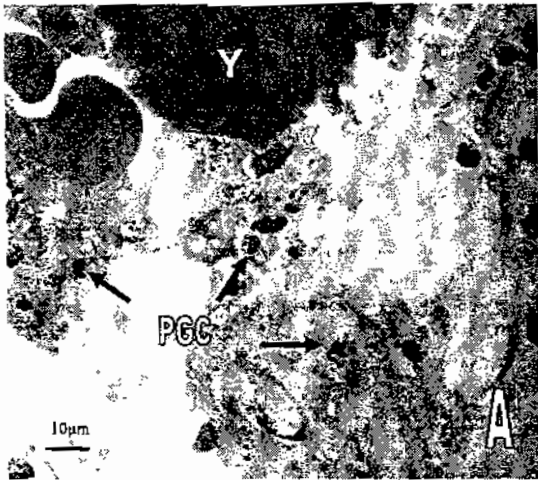
ภาพที่ 9 เอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรมอายุ 20 วัน และลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิด
เซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

A, B เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 100 $\mu\text{g/ml}$ AiRA PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่
นิวเคลียสขนาดใหญ่และ ได้เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในถุง Gonad

C, D, E, F เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย AiRA 150 $\mu\text{g/ml}$ PGCs ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะ
คล้ายโอโอไซค์ และมี Follicle cell เกิดขึ้น

อักษรย่อ:	E	=	Eye
	F	=	Follicular cell
	Hc	=	Hepatopancreas
	M	=	Muscle
	Oo	=	Oocyte
	PGC	=	Prinordial germ cell
	T	=	Tail
	Y	=	Yolk





4.4 ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้อง

จูลทรรศน์แบบส่องผ่าน

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของ PGC (Primordial germ cell) ในเอ็มบริโอของกิ้งก่ากรมอายุ 20 วัน ที่เลี้ยงในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10 A) ที่เลี้ยงใน 15% ASW, PGC มีลักษณะเป็นเซลล์ค่อนข้างกลม เห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน นิวเคลียส (Nucleus, N) ขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) น้อย บริเวณกลางนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ แต่อัดกันแน่นบริเวณขอบนิวเคลียส และกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส มีนิวคลีโอลัส 4 อัน เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane, Nm) 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นใน ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (Mitochondria, Mt) ลักษณะกลมขนาดใหญ่ จำนวนน้อย และไรโบโซม (Ribosome, R) กระจายอยู่ทั่วไป

PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 0.6% DMSO (ภาพที่ 10 B, C) มีลักษณะโครงสร้างค่อนข้างกลม เห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (Nucleus, N) ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ และอยู่อัดกันแน่นเป็นจุดๆ เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane, Nm) 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นใน ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) มีปริมาตรเท่ากับนิวเคลียส ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (Mitochondria, Mt) ลักษณะกลมขนาดใหญ่จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีไรโบโซมอิสระ (Ribosome, R) กระจายทั่วไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) และมีแวคิวโอล (Vacuole)

ในกลุ่มทดลอง เอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 10 D) PGC มีลักษณะโครงสร้างเป็นเซลล์ทรงกลม เห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน มีนิวเคลียส (Nucleus, N) ขนาดใหญ่ เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane, Nm) 2 ชั้น เยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอกมีขนาดใหญ่ มีปริมาณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) ค่อนข้างมาก ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ (Heterochromatin) และอยู่อัดกันแน่นเป็นจุดเล็กๆ ในไซโตพลาสซึม มีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria, Mt) ลักษณะกลมใหญ่หลายอันกระจายอยู่ มีแกรนูลขนาดใหญ่ลักษณะคล้าย Oil globule (Oi) 1 อัน อยู่ในไซโตพลาสซึม

PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 10 E, F) มีลักษณะโครงสร้างเป็นเซลล์ค่อนข้างกลม มีนิวเคลียส (Nucleus, N) ขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) เกือบเท่ากับนิวเคลียส โครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ (Heterochromatin) บริเวณกลางนิวเคลียสและอยู่อัดกันแน่นบริเวณขอบนิวเคลียส เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียส 2 ชั้น มีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria, Mt) ลักษณะกลมใหญ่หลายอัน มีแกรนูล (Granule, Gr) และไรโบโซมอิสระกระจาย (Free Ribosome, R) อยู่ในไซโตพลาสซึม



PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร AtRA เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4.6 A, B, C) มีลักษณะโครงสร้างเป็นเซลล์ก่อนข้างกลม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (Nucleus, N) บริเวณกลางนิวเคลียสมีโครมาตินเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ และอยู่อัดกันแน่นบริเวณขอบนิวเคลียส เห็นเชือกหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane, Nm) 2 ชั้น มี nuclear pore complex (Npc) เชื่อมต่อระหว่างนิวเคลียส (Nucleus, N) กับไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) นิวเคลียสขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึมเกือบเท่ากับนิวเคลียส มีเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบขรุขระ (rough Endoplasmic Reticulum) ไมโทคอนเดรียมีลักษณะกลมเล็ก และมีแวคิวโอล (Vacuole, V) ขนาดใหญ่ มีแกรนูล (Granule, Gr) จำนวนมากกระจายอยู่ด้านหนึ่งของเซลล์ มีไรโบโซมอิสระกระจาย (Free Ribosome, R) อยู่ในไซโตพลาสซึม

PGC ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร AtRA เข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพที่ 4.6 D, E, F) พบว่า PGC ได้พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับโอโอไซต์ (Oocyte, Oo) คือ เป็นเซลล์ก่อนข้างกลมขนาดใหญ่ ภายในนิวเคลียส (Nucleus, N) มีโครมาตินอยู่เกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ และยังไม่สังเกตเห็นอแกแนคไคโนไซโตพลาสซึม (Cytoplasm, Cy) ไซโตพลาสซึมที่บีบ

