รายงาน
ผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมในโคที่มีท่อปัสสาวะผิดปกติแต่กำเนิด
CHROMOSOMAL STUDY ON A BULL WITH CONGENITALLY ABNORMAL URETHRA

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ สพ.ญ. ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน
ผู้ช่วยศาสตรจารย์ น.สพ. ดร.วีระพงศ์ โกยกุล
รองศาสตราจารย์ น.สพ. วิวัฒน์ ชวนะนิกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเงินทุนคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2543

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงาน
ผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมในโคที่มีท่อปัสสาวะผิดปกติแต่กำเนิด
CHROMOSOMAL STUDY ON A BULL WITH CONGENITALLY ABNORMAL URETHRA

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ สพ.ญ. ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน
ผู้ช่วยศาสตรจารย์ น.สพ. ดร.วีระพงศ์ โกยกุล
รองศาสตราจารย์ น.สพ. วิวัฒน์ ชวนะนิกุล

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก
ฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ
เลขที่รับ 920
วันที่ 29 ตุลาคม 2545

โครงการเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเงินทุนคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2543

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาโครโมโซมในโคที่มีท่อปัสสาวะผิดปกติแต่กำเนิด" นี้ คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนด้านเงินทุนจาก "โครงการเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเงินทุนคณะ" คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2543 จำนวนเงิน 10,000.00 บาท (หนึ่งหมื่นบาทถ้วน) ซึ่งคณะผู้วิจัย ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

การวิจัยด้านพันธุศาสตร์ของสัตว์เศรษฐกิจยังมีการทำไม่มากนักในประเทศไทย ทั้งๆ ที่พันธุกรรมของสัตว์เป็นปัจจัยอันสำคัญของการผลิตสัตว์ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นพื้นฐานสำหรับการค้นคว้าวิจัยในสาขานี้ต่อไปในอนาคต

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ สพ.ญ. ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน
ผู้ช่วยศาสตรจารย์ น.สพ. ดร.วีระพงศ์ โกยกุล
รองศาสตราจารย์ น.สพ. วิวัฒน์ ชวนะนิกุล

มิถุนายน 2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาโครโมโซมในโคที่มีท่อปัสสาวะผิดปกติแต่กำเนิด

ดวงสมร สุวัฑฒน* วีระพงศ์ โกยกุล และวิวัฒน์ ชวนะนิกุล***

***ภาควิชาสัตวบาล และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ **คณะสัตวแพทยศาสตร์**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ (Abstract)

โคเพศผู้พันธุ์ผสมบราห์มันอายุ 6 ปี มีความผิดปกติของท่อปัสสาวะแต่กำเนิด ทำให้ปัสสาวะไหลออกทางด้านล่างของท่อปัสสาวะ จากการตรวจพบว่าความผิดปกติของท่อปัสสาวะเป็นชนิด hypospadia และลึงค์มีขนาดเล็ก และสั้นกว่าปกติ (penile hypoplasia) การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยวิธีธรรมดา และการย้อมสีพิเศษ (GTG - และ RBA - banding) พบว่าคาริโอไทป์เป็นแบบ 60; XY เช่นโคเพศผู้ปกติทั่วไป ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน, เอสตราไดออล และโปรเจสเทอโรนอยู่ในระดับปกติ จากลักษณะทั้งหมดโคตัวนี้ควรถูกจัดในจำพวกภาวะกะเทยเทียมเพศผู้ (male pseudohermaphroditism) การหาสาเหตุที่แท้จริงของความผิดปกตินี้ควรทำการศึกษาต่อเนื่องในเรื่องจุลกายวิภาคศาสตร์ของต่อมเพศ และการพิสูจน์การมีอยู่ของจีนส์ที่มีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างท่อปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เพศผู้โดยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

คำสำคัญ: ท่อปัสสาวะ, ไฮโปสปาเดีย, ภาวะกะเทยเทียมเพศผู้, คาริโอไทป์, โคเพศผู้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ (Introduction)