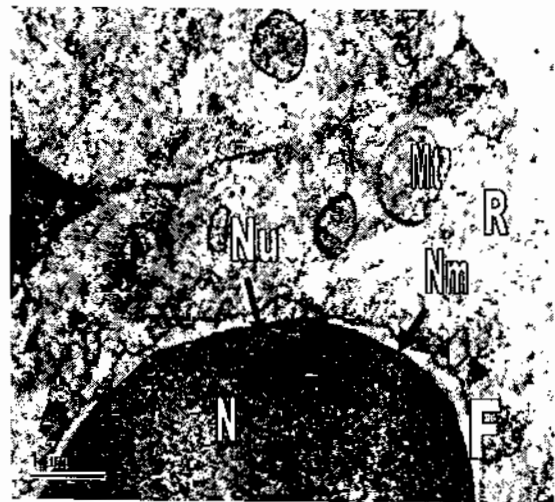
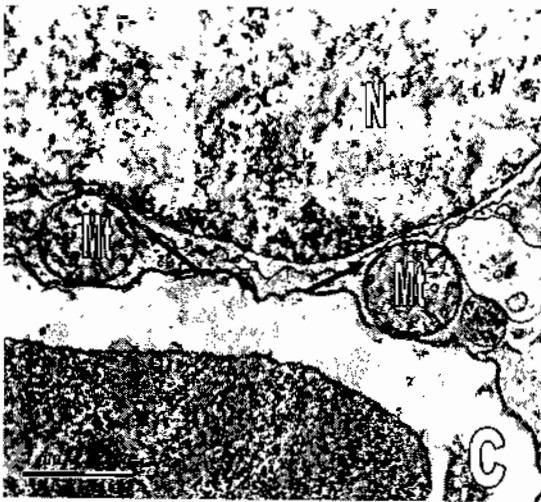
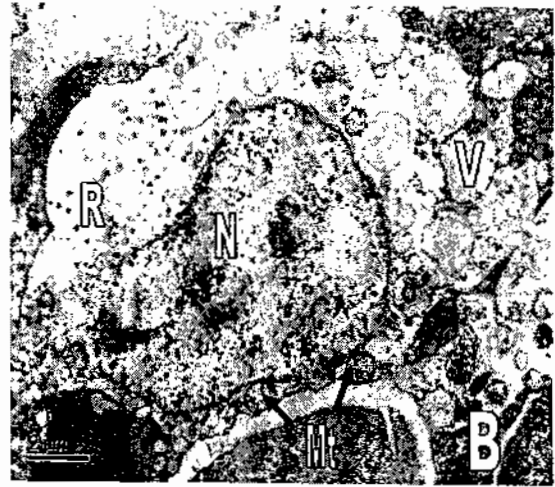
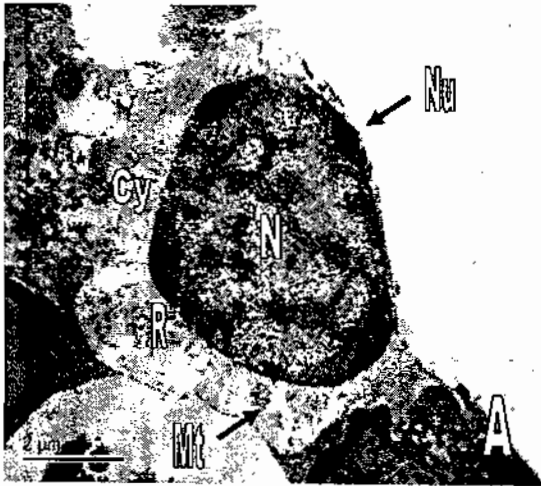


ภาพที่ 10 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- A เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 15% ASW PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมน้อย พบอออกแกนเล็กน้อย
- B เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO ใน 15% ASW PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึมเท่ากับนิวเคลียส พบอออกแกนเล็กน้อย
- C ภาพขยายไมโทคอนเดรียของ PGCs ที่พบในเอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO ใน 15% ASW
- D เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย AtRA 10 μ g/ml PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมค่อนข้างมาก พบไมโทคอนเดรียกระจายอยู่ทั่วไป
- E, F เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย AtRA 50 μ g/ml PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ค่อนข้างกลมรี นิวเคลียสขนาดใหญ่ ปริมาณไซโตพลาสซึมเกือบเท่านิวเคลียส พบแกรนูลอยู่ในไซโตพลาสซึม

อักษรย่อ:	Cy	=	Cytoplasm
	Gr	=	Granule
	Mt	=	Mitochondria
	N	=	Nucleus
	Nu	=	Nucleolus
	Nm	=	Nuclear membranc
	Oi	=	Oil globule
	R	=	Ribosome
	V	=	Vacuole



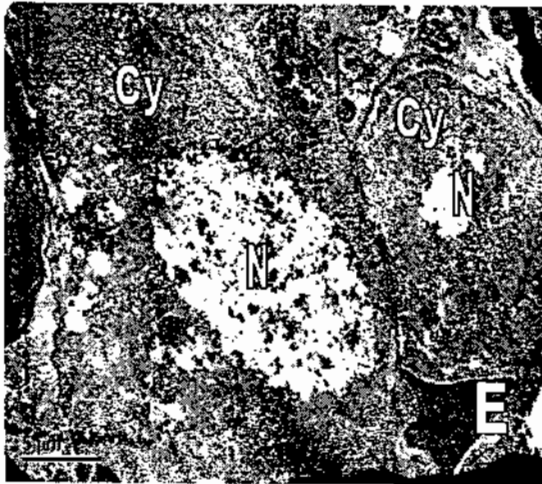
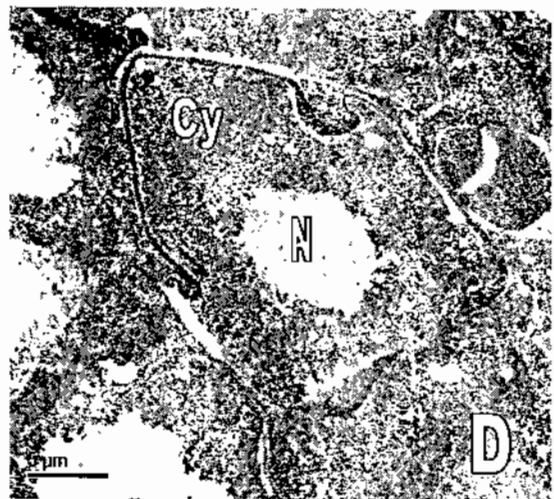
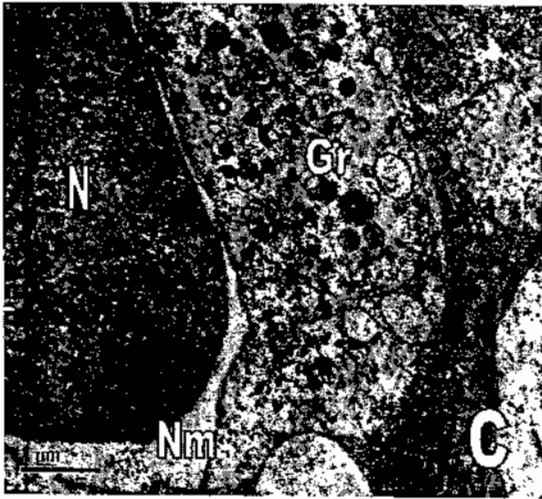
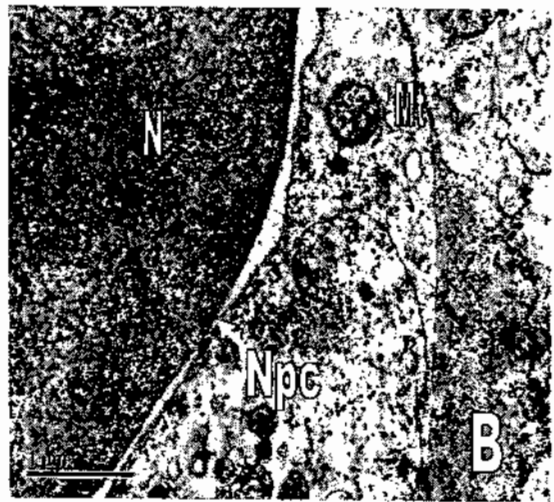
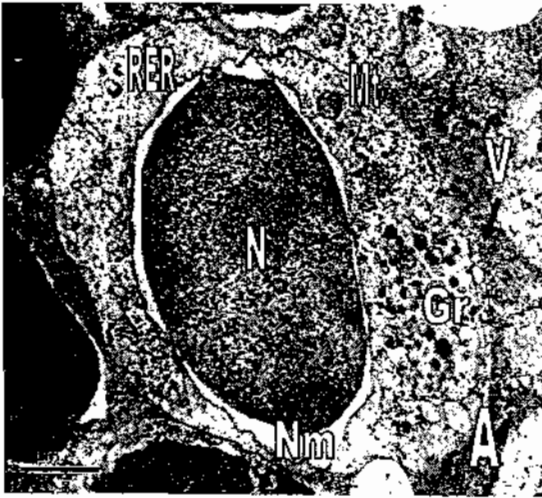