ความผิดปกติแต่กำเนิดของท่อปัสสาวะพบได้ในสัตว์หลายชนิดและในมนุษย์ ท่อปัสสาวะที่เจริญผิดปกติเกิดได้ในทั้งสองเพศ และอาจเป็นส่วนหนึ่งของวิการที่เกี่ยวข้องกับภาวะกะเทย (hermaphroditism) ในมนุษย์มีรายงานความผิดปกติของท่อปัสสาวะมากกว่า 150 ราย โดยพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง (Wagner และคณะ, 1996) ความผิดปกติของท่อปัสสาวะที่พบร่วมกับวิการอื่นๆ ของระบบสืบพันธุ์ มีรายงานในเด็กแรกคลอดมักประกอบด้วยลักษณะเด่นคือ การมีท่อปัสสาวะ 2 อัน (urethral duplication) (Ciftci และคณะ, 1995; Goh และคณะ, 1995; Walther และ Woodard, 1996; Elmassalme และคณะ, 1997)

ในสัตว์ความผิดปกติของท่อปัสสาวะมักเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์เสมอ ภาวะกะเทยคือ มีลักษณะภายนอกของอวัยวะเพศ (external genitalia) และ/หรือต่อมเพศ (gonad) เป็นของทั้งสองเพศ และทำให้ท่อปัสสาวะมีความผิดปกติไปด้วย ลักษณะดังกล่าวพบได้ในสัตว์เลี้ยงทุกชนิดและพบมากในแพะ (Basrur และ Yusoff, 1997; Otiang'a-Owiti และคณะ, 1997) และสุกร (Pailhoux และคณะ, 1994) การมีรอยแยกของท่อปัสสาวะทางด้านล่าง (ventral aspect) ที่เรียกว่า hypospadia เป็นลักษณะสำคัญในสัตว์ที่มีภาวะกะเทย (Basrur , 1999)

มีรายงานว่าพันธุกรรมมีอิทธิพลอันสำคัญต่อการเจริญของท่อปัสสาวะและอวัยวะของระบบสืบพันธุ์ ความผิดปกติที่ระดับจีนส์และโครโมโซมต่างมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะเหล่านี้ ในแพะพบว่าจีนส์ที่ควบคุมการไม่มีเขา (polled trait) มีส่วนเกี่ยวข้องกับภาวะกะเทย (Basrur และ Yusoff, 1997) ส่วนในสุกรความผิดพลาดในกระบวนการอันซับซ้อนของการทำงานของจีนส์ SRY และจีนส์อื่นๆ (autosomal genes) ต่างมีผลให้เกิดภาวะกะเทย (Pailhoux และคณะ, 1994; Hunter, 1996) โคที่มีลักษณะของ hypospadia พบได้ไม่บ่อยนักเท่ากับแพะและสุกร ในรายงานเหล่านี้มักพบภาวะความผิดปกติของท่อปัสสาวะร่วมกับไส้เลื่อนที่สะดือ (umbilical hernia) (Singh และคณะ, 1988) และร่วมกับภาวะลีบเล็กของลึงค์ (penile hypoplasia) (Rieck, 1972) Sysa และคณะ, 1997 พบว่าวัวที่มี hypospadia มีความผิดปกติของการเจริญของอัณฑะ ลึงค์ และเป็นหมัน จากการตรวจวิเคราะห์คาริโอไทป์พบว่าปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานความผิดปกติแต่กำเนิดของท่อปัสสาวะชนิด urethral duplication ในโคเพศเมีย และการศึกษาลักษณะของโครโมโซมพบว่ามี balanced translocation ที่ส่วนปลายของโครโมโซมร่างกาย (autosomes) ขนาดเล็ก 2 คู่ แต่ไม่พบลักษณะผิดปกติของโครโมโซมเพศ (Braun และคณะ, 2000)

ในประเทศไทยความผิดปกติแต่กำเนิดในสัตว์ชนิดต่างๆ พบได้น้อยมาก และมักไม่พบในสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว เนื่องจากสัตว์เหล่านั้นมักตายตั้งแต่แรกคลอด หรือถูกกำจัดไปก่อนที่จะได้มีผู้ศึกษาความผิดปกติ และการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม งานวิจัยนี้ได้รายงานลักษณะความผิดปกติของท่อปัสสาวะในโคเพศผู้ และผลการศึกษาโครโมโซมรวมถึงระดับฮอร์โมนเพศในกระแสเลือด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาระดับอณูพันธุศาสตร์ของสัตว์ที่พบความผิดปกติในลักษณะเดียวกันนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

1. <u>โคและการเก็บตัวอย่างเลือด</u>

โคที่มีความผิดปกติของท่อปัสสาวะแต่กำเนิดเป็นโคเพศผู้พันธุ์ผสมบราห์มัน (*Bos indicus*) อายุ 6 ปี ผู้เลี้ยงเป็นเกษตรกรทำไร่ข้าวโพดอยู่ที่ ตำบลตะคร้ำเอน อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือด 3 ครั้ง จากเส้นเลือดดำที่คอ (external jugular vein) และเก็บเลือดในหลอดเก็บเลือดสุญญากาศ (Vacutainer, Becton Dickinson and company, U.S.A.) ชนิดเคลือบด้วยสารป้องกันเลือดแข็งตัว (heparin) สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม และชนิดที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวสำหรับการเก็บซีรั่มเพื่อการตรวจระดับฮอร์โมน การเก็บตัวอย่างเลือดกระทำโดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) และตัวอย่างเลือดถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ ระหว่างการขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ

2. <u>การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว</u> (lymphocyte culture)

นำตัวอย่างที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน มาปั่นที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ประมาณ 0.5 - 1 มิลลิลิตร และหยดลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย RPMI-1640 8 – 10 มิลลิลิตร; Fetal calf serum 1.5 มิลลิลิตร; L-Glutamine 100 ไมโครลิตร และสารกระตุ้นการแบ่งตัว (Pokeweed) 100 – 120 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดอยู่ไปอบในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ; 5.0% CO_2 และความชื้น 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ทุก 12 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (cellular harvesting) 45 นาที ทำการเติมสารละลาย colchicine 200 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ระยะเมตาเฟส หลังจากนั้นเติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ (0.075M KCl) เพื่อทำให้เซลล์พองตัว (swollen)

ทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย carnoid fixative ที่มีส่วนผสมของ methanol : glacial acetic acid = 3 : 1 โดยใช้สารละลาย fixative ดังกล่าวชำระล้างเซลล์หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งเศษเหลือ (debris) หมดไปจากหลอดทดลอง หยดสารละลาย fixative ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวลงบนสไลด์กระจก เก็บสไลด์ดังกล่าวในภาชนะปิดที่บรรจุสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิ –20 ^{0}ซ จนกว่าจะดำเนินการขั้นตอนต่อไป (ข้อ 3.1 และ 3.2)

เซลล์เพาะเลี้ยงส่วนหนึ่งเติมสารละลาย 5-bromo-2deoxy-Uridine (BrdU) ความเข้มข้น 0.5% 200 ไมโครลิตร ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการย้อมสีพิเศษด้วยวิธี RBA – banding (ข้อ 3.3)

3. <u>การจัดทำคาริโอไทป์โดยการย้อมโครโมโซมด้วยสีธรรมดา และการย้อมสีพิเศษ</u>

3.1 การย้อมสีธรรมดา (Giemsa conventional staining)

นำสไลด์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว จากขั้นตอนที่ 2 จุ่มลงในสารละลาย 5.0% Giemsa ที่ละลายอยู่ใน Sorensen buffer, pH 6.8 – 7.0 เป็นเวลา 12 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้สไลด์แห้งแล้วจึงนำไปตรวจหาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง นับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์อย่างน้อย 100 – 150 เซลล์ จดบันทึกจำนวนโครโมโซมที่แยกได้ พร้อมทั้งถ่ายรูปชุดโครโมโซมที่มีความยาวเหมาะสมและกระจายตัวดีจำนวน 30 เซลล์ เพื่อนำมาจัดทำคาริโอไทป์

3.2 การย้อมสีพิเศษชนิด Trypsin G – banding (GTG – banding)

วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Seabright (1971) คือจุ่มสไลด์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้จากข้อ 2 ลงในสารละลาย 0.025% trypsin – EDTA เป็นเวลา 3 นาที และจุ่มลงในสารละลาย 10% Fetal Calf Serum (FCS) 4 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นจุ่มสไลด์ลงใน 50% methanol 3 นาที และย้อมโครโมโซมด้วยสารละลาย 2.0 –2.5% Giemsa เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจหาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ถ่ายรูปชุดโครโมโซมที่มีความยาวเหมาะสมและกระจายตัวดี จำนวน 15 – 30 เซลล์ เพื่อนำมาจัดคู่โครโมโซมและจัดทำคาริโอไทป์

3.3 การย้อมสีพิเศษชนิด RBA – banding

วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Dutrillaux และคณะ (1973) คือ จุ่มสไลด์ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมได้จากข้อ 2 (BrdU treatment) ในสารละลาย 0.05% Acridine Orange เป็นเวลา 3 – 10 นาที (ขึ้นอยู่กับอายุของสไลด์) และล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำสะอาด นำสไลด์ที่ได้ไป

ตรวจหาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ถ่ายรูปชุดโครโมโซมที่มีความยาวเหมาะสมและกระจายตัวดี จำนวน 15 – 30 เซลล์ เพื่อนำมาจัดคู่โครโมโซมและจัดทำคาริโอไทป์

4. การวิเคราะห์ลักษณะโครโมโซม

ทำการวิเคราะห์ลักษณะของโครโมโซมในด้านรูปร่าง (morphology) และรูปแบบการติดสีเฉพาะ (banding patterns) เพื่อตรวจหาโครโมโซมที่มีความผิดปกติ โดยเปรียบเทียบกับของโคปกติ (*Bos indicus*) ที่เคยมีรายงานมาก่อน (Halnan และคณะ, 1981)

5. การตรวจวัดระดับฮอร์โมนเพศ

ปั่นแยกซีรั่มจากตัวอย่างและนำซีรั่มไปตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเพศ 3 ชนิด คือ estradiol, progesterone และ testosterone โดยวิธี chemiluminescent assay (CMA) ซึ่งมีหลักการในการใช้ antibodies ต่อฮอร์โมนดังกล่าวโดยที่ antibodies เหล่านี้ถูกติดด้วยสารเรืองแสง (fluorescent materials)

ผล (Results)

1. ลักษณะภายนอกของโคที่ทำการศึกษา

โคที่ทำการศึกษาเป็นโคเพศผู้พันธุ์ผสมบราห์มัน (*Bos indicus*) อายุ 6 ปี ลักษณะภายนอกเป็นโคเพศผู้ที่มีเขา โหนก และเหนียงคอชัดเจน (รูปที่ 1) การเจริญเติบโตของลูกอัณฑะและกล้ามเนื้อสมบูรณ์ กินอาหารและขับถ่ายปกติ ความผิดปกติอยู่ที่การถ่ายปัสสาวะที่น้ำปัสสาวะไม่ออกทางรูเปิดของปลอกหุ้มลึงค์ (preputial orifice) ดังเช่นโคปกติ ในโคตัวนี้มีรอยแยกบริเวณฝีเย็บ (perineum) (รูปที่ 2) และรอยแยกยาวต่อไปยังส่วนล่าง (ventral aspect) ของลึงค์และปลอกหุ้มลึงค์ (รูปที่ 3) ทำให้ปัสสาวะส่วนมากไหลออกทางรอยแยก และส่วนน้อยไหลออกจากท่อปัสสาวะ (urethra) ที่ปลายลึงค์ (glans penis) ที่สั้นกว่าปกติ (รูปที่ 4)

2.การตรวจวิเคราะห์คาริโอไทป์

คาริโอไทป์ของชุดโครโมโซมของโคที่ทำการศึกษาโดยการย้อมสีธรรมดา (Giemsa conventional staining) (รูปที่ 5) แสดงโครโมโซม 30 คู่ โครโมโซมคู่ที่ 1 – 29 เป็นโครโมโซมร่างกาย (autosomal chromosomes) ที่มีลักษณะเป็นแบบ acrocentric chromosomes คือ มีแขนของโครโมโซมข้างเดียว ส่วนโครโมโซมเพศ (sex chromosomes) มี

รูปที่1 ลักษณะภายนอกของโคที่ทำการศึกษา สังเกตการเจริญของเขา โหนก เหนียงคอ และกล้ามเนื้อของร่างกายที่สมบูรณ์

รูปที่2 ภาพมองจากด้านหลังแสดงถุงอัณฑะ และรอยแยกบริเวณฝีเย็บ (perineum) (ลูกศรชี้) สังเกตลูกอัณฑะขนาดปกติ

รูปที่3 ภาพถ่ายจากด้านข้างแสดงรอยแยกของปลอกหุ้มลึงค์ทางด้านล่าง (ventral aspect) (ลูกศรชี้)

รูปที่4 ภาพถ่ายจากด้านข้างและปลายของลึงค์ (glans penis) ที่หดสั้น (ลูกศรชี้) ปัสสาวะไหลออกบริเวณนี้