ภาพที่ 11 ลักษณะ โครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- A, B, C เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย AtRA 100 $\mu\text{g/ml}$ PGCs มีลักษณะเป็นเซลล์ก่อนข้างกลม นิวเคลียสขนาดใหญ่ พบอแกแนลในไซโตพลาสซึมมาก
- D, E, F เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย AtRA 150 $\mu\text{g/ml}$ PGCs ได้พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายโอโอไซต์ เป็นเซลล์ก่อนข้างกลมขนาดใหญ่ ยังไม่พบอแกแนลในไซโตพลาสซึม

อักษรย่อ:	Cy	=	Cytoplasm
	Gr	=	Granule
	Mt	=	Mitochondria
	N	=	Nucleus
	Nm	=	Nuclear membrane
	Npc	=	Nuclear pore complex
	Nu	=	Nucleolus
	Oi	=	Oil globule
	R	=	Ribosome
	RER	=	rough Endoplasmic Reticulum
	V	=	Vacuole





บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากผลการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ มีลักษณะเด่น ที่แตกต่างจาก somatic cell คือ มีนิวเคลียส ขนาดใหญ่ รูปร่างกลม เมื่อย้อมด้วยสี 1% Toluidine เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน พบทางด้านหน้าของหัวใจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ มีลักษณะนิวเคลียส มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก และเยื่อหุ้มชั้นใน มี Nuclear pore complex เชื่อมต่อระหว่างนิวเคลียสกับไซโตพลาสซึม พบ Heterochromatin กระจายทั่วนิวเคลียส มีนิวคลีโอลอย อยู่ชิดเยื่อหุ้มนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสมีทั้งบริเวณทึบและบริเวณสว่าง มีปริมาณของไซโตพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบสัดส่วนกับนิวเคลียส ภายในพบ ไมโทคอนเดรีย ขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมรี, เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ชนิดขรุขระ เป็นเส้นสั้นๆ กระจายทั่วไซโตพลาสซึม, พบกอลจิ แอพพาราตัส ซึ่งมีจำนวนชั้นเรียงกันไม่มาก, ไรโบโซม กระจายทั่วไซโตพลาสซึม และพบแกรนูล น้อย แทรกอยู่ระหว่างไมโทคอนเดรียทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์

5.1.1 การทดสอบ LC₅₀

เอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราคมที่ได้รับสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 10, 50, 100 และ 150 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์ตายของเอ็มบริโอได้เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของสาร ATRA ที่ใช้ทดสอบ ดังนั้น LC₅₀ > 150 µg/ml

5.1.2 การเลี้ยงเอ็มบริโอในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอกิ้งก่ามกราคมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นของสาร ATRA เข้มข้น 50 µg/ml ทำให้เอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราคมมีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ และความเข้มข้นของสาร ATRA 150 µg/ml ทำให้เอ็มบริโอตายมากที่สุด



5.1.3 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

แบบไข่นาง

สาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้โครงสร้าง PGCs มีลักษณะแตกต่างกันไม่มากนัก คือ มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน แต่พบว่าสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้ PGCs ของเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในถุง Gonad และเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามที่ได้รับสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ ได้พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย โอโอไซต์

5.1.4 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

แบบล่องผ่าน

สาร ATRA ส่งเสริมการเจริญพัฒนาของ PGCs ให้มีการเจริญพัฒนาที่เร็วขึ้น โดยพบว่าในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA มีการเจริญพัฒนาอแกแนตต่างๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์เร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามในกลุ่มที่ได้รับสาร ATRA เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีการพัฒนาของเยื่อหุ้มนิวเคลียส, nuclear pore complex, ไรโบโซม, ไมโทคอนเดรีย, อื่น โคพลาสติกเรติคูลัมและมีเวสิคูลโอลขนาดใหญ่ซึ่งภายในมีแกรนูลจำนวนมาก



5.2 อภิปรายผลการวิจัย

โครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เป็นเซลล์มีขนาดใหญ่ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะรูปร่างกลม มีปริมาตรของไซโทพลาสซึมน้อยเมื่อเทียบกับนิวเคลียส มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ นิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างกลม ผลจากการย้อมสี Toluidine blue เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน พบนิวคลีโอลัส 2-5 อัน สอดคล้องกับรายงานของ Damrongphol & Jaroensastrarak (2000) ซึ่งพบว่าในกึ่งกำกรมามีเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ มีการอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีนิวเคลียสกลม ขนาดใหญ่ มองเห็น นิวคลีโอล และรายงานของ Klag & Swiatek (1999) ที่ศึกษา เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในแมลง *Allacma fusca* พบว่า PGCs จะกระจายในไข่แดง เรียงกันเป็นคู่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์และกระจายอยู่ในระหว่างแกรนูลซึ่ง เนื่องจากไม่พบไข่แดง อยู่ภายในเซลล์ เมื่อพิจารณาลักษณะเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ใน กึ่งกำกรม และแมลง *Allacma fusca* มีลักษณะแตกต่างกัน คือไม่พบไข่แดงภายในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ของกึ่งกำกรม ลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ในกึ่งกำกรมพบว่า ลักษณะของนิวเคลียส มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก และเยื่อหุ้มชั้นใน มี Nuclear pore complex เชื่อมต่อระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาสซึม พบHeterochromatin กระจายทั่วนิวเคลียสมินิวคลีโอลัสเกาะติดตามขอบนิวเคลียส ในไซโทพลาสซึมพบ ไมโคคอนเดรีย ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมรี ขนาดใหญ่ รวมอยู่กับแกรนูลอยู่ทางด้านหนึ่งของเซลล์, เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม, ไรโบโซมกระจายทั่วไซโทพลาสซึม, กอลจิคอมเพล็กซ์ และแกรนูล ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jiang, Clart & Renfree (1997) ที่ศึกษา เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ใน *Tamnia wallaby* พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ มีไมโคคอนเดรีย รูปร่างกลม ไรโบโซมกระจายทั่วไซโทพลาสซึมมีแกรนูลเล็กน้อย มีเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม แต่แตกต่างจากการรายงานของ Motta, Makabe & Nottola (1997) ที่ศึกษา เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ในคนพบว่า ในไซโทพลาสซึมของ เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ มี lipid droplets และ glycogen อาจจะเป็นเนื่องจาก เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ ในคนได้มีการสะสมไว้ใช้เป็นพลังงานภายในเซลล์

5.2.1 การทดสอบ LC50

เอ็มบริโอของกึ่งกำกรมที่ได้รับสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 10, 50 100 และ 150 $\mu\text{g/ml}$ มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การตายของเอ็มบริโอได้เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของสาร ATRA ที่ใช้ทดสอบ เป็นการชี้ให้เห็นว่าทุกระดับความเข้มข้นของสาร ATRA ที่ใช้ทดสอบ ไม่เป็นพิษต่อเอ็มบริโอของกึ่งกำกรม ดังนั้นจึงสามารถให้เลี้ยงเอ็มบริโอได้ทุกระดับความเข้มข้น



5.2.2 การเลี้ยงเอ็มบริโอในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดลองใช้สาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเลี้ยงเอ็มบริโอกึ่งก้ำมกราม อายุ 20 วัน เป็นเวลา 2 วัน พบว่า เอ็มบริโอที่ได้รับสาร ATRA เข้มข้น 10, 50, 150 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.6% DMSO มีอัตราการตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ มีอัตราการตายน้อยที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย 15% ASW และในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ มีอัตราการตายสูงที่สุด ในกลุ่มควบคุมเอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO มีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย 15% ASW และสูงกว่าเอ็มบริโอในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วย 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของสาร DMSO ทำให้เอ็มบริโอกึ่งก้ำมกรามมีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ในทำนองเดียวกันเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มีอัตราการตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย 15% ASW และกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโอมีอัตราส่วนของ DMSO ที่เป็นตัวทำละลายอยู่มากจึงทำให้มีอัตราการตายมาก คล้ายกับการรายงานของ BC Cancer Agency (2000) ที่พบว่า ทั้งสาร DMSO และ Retinoic acid มีผลในการลดการเจริญของเซลล์ โดยเฉพาะ DMSO ที่เป็นตัวการสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเซลล์

5.2.3 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

PGCs ของกึ่งก้ำมกรามมีลักษณะ โครงสร้างเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ ประกอบด้วยนิวเคลียสขนาดใหญ่ มีนิวคลีโอลัสเด่นชัด (Damrongphol P and Jareonsalrarak P, 2000) จะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่เฉพาะอย่างอยู่ภายใต้เชื้อหุ้มหัวใจ (Barnabe, 1994) ซึ่งจะกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในไข่แดง โดยเรียงกันเป็นคู่ติดต่อกันและกระจายอยู่ทั่วไป (Klag J and Swiatek P, 1999) ถ้าแบ่งลำตัวของพวกครัสเตเชียออกเป็น 6 ปล้อง สามารถพบ PGCs ได้ที่ฐานของรยางค์ในปล้องที่ 3 ใกล้กับผนังลำไส้ ซึ่งอยู่ด้านหลังของระบบย่อยอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า PGCs ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงใน 15% ASW และ 0.6% DMSO อยู่ทางด้านหน้าหัวใจ ด้านหลังของระบบย่อยอาหาร มีลักษณะ โครงสร้างเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสล้อมติดสีของ epoxy tissue stain เข้ม เห็นนิวคลีโอลัสได้ชัดเจน

ในกลุ่มทดลอง PGCs ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบอยู่ที่ฐานของรยางค์ในปล้องที่ 3 ใกล้กับ hepatopancreas มีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมขนาดใหญ่ นิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีล้อมของ Tulucidine bme เข้ม โดย PGCs ของเอ็มบริโอกึ่งก้ำมกรามที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ได้เคลื่อนที่เข้าไปเจริญในถุง Gonad และ PGCs ของ



เอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ ได้มีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับโอโอไซต์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สาร ATRA มีผลต่อการเจริญพัฒนาของ PGCs ของเอ็มบริโอกึ่งก้ำกราม โดยในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในสาร ATRA จะมีการเจริญพัฒนาของ PGCs เร็วกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน 15% ASW และ 0.6% DMSO ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pakdeenarong (2005) ที่ได้ศึกษาถึงผลของสาร ATRA ต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ของกึ่งก้ำกรามในระยะเอ็มบริโอ โดยนำเอ็มบริโออายุ 2 ชั่วโมง ไปเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่มีความเข้มข้นของสาร ATRA ในระดับต่างๆ คือ 1, 10 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 2 วัน พบว่า เอ็มบริโอในกลุ่ม 50 $\mu\text{g/ml}$ มีจำนวน PGCs อย่างมีนัยสำคัญจาก 15.5 ± 0.8 เซลล์ ต่อเอ็มบริโอในชุดควบคุมเป็น 29.5 ± 0.9 เซลล์ ต่อเอ็มบริโอในกลุ่ม 50 $\mu\text{g/ml}$

RARs เป็น receptors ที่พบใน gonocyte ของอ้นทะเล (Boulogne *et al.*, 1999) และจะมีการขนส่ง RA ไปยัง Target cells โดยมีโปรตีนในการขนส่งคือ CRABPS (cellular retinoic acid binding protein) (Beckett *et al.*, 1999; Dolle *et al.*, 1990; Mendelsohn *et al.*, 1992) นอกจากนี้ CRABPS ยังกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกึ่ง เช่น รังไข่ อ้นทะเล และก้านตา (Pakdeenarong N., 2005 cited from Gu *et al.*, 2002) ดังนั้นเอ็มบริโอของกึ่งก้ำกรามในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในสาร ATRA จึงมีการเจริญพัฒนาที่เร็วกว่าเอ็มบริโอในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน 15% ASW และ 0.6% DMSO โดยเอ็มบริโอของกึ่งก้ำกรามที่เลี้ยงในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มในการเจริญพัฒนาของ PGCs เร็วขึ้น

5.2.4 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน

PGCs เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย

ไมโทคอนเดรียลักษณะกลม และมีไรโบโซมอยู่มากจึงทำให้เห็นไซโตพลาสซึมทึบ (Jiang *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า PGCs มีลักษณะโครงสร้างเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ก่อนข้างกลม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ มีไรโบโซมอิสระกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึมทำให้เห็นไซโทพลาสซึมทึบ โครงสร้างของ PGCs ของเอ็มบริโอกึ่งก้ำกรามอายุ 20 วัน ในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย 15% ASW พบออกแกแนลไม่มากนัก ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงใน 0.6% DMSO มีแวกิวโอลเกิดขึ้น ในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงในสาร ATRA เข้มข้น 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ พบแวกิวโอลเกิดคล้ายกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย 0.6% DMSO ในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย สาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ พบแวกิวโอล ซึ่งภายในมีสารบรรจุอยู่เล็กน้อยในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีแวกิวโอลขนาดใหญ่ 1 อัน ภายในแวกิวโอลมีออกแกแนลอยู่จำนวนมากและมี