รูปที่5 คาริโอไทป์ของโคเพศผู้ที่ทำการศึกษาแสดงโครโมโซม 60; XY ย้อมด้วยวิธีธรรมดา (Giemsa conventional staining) X 600.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะที่บ่งถึงสัตว์เพศผู้อย่างชัดเจน คือ มีโครโมโซมเอ็กซ์ (X) และโครโมโซมวาย (Y) โครโมโซมเอ็กซ์มีลักษณะเป็น metacentric chromosome คือ มีแขนสองข้างและแขนด้านที่อยู่เหนือ centromere สั้นกว่าด้านตรงข้าม ส่วนโครโมโซมวายมีลักษณะเป็น acrocentric chromosome ที่มีขนาดเล็กมาก จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ที่ได้จากโครโมโซมย้อมสีธรรมดา ไม่พบความผิดปกติในรูปร่างลักษณะและจำนวน และมีความคล้ายคลึงกับคาริโอไทป์วัวพันธุ์บราห์มัน (*Bos indicus*) ปกติ

การย้อมสีพิเศษชนิด GTG – banding และ RBA – banding ของโครโมโซมที่จัดทำคาริโอไทป์ แสดงไว้ในรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ แถบสีเข้ม (มืด) และแถบสีจาง (สว่าง) บนโครโมโซมแต่ละตัวทำให้สามารถบ่งชี้ และจับคู่โครโมโซมได้อย่างถูกต้องตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ความเข้มและความสว่างของแถบสี (banding patterns) จะมีลักษณะตรงข้ามกันเมื่อย้อมโครโมโซมด้วยวิธี GTG – banding และ RBA – banding (รูปที่ 6 และ 7)

จากการตรวจวิเคราะห์ลักษณะการติดสีของโครโมโซมที่ได้จากการย้อมสีพิเศษทั้งสองแบบไม่พบลักษณะความผิดปกติใดๆ ที่อาจเกิดจากการขาดหายไป (deletion) หรือ การมีส่วนเกิน (duplication) ของส่วนย่อย (segment) ของโครโมโซมแต่ละตัว และลักษณะการติดสีมีความคล้ายคลึงกับคาริโอไทป์มาตรฐานของโค

3. <u>การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน</u>

ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน 3 ชนิด ด้วยวิธี Chemiluminescent assay (CMA) ให้ผลดังนี้

1. Estradiol	25.5	pg/ml
2. Progesterone	0.06	ng/ml
3. Testosterone	5.00	ng/ml

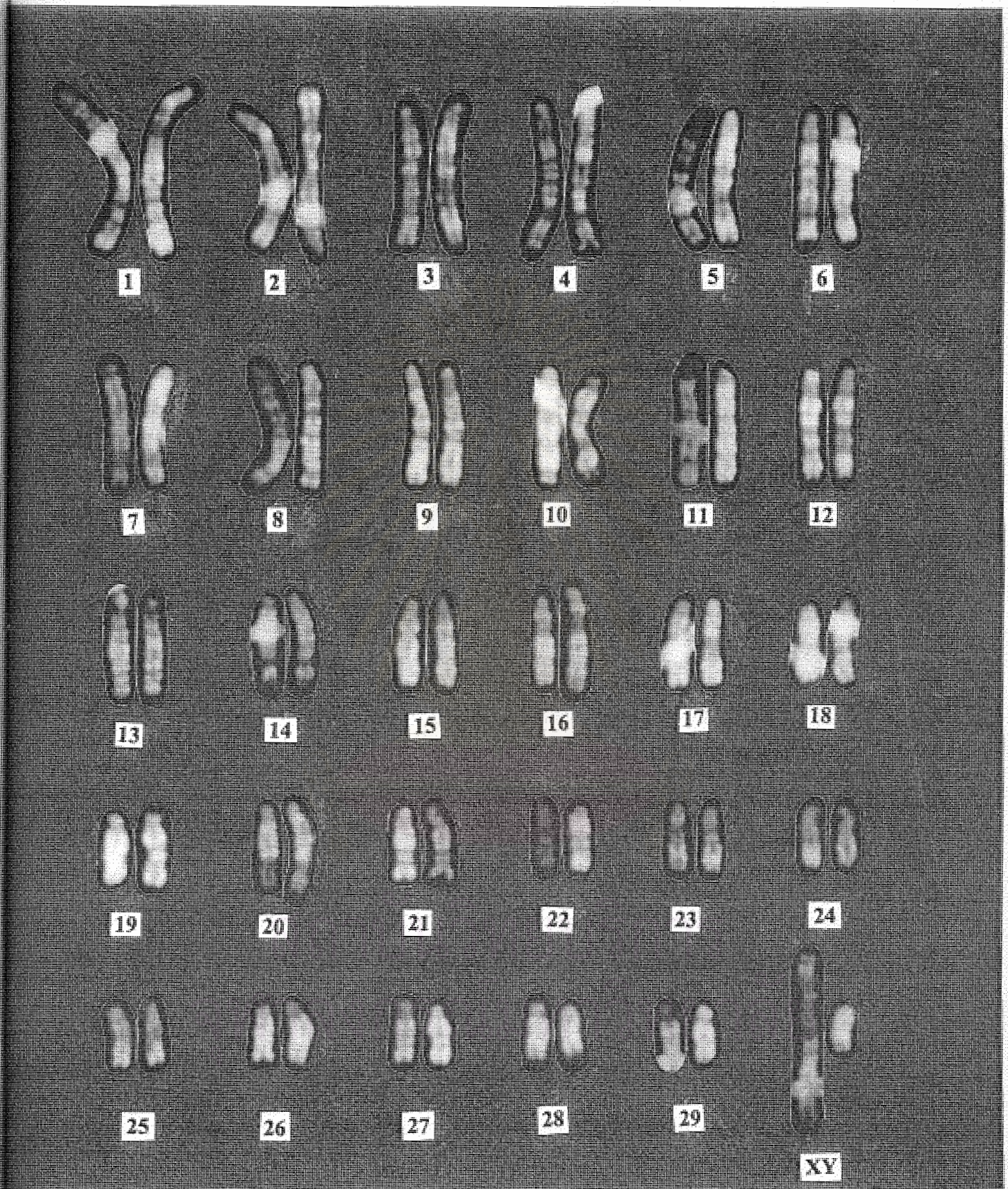
วิจารณ์ (Discussion)