หลายลักษณะ นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้าย oil globule เกิดขึ้นในเซลล์ PGCs ของเอ็มบริโอกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสาร A₁RA เข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kodama *et al.* (2004) ศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ของ Japanese mantis shrimp, *Oratosquilla oratoria* และได้พบ oil globule ในระยะ oil globule stage ซึ่งเป็นระยะหนึ่งของการพัฒนาโอโอไซต์ และ Moot *et al.* (1997) ได้ศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ พบว่า มี lipid droplets กระจายอยู่ในไซโทพลาสซึมของ PGCs แสดงว่าเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังกับไม่มีกระดูกสันหลัง มีความคล้ายกัน นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นว่า เอ็มบริโอที่เลี้ยงด้วยสาร A₁RA เข้มข้น 100 µg/ml มี nuclear pore complex ชัดเจนซึ่งเชื่อมต่อกันระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาสซึม และในไซโทพลาสซึมเห็นเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบขรุขระ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอื่นๆ ที่ไม่ปรากฏให้เห็น กลุ่มที่เลี้ยงด้วยสาร A₁RA เข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/ml มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอกเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่า กลุ่มที่เลี้ยงใน A₁RA เข้มข้น 10 µg/ml มีเยื่อหุ้มชั้นนอกขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ และได้ยื่นออกไปเบียดออกแอกแนลที่อยู่ในไซโทพลาสซึม ส่วน PGCs ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร A₁RA เข้มข้น 50 µg/ml ได้เคลื่อนที่เข้าไปเจริญในถุง Gonad มีปริมาณไซโทพลาสซึมเกือบเท่ากับนิวเคลียส มีการพัฒนาออกแอกแนลให้เห็นได้มากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงในสาร A₁RA 10 µg/ml คือ พบแกรนูล อยู่ในไซโทพลาสซึม PGCs ของเอ็มบริโอที่เลี้ยงในสาร A₁RA เข้มข้น 150 µg/ml ได้มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายโอโอไซต์ แสดงให้เห็นว่า สาร A₁RA ส่งเสริมการเจริญพัฒนาของ PGCs ให้มีการเจริญพัฒนาที่เร็วขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pakdeenarong (2005) จะเห็นได้จากในกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยสาร A₁RA มีการเจริญพัฒนาออกแอกแนลต่างๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์เร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามในกลุ่มที่ได้รับสาร A₁RA เข้มข้น 150 µg/ml มีการเจริญพัฒนาของ PGCs ไปเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินอยู่เกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ และยังไม่สังเกตเห็นออกแอกแนลใดเกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kodama (2004) ที่อธิบายไว้ว่า โอโอไซต์ที่อยู่ในระยะ Oogonium stage มีขนาด $10 \pm 2.4 \mu\text{m}$ มี basophilic chromatin กระจายอยู่ในนิวเคลียส เกือบไม่เห็นไซโทพลาสซึม

5.2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายและการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกราม

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายและการเจริญพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอของกิ้งก่ามกรามอายุ 20 วัน ที่เลี้ยงในสาร A₁RA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของสาร A₁RA ที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโอเพิ่มขึ้นเอ็มบริโอมีอัตราการตายมาก



ขึ้นและเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ได้มีการเจริญพัฒนาที่เร็วขึ้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{m}/\text{ml}$ เอ็มบริโอมีอัตราการตายสูงสุด แต่เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ได้มีการเจริญพัฒนาเร็วที่สุด โดยได้เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับ โอโอไซต์ และพบว่ามี follicle cell เกิดขึ้น เอ็มบริโอในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 50 $\mu\text{m}/\text{ml}$ มีอัตราการตายน้อยที่สุด แต่พบออกแแกนเนลในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์น้อย โดยพบ ไมโทคอนเดรีย, แกรนูล และ ไรโบโซม เช่นเดียวกันกับเอ็มบริโอในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย 15% ASW, 0.6% DMSO และสาร ATRA เข้มข้น 10 $\mu\text{m}/\text{ml}$ มีอัตราการตายน้อย แต่พบออกแแกนเนลในไซโตพลาสซึมของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์น้อย ที่ระดับความเข้มข้นของสาร ATRA เข้มข้น 100 $\mu\text{m}/\text{ml}$ เอ็มบริโอมีอัตราการตายมากเป็นอันดับ 2 รองจากกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสาร ATRA เข้มข้น 150 $\mu\text{m}/\text{ml}$ แต่พบออกแแกนเนลในไซโตพลาสซึมมาก คือ พบ ไมโทคอนเดรีย, ไรโบโซม, เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม, Nuclear pore complex เชื่อมระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม และนอกจากนี้ยังพบแกรนูลจำนวนมากที่บรรจุอยู่ในเวคิลโอลขนาดใหญ่



ตารางที่ 2 ตารางสรุปออแกเนลล์ที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของเอ็มบริโอ กุ้งก้ามกรามอายุ 20 วัน ที่เลี้ยงในสาร ATRA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ออแกเนลล์ต่างๆ ใน	ความเข้มข้นของสารที่ใช้เลี้ยง					
	15% ASW	0.6% DMSO	AtRA10 $\mu\text{M/ml}$	AtRA50 $\mu\text{M/ml}$	AtRA100 $\mu\text{M/ml}$	AtRA150 $\mu\text{M/ml}$
Nucleus						
-Nucleolus	+	-	-	+	+	-
-Dense nucleolus	++	-	-	++	++	-
-Loose nucleolus	+	++	++	+	+	-
-Heterochromatin	++	++	++	++	++	++
-Nuclear pore complex	-	-	-	-	++	-
Cytoplasm						
-Mitocondria	+	+	++	++	++	-
-RER	-	-	-	-	+	-
-Ribosome	++	++	++	++	++	-
-Granule	-	-	+	+	++	-
-vacuole	-	++	+	-	+	-