ท่อปัสสาวะ (urethra) ในสัตว์เพศผู้เจริญมาจาก urogenital sinus ที่ในระยะตัวอ่อนเจริญแยกออกมาจาก cloaca ซึ่งเป็นช่องเปิดรวมของท่อระบบการย่อยอาหาร ระบบขับถ่ายปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ ระยะต่อมามีการเจริญยื่นยาวของ genital tubercle เป็นลึงค์ (penis) โดยมีการเชื่อมปิดของ urogenital (urethral) folds ทั้งสองข้างทำให้ urethral groove ที่อยู่ส่วนล่างของลึงค์กลายเป็นท่อปัสสาวะ (urethra) อย่างสมบูรณ์ (Noden และ de Lahunta,

Cattle karyotype

รูปที่6 คาริโอไทป์ 60; XY ย้อมสีพิเศษด้วยวิธี GTG-banding ให้สังเกตการติดสีเข้ม-สว่าง (banding patterns) ของโครโมโซมแต่ละคู่ และคู่โครโมโซมเพศที่มี โครโมโซมวายเป็นแบบ acrocentric ขนาดเล็ก X 600.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่7 คาริโอไทป์ 60; XY ย้อมสีพิเศษด้วยวิธี RBA-banding ให้สังเกตการติดสีเข้ม-สว่างของโครโมโซมซึ่งมีลักษณะ ตรงข้ามกับโครโมโซมที่ย้อมด้วยวิธี GTG-banding (รูปที่6) X 600.

1985) Hypospadia เกิดจากความล้มเหลวในการเชื่อมปิดของ urethral fold เกิดเป็นรอยแยกของท่อปัสสาวะด้านล่าง เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและผิวหนังทำให้น้ำปัสสาวะรั่วออกก่อนที่จะเดินทางไปถึงรูเปิดที่ปลายลึงค์ วิการชนิดนี้พบได้ในสัตว์ทุกชนิดรวมทั้งมนุษย์ และมักพบร่วมกับความผิดปกติของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะกะเทย (hermaphroditism) เนื่องจากการเจริญของท่อปัสสาวะในสัตว์เพศเมียไม่มีการเชื่อมปิดของ urethral fold ดังเช่นในเพศผู้ (Sweeney, 1998)

ลักษณะของ hypospadia และลึงค์เจริญไม่เต็มที่ (penile hypoplasia) ที่พบในโคที่ทำการศึกษามีลักษณะคล้ายกับที่เคยมีรายงานในโคตามที่ต่างๆ ทั่วโลก Sysa และคณะ (1997) พบโคเพศผู้ที่มี hypospadia โดยมีรอยแยกยาวตลอดตั้งแต่ถุงอัณฑะไปจนถึงปลอกหุ้มลึงค์ และพบว่าคาริโอไทป์ของวัวตัวนั้นปกติ สำหรับในรายงานอื่นๆ มักไม่มีการตรวจทางพันธุกรรม เช่นโคที่พบภาวะ hypospadia ร่วมกับภาวะนิ้วติด (syndactyly) (Rieck, 1972) และร่วมกับภาวะไส้เลื่อนที่สะดือ (Singh และคณะ, 1988) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในโคที่ทำการศึกษาแสดงถึงภาวะกะเทยแต่ความรุนแรงไม่มากนัก เนื่องจากลักษณะของร่ายกาย การเจริญของอัณฑะอยู่ในเกณฑ์ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ว่า ภาวะกะเทยมีได้หลายระดับ (Basrur, 1999) เป็นที่น่าสนใจว่าอัณฑะ (testis) ของโคตัวนี้มีกระบวนการสร้างอสุจิปกติหรือไม่ และในอัณฑะมีเนื้อเยื่อรังไข่ (ovarian tissue) ปนอยู่หรือไม่ อย่างไรก็ตามการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติคงเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากลึงค์มีขนาดเล็กกว่าปกติ และน้ำอสุจิจะรั่วออกทางรอยแยก (hypospadia) เช่นเดียวกับน้ำปัสสาวะ

การตรวจวิเคราะห์คาริโอไทป์ของวัวที่ศึกษาพบว่า เป็นคาริโอไทป์ของโคเพศผู้ โดยไม่มีลักษณะผิดปกติของจำนวน และลักษณะของโครโมโซมไม่ว่าเป็นโครโมโซมที่ย้อมด้วยวิธีธรรมดาหรือย้อมสีพิเศษทั้งสองชนิด (GTG และ RBA banding) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Sysa และคณะ (1997) และในสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่พบภาวะกะเทยแต่มีคาริโอไทป์ปกติของเพศเดียว (เพศผู้ หรือเพศเมียอย่างเดียว) เช่นในสุกร (Pailhoux และคณะ, 1994) และในแพะ (Basrur และ Yusoff, 1997) คณะผู้วิจัยเชื่อว่าความผิดปกติของท่อปัสสาวะในโคที่ศึกษาอาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ คือ

1. ความผิดปกติเกิดขึ้นที่ระดับจีนส์ที่ควบคุมการสร้างอวัยวะของระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ ซึ่งจีนส์ที่ควบคุมการเจริญของระบบดังกล่าวประกอบด้วยจีนส์ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ และโครโมโซมร่างกายที่ทำงานกันอย่างซับซ้อน (Werner และคณะ, 1996) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นแบบ point (single gene) mutation ไม่สามารถตรวจพบได้ในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม

2. ความผิดปกติที่ระดับโครโมโซมแต่ความเสียหายที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก เช่น มีการเพิ่มขึ้น (duplication) หรือขาดหายไป (deletion) ของส่วนย่อย (chromosome segment) ที่เล็กมากจนกระทั่งการย้อมสีพิเศษเพื่อดูการติดสีเข้ม – สว่าง (banding pattern) ยังไม่สามารถบ่งชี้ได้

สำหรับความผิดปกติทั้ง 2 แบบนี้ควรต้องใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อตรวจสอบ เช่น การตรวจวิเคราะห์ว่าโคที่ศึกษานี้มีจีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของระบบขับถ่ายปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ขาดหายไปหรือไม่ เช่นการตรวจหา SRY gene* ซึ่งเป็นจีนส์ที่สำคัญของการพัฒนาของอัณฑะและระบบสืบพันธุ์เพศผู้ (Sinclair และคณะ, 1990; Yang และคณะ, 1993) และการตรวจวิเคราะห์ว่าส่วนปลายของโครโมโซม (telomeres) ได้ขาดหายไปหรือไม่ โดยทำการทำ FISH (Fluorescent in situ hybridization) ที่ใช้ telomeric DNA probes