หมายเหตุ เครื่องหมาย - แสดงว่า ไม่พบ

+ แสดงว่า พบ

++ แสดงว่า พบมาก



ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาถึงกิจกรรมที่มีอายุมากขึ้น เพื่อให้ทราบลักษณะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ที่ชัดเจนมากกว่านี้
2. ควรศึกษาถึงกิจกรรมที่มาจากหลายๆ แม่พันธุ์เพื่อให้ทราบว่าพันธุกรรมมีผลต่อลักษณะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่
3. ควรศึกษาถึงกิจกรรมที่มาจากหลายๆ แม่พันธุ์เพื่อให้ทราบว่าพันธุกรรมมีผลต่อลักษณะและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่
4. ควรเก็บตัวอย่างในช่วงอายุที่ห่างกันมากขึ้น เพื่อให้ความแตกต่างของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- บรรจง เทียนสังข์ศรี. *หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม*. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2535
- บพิช จารุพันธ์ และ นันทพร จารุพันธ์. *สัตววิทยา : ปฏิบัติการ*. พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพฯ ,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2540
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และ เฉลิมชัย สุวรรณรักษ์. *ลักษณะแตกต่างของเพศ สัดส่วนเพศ และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงแบบพัฒนา*. สถาบันวิจัยและพัฒนา
พันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ; 2540
- ประจวบ หล้าอุบล. *กุ้ง*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ;
2528
- ยนต์ มุสิก. *การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม*. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2529
- เรณู บาชิโร. *การประเมินการเปลี่ยนแปลงภายนอกและภายในระหว่างการพัฒนารังไข่ในกุ้งกุลาดำ*.
รายงานสัมมนาประจำปี 2533 สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน, น. 259-271.
- วนิดา ไครพาณิชย์กุล, วีรชัย สิงหนิยม, นกมล อินทรทัต, สุมล จึงอุดมเจริญ. *การศึกษา
กระบวนการ spermatogenesis และ spermatogenic cell ชนิดต่างๆของกุ้งกุลาดำเพศผู้ตัว
เต็มวัย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน*.
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ;
2540
- ศิริเพ็ญ เวชชากรัณย์, อรัญญา ตันติปัญญาพร, วิรัช ธรรมวินิจฉัย. *คู่มือหลักสูตรเร่งรัดจุลทรรศน์
อิเล็กทรอนิกส์สำหรับงานวิทยาศาสตร์ชีวภาพ*. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ; 2535
- ศุภลักษณ์ โรมรัตน์พันธ์. *เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์*. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2545
- อนุตรา อัครจามร. *การศึกษาทางเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ*. วิทยานิพนธ์ชื่อวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2534: 168 น.
- เชาว์ ชิโนรักษ์ และ พรรณี ชิโนรักษ์. *ชีววิทยา 1*. กรุงเทพฯ: คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2535.
- แดงด้อย มาลี. *การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม*. กรุงเทพฯ: บริษัท ต้นอ้อ แกรมมี จำกัด, 2540.
- ปราณี ผ่องแก้ว. *โภชนาการชุมชน: ที่มีการเปลี่ยนแปลงภาวะเศรษฐกิจอย่างรวดเร็ว*. กรุงเทพฯ:
ลิฟซิ่งทรานส์มีเดีย, 2539.



- ศิริพันธ์ จุลกรังคะ. *โภชนศาสตร์เบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541.
- Adiyodi KG and Adiyodi GR. Reproductive Biology of Invertebrate Volume I spermatogenesis and sperm function. New York : Awileg-Interseience Publication 1983; 409.
- Apisawetakan S, Linthong V, Wanichanon C *et al.* structure of the differentiating female germ cells in *Haliothis asinine L.* *Invertebrate Reproduction and Development* 2001; (39:1), 67-79.
- Azim MS. Stem cells How to make eggs and sperm. Nature Publishing Group (Online) 2004; 427: Avialable form: www.nature.com/nature. [Acessed 2004 Jan 8]
- Chang IK, Tajima A, Chikamune T, Ohno T. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stoma cells from the germinal ridge. *Cell Biology Internation* 1995; 19(2): 143-9.
- Damrongphol P and Jaroensastraraks P. Morphology and Regional Distribution of the Primordial germ cells in the Giant Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Science Asia* 2001; (27): 15-19.
- Gilbert F.S. Developmental biology. 5th ed. United states of America : Sinauer Associates Inc. ; 1997
- Jiang FX, Clark J, Renfree MB. Ultrastructure characteristics of primordial germ cells and their amoboid movement to the gonadal ridges in the tanmar wallaby. *Anatomy Embryology* 1997; 195: 473-481.
- Klag J and Swiatek P. Differentiation of Primordial gem cells during embryogenesis of *Allacma fusca* (L.) (Collembola: Symphypleone). *Internationnal Journal of Insect Morphology and Embryology* 1999; 28: 161-168.
- Ln JP, Zhang XH, Yu XY. Structural change of oviduct of freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponense* (Decapoda, Palaemonidae), during spawning. *Journal of Zhejiang University SCIENCEB* 2006; 7(1): 64-69.
- Lec CK, Weaks RL, Johnson GA; Bazer FW, Piedrahita JA. Effects of protease Inhibitors and Antioxidants on In vitro Survival of Porcine Primordial gem cells. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 887-897.
- MaackG and Segnert H. Morphological development of the gonads in Zebrafish. *Journal of Fish biology* 2003; 62: 895-906.



- Motta P.M., Makabe S, Nottola S.A. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction* 1997; 3(3): 281-295.
- Ogiso-Ono Y and Kenishi K. Cause of the decreased number of PGC in Albino xenopns : Analysis of the number and position of pPGC in albino embryos during and after cleavage. *Development Growth Difference* 1999; 41: 745-750.
- Sobhol P, Apisawetakan S, Linthong V, *et al.* Ultrastructure of the differentiating male germ cells in *Haliotis asinina* L. *Invertebrate Reproduction and Development* 2001; (39:1): 55-66.
- Suwannarong K. Effect of 3', 5' cAMP on Embryonic Development of the Giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. M.Sc. (Environmental biology) Fac. of Grad. Studies, Mahidol Univ. ISBN 974-04-4033-9 ; 2003 : 91 p.
- Backett, Barbara R, Petkovich and Martin. Evolutionary conservation in retinoic acid signaling and metabolism. [online]. *American Zoologist* 1999. Available from: www.findarticles.com [Accessed 2006 June 3]
- Barnable G. *Aquaculture biology and ecology of cultured species*. England: Eallis Horwood Limited 1994; 179-90.
- BC Cancer Agency. *Dimethyl Sulfoxide (DMSO)*. Canada: Provincial Health Services Authority 2000.
- Boulogne B, Levacher C, Durzand P and Habert R. retinoic acid receptors and retinoid x receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: Immunolocalization an implication in the control of the number of gonocytes. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 1548-57.
- Bowter T, Spirov AV and Reinitz J. Hox-Pro: A specialized database for clusters and network of homeobox gene. [online]. *Nucleic Acids Research* 2000. Available from: [www.icphb.ru-hox pro. Htm](http://www.icphb.ru-hox-pro.htm) [Accessed 2006 June 3]
- Chung C and Cooney JA. The varied roles of nuclear receptors during vertebrate embryonic development. *Published online* 2003; 1:7.
- Dakshinamurti K, editor. *Vitamin receptors*. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.
- Damrongphol P and Pleanphit T. Morphology and regional distribution of the primordial germ cells in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. [Abstract]. *Science Asia* 2001; 27: 15-9.



- Chuwu L. Effect of vitamin A excess on early embryonic development of Rana. [Abstract].
Journal of Zhanjiang Ocean University ; 1997.
- Cupp SA, Dufour MJ, Kim G, Skinner MK and Kim KH. Action of retinoic on embryonic and early postnatal testis development. [Abstract]. *Endocrinology* 1999; 140: 2343-52.
- Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morriss GK and Chambon G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. *Development* 1990; 110: 1133-51.
- Eitenmiller RR and Landen OW. *Vitamin analysis for the health and food science*.
New York: Toni Kathryn White 1994; 3-8.
- Gilbert FS. *Developmental biology*. 5thed. United States of America: Sinauer Associates Inc; 1997.
- Hui L and Kim HK. Retinoic acid inhibits rat XY gonad development by blocking mesonephric cell migration and decreasing the number of gonocytes. [Abstract].
Biology of Reproduction 2004; 70: 687-93.
- Hung JF, Hsuuw YD, Lon CK, *et al*. Adverse effects of retinoic acid on embryonic development and the selective expression of retinoic acid receptors in mouse blastocysts. *Human reproduction* 2006; 21(1): 202-9.
- Jiang XF, Clare J and Renfrec BM. Ultrastructural characteristics of primordial germ cells and their amoeboid movement to the gonadal ridges in the tamcr wallaby. *Anat Embryol* 1997; 195:473-481.
- K.G. and Adiyodi GR. *Reproductive biology of invertebrate: spermatogenesis and sperm function*. New York: Awiley-interscience Publication 1983; 409.
- Klag J. and Swiatek P. Differentiation of primordial germ cells during embryogenesis of *Allacma fusma* (L.) (Collembata: Symphyleona). *International journal of insect Morphology and embryology* 1999; 28: 161-8.
- Kodama K, Shimizu T, Yamakava T and Aoki I. Reproductive biology of the female Japanese mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* (Stomatopoda) in relation to changes in the seasonal pattern of larval occurrence in Tokyo Bay, Japan. *Fisheries Science* 2004; 70: 734-745.
- Komada M, Lean DJ, Griswold MD, *et al*. E-MAP-115, encoding a microtubule associated protein, is a retinoic-acid inducible gene required for spermatogenesis. [Abstract]. *Gene & development* 2000; 14: 1332-42.



- Kretcher and Norman. *Developmental Nutrition*. United states of America: Allyn & Bacon a viacon company 1997, 141.
- Kaplan L. In vitro and invivo differentiation of male germ cells in the mouse. [abstract]. *Society for reproduction and fertility* 2004; 128: 147-52.
- Levacher V, Pairaulte C, Racine C, *et al.* Dvelopmental of the foetal and neonatal testis. [abstract]. *Andrologia* 2003; 35(35): 79-83.
- Livera G, Fabre VA and Habert R. Retinoid receptors involved in the effects of retinoic acid on rat testis development. [Abstract]. *Biology of reproduction* 2001; 64: 1307-14.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, *et al.* Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). *Development* 1994; 120: 2749-71.
- Molyneaux BK and Wylie C. Primordial germ cell migration. *Developmental Biology* 2004; 48: 537-44.
- Morita Y and Tilly LJ. Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. [abstract]. *Endocrinology* 1999, 6(140): 2696-703.
- Pakdenarong N. *Effects of all-trans retinoic acid and estradiol-17 β on germ cell development in embryos and larvae of the giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii de Man*. [Thesis biology]. Bangkok: Fac. of Grad. Studies, Mahidol Univ: 2005.
- Pelt VA and Rooij DD. The origin of synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A deficient rats after vitamin A replacement. [abstract]. *Biology of reproduction* 1990; 42: 667-82.
- Raz E. Primordial germ cell development in zebra fish. *Science direct* 2002; 6(13): 489-95.
- _____. The function and regulation of vasa-like genes in germ cell development. *Genome Biol* 2000; 1(3): reviews 1017.1-6.
- Sharpe TP and Mason I, editors. *Molecular embryology methods and protocols*. London: Human Press, Inc 1999; 33.
- Thompson NJ, Howell JM and Pitt GA. Vitamin A and reproduction in rats. [Abstract]. *Biological Sciences* 1964; 176(159): 510-35.
- Yao JJ, Zhao YL, Wang Q, *et al.* Biological compositions and digestive enzyme activities during the embryonic developmental of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. [Abstract].



Aquaculture 2005; 4(104): 599-605.

Zhengwei F, Kato H, Sugahara K and Kubo T. Retinoic acid accelerates the development of reproductive organs and egg production in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*).

[Abstract]. *Biology of reproduction* 2000; 63: 1795-800.



ภาคผนวก



Poster presentation

Ultrastructure of primordial germ cells in hatching larvae of the giant freshwater prawn

Noppakun Pakdeenarong^{1*}, Kanyarat Sappaso¹, Panompom Ruksapukdee¹, Nual-anong Narkkong²

¹Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham Province 44150, Thailand

²Central instrumentation Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham Province 44150, Thailand

The primordial germ cells (PGCs) are the progenitors of gametes. They are large comparing to surrounding somatic cells. Morphology of PGCs in the hatching larvae is studied under light microscope and transmission electron microscope (TEM) in this study. The PGCs are found at the anterior of the heart in the hatching larvae. They are translucent and the nucleus contains prominent condensed nucleoli. They have not shown distinguish cytoplasmic proportion but shows numerous condensed chromatins in the nucleus. The morphology of the PGCs is studied under TEM. They are the large round cells. The cell contains a round nucleus with finely dispersed chromatin and 3-4 conspicuous nucleoli. The nucleoli are distinguished seen with light and dark stained zones. The nuclear membrane is sharply defined without a prominent peripheral rim of heterochromatin. The cytoplasm is composed of few organelles such as small mitochondria, lysosomes, abundant ribosomes beneath the nuclear pore, Golgi bodies, Golgi vesicles, Golgi membrane and a variable numbers of glycogen particles.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Mahasarakham University Research and Development Unit, Mahasarakham University for the support of this project.

References

1. Damrongphol P, Jaroensastraraks P. Morphology and regional distribution of the primordial germ cells in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *ScienceAsia*. 2001, 27: 15-19.
2. Pakdeenarong N, Damrongphol P. Effects of estradiol-17 β on embryos and larvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 2006, 79: 563-572.
3. Pakdeenarong N, Damrongphol P. Effects of All-trans retinoic acid on germ cell development of embryos and larvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biologia* 2006, 61: 621-625.



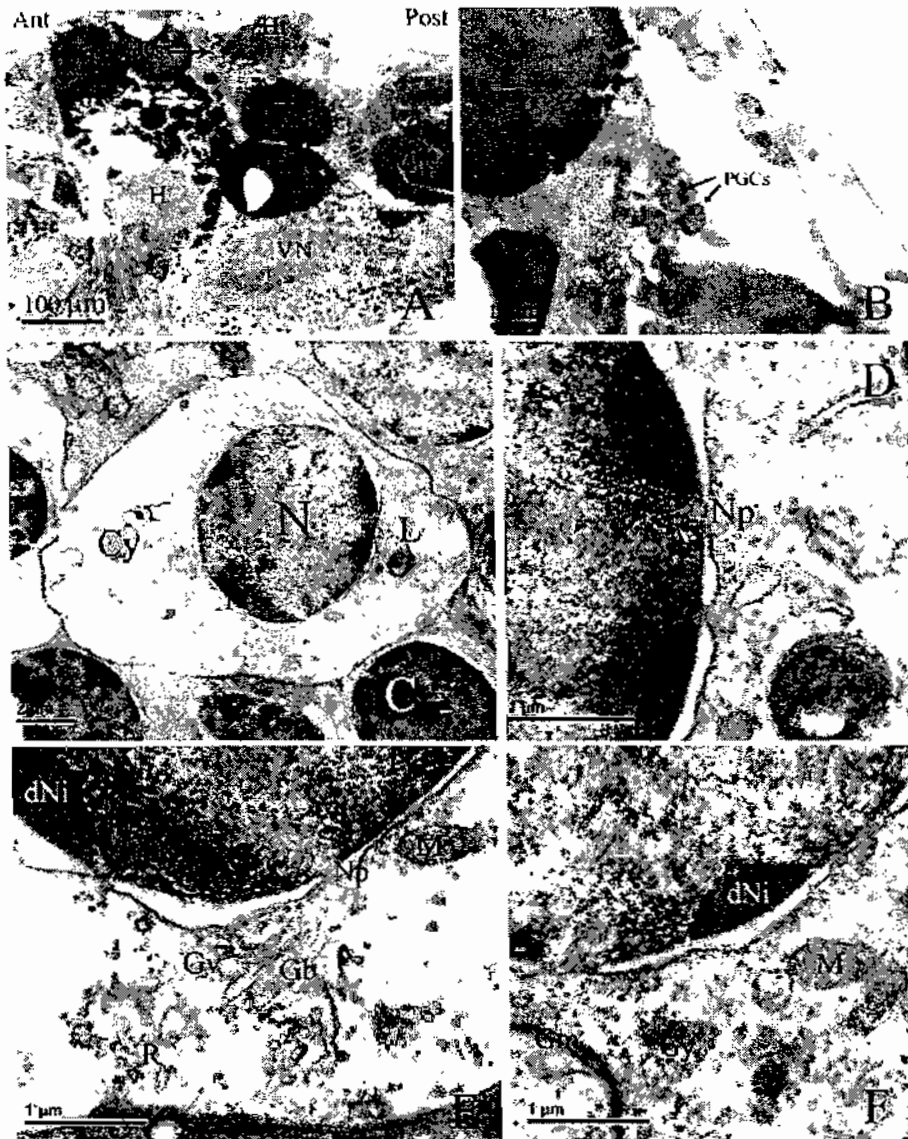


Fig.1 Light photomicrographs and TEM micrographs of primordial germ cells (PGCs) in hatching giant freshwater prawn larvae. A, group of PGCs located at the anterior of the heart (Ht); B, Structure of PGCs under LM; C, PGCs under TEM; D, Nuclear pore (Np); E, The light (lNi) and dark stained zones (dNi) of the nucleoli and organelles in the cytoplasm such as mitochondria (M), abundant ribosomes (R), Golgi vesicles (Gv) and Golgi bodies (Gb); F, dispersing glycogens (Gy).

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ – สกุล (ภาษาไทย) นางสาว นพคุณ ภักดีณรงค์
(ภาษาอังกฤษ) Miss. NOPPAKUN PAKDEENARONG
2. หมายเลขบัตรประชาชน 3 3099 00487 70 4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 5
4. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ด. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150
โทร 0-43-754321
Email: noppakun241@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	ระดับการศึกษา	วุฒิ	สาขา	สถาบันการศึกษา
2534	ปริญญาตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	ม.ขอนแก่น
2539	ปริญญาโท	วท.ม.	ชีววิทยา	ม. เชียงใหม่
2548	ปริญญาเอก	ปร.ด.	ชีววิทยา	ม. มหิดล

5. ประสบการณ์การทำงาน

เป็นอาจารย์ทำการสอนมาแล้ว 8 ปี

พ.ศ. 2534 - 2536 นักวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2540 - ปัจจุบันอาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

มหาสารคาม

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

ไม่มี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน



1. **Pakdeenarong, N.,** A. Rojanapaibul, P. Vanittanakom, S. Naboonmee and B. Kantalue. 1996. Scanning electron microscopic study of the external structure of *Diplodiscus* sp. J. of electron microscopy society of Thailand. Volume 10.
2. **Pakdeenarong, N.,** A. Rojanapaibul. 1996. The determination of glycogen, lipid and protein on body of *Diplodiscus* sp. from the intestine of *Rana tigerina pantherina*. *In situ*. 21th Congress on Science and technology of Thailand.
3. Rojanapaibul, A., **N. Pakdeenarong,** P. Vanittanakom, S. Naboonmee and B. Kantalue. 1996. Observation of the external structure of *Diplodiscus* sp. by scanning electron microscope. 21th Congress on Science and technology of Thailand.
4. **Pakdeenarong, N.,** A. Rojanapaibul. 1996. The determination of glycogen, lipid and protein on body of *Diplodiscus* sp. from the intestine of *Rana tigerina pantherina*. *In situ*. 21th Congress on Science and technology of Thailand.
5. **Pakdeenarong, N.,** P. Damrongphol. 2003. Effect of all-trans retinoic acid on germ cells of the giant freshwater prawn embryos. 29th Congress on Science and technology of Thailand. 20-22th October 2003, Khon Kean University, Thailand. P. 44-45.
6. **Pakdeenarong, N.,** P. Damrongphol. 2004. Effect of estradiol-17 β on germ cells development of the giant freshwater prawn embryos, *Macrobrachium rosenbergii*. 1st AgBiotech Graduate Conference I 18-19th March 2004, Bangkok, Thailand. p. 94.
7. **Pakdeenarong, N.,** P. Damrongphol. 2005. Effect of estradiol-17 β on germ cells development of the giant freshwater prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. 2nd AgBiotech Graduate Conference II 15-16th May 2004, Bangkok, Thailand.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

ไม่มี



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวพนมพร รักษาภักดิ์
วัน เดือน ปีเกิด	17 พฤษภาคม 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดมหาสารคาม
ที่อยู่ปัจจุบัน	30 หมู่ที่ 4 ตำบลเขวา อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านหันเชิงเหียน จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนผดุงนารี จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2549	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนการศึกษา	
พ.ศ. 2547-ปัจจุบัน	ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถทาง วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สกวค.)



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวกัลยารัตน์ สัพโส
วัน เดือน ปีเกิด	23 มกราคม 2527
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	87/1 หมู่ 1 ตำบลไฮหย่อง อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร 47160
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านไฮหย่องภูเงินประชานุกูล จังหวัดสกลนคร
พ.ศ. 2542	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพังโคนวิทยาคม จังหวัดสกลนคร
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพังโคนวิทยาคม จังหวัดสกลนคร
พ.ศ. 2549	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนการศึกษา	ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถทาง วิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สทวค.)



สรุปรายงานการใช้จ่ายเงิน

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1.หมวดวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	
1.1 พ่อแม่กึ่ง และการสร้างโรงเรียน	12,395.33
1.2 อุปกรณ์เตรียมตัวอย่าง	4,251.70
1.3 สารเคมี	27,625.86
2.หมวดค่าใช้สอย	
2.1 เสนอผลงานวิจัย 1 ครั้ง	3,094
2.2 ค่าจัดทำรายงานความก้าวหน้า 4 ครั้ง	3,709
2.3 ค่าจัดทำรูปเล่มฉบับสมบูรณ์	5,000
3. หมวดค่าตอบแทน	5,000
รวม	61,075.89