Hypospadia มักพบในความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์หลายแบบรวมถึง testicular feminization คือมีการเจริญของอัณฑะ และมีการหลั่ง testosterone ระหว่างการเจริญแต่อวัยวะสืบพันธุ์ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน (androgen insensitivity) เนื่องจากเกิด mutation ของ androgen receptor gene ทำให้อวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกมีลักษณะเป็นเพศเมีย ในสัตว์พวกนี้มักเป็นหมัน เนื่องจากอัณฑะมักอยู่บริเวณเชิงกราน แต่มีระดับ testosterone ค่อนข้างปกติ (Nora และคณะ, 1994). Testicular feminization จัดได้ว่าเป็นรูปแบบหนึ่งของ male pseudohermaphroditism ในโคที่ทำการศึกษาพบว่าระดับ testosterone อยู่ระดับปกติ เมื่อเทียบกับค่าปกติของฮอร์โมนชนิดนี้ในโค (O'Kelly, 1985; Lee และคณะ, 1990) ถ้าได้ทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะทั้ง 2 ข้างว่าเป็น testicular tissue ทั้งหมดไม่มี ovarian tissue เจือปน จะทำให้สามารถบ่งชี้ได้แน่นอนว่าโคชนิดนี้เป็น male pseudohermaphrodite

* จากความร่วมมือของห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาการเจริญพันธุ์ สถาบันสัตวศาสตร์ Swiss Institute Technology ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ เพื่อทำการตรวจหา SRY gene ในโคที่ทำการศึกษาโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าโคตัวนี้มี DNA sequence ของ SRY gene แต่ไม่ได้ทำการหาตำแหน่งของจีนส์นี้บนโครโมโซม

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเงินทุนคณะฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2543 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัย ขอขอบคุณ เจ้าของโคที่ทำการศึกษา คุณอุดม มณีดิษฐ์ เกษตรกรชาวกาญจนบุรี อาจารย์นายสัตวแพทย์ ธนศักดิ์ บุญเสริม ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างเลือด และคุณจุฑารัตน์ สุขไข่ ที่ช่วยในเรื่องงานปฏิบัติการในห้องทดลอง ขอขอบคุณ Professor Gerald Stranzinger แห่ง Swiss Institute of Technology ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และนักวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการนำตัวอย่าง DNA ของโคไปตรวจวิเคราะห์หา SRY gene sequence.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง (References)

Basrur P.K. 1999. Veterinary Medical Genetics. University of Guelph Press. 125-129.

Basrur P.K. and Yusoff R.B.H. 1997. Sex anomalies in goats. In: Current Therapy in Large Animal Thriogenology. R.S. Yongquist (ed.) Philadelphia : W.B. Saunders. 553 - 556.

Braun U., Gansohr B., Feige K., Gardelle O., Suwattana D. and Steanzinger G. 2000.Urethral duplication and chromosomal translocation in a Swiss braunvieh heifer. The Veterinary Record. 146: 44 - 46.

Ciftci A.O., Enocak M.E., Buyukpamukcu N., Hicsonmez A. 1995. Complete duplication of the bladder and urethra: a case report and review of the literature. Journal of Pediatric Surgery 30: 1605 - 1606.

Dutrillaux B., Laurent C., Counturier J., Lejeune J. 1973. Colouration des chromosomes humains par l'acridine orange apres traitement par le 5 bromodeoxyuridine. C.R.Acad. Sci. (Paris) 276: 3179 - 3181.

Elmassalme F.N., Zuberi M.S.H., Matburi R.M., Raheem U.A. 1997. Duplication of urethra – case report and review of the literature. European Journal of Pediatric Surgery 7: 313 - 314.

Goh D.W., Davey R.B., Dewan P.A. 1995. Bladder, urethra, and vaginal duplication. Journal of Pediatric Surgery 30: 125 - 126.

Halnan C.R.E., Watson J.I. and Mc Kee J.J. 1981. G-band patterns of the karyotype of *Bos indicus*. Veterinary Record 109: 34 - 37.

Hunter R.H.F. 1996. Aetiology of intersexuality in female (XX) pigs, with novel molecular interpretations. Molec. Reprod. Devel. 45: 392 - 402.

Kaftanovskaya H.M. and Serov O.L. 1994. High – resolution GTG – banding chromosomes of cattle, sheep and goat: a comparative study. J. Heredity, 85: 395 - 400.

Lee C.Y., Henricks D.M., Skellay G.C. and Grimes L.W. 1990. Growth and hormonal response of intact and castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol. J. Animal Sci. 68: 2682 - 2689.

Noden D.M. and de Lahunta A. 1985. The Embryology of Domestic Animals. Baltimore: Williams and Wilkins. 322 – 341.

Nora J.J., Fraser F.C., Bear J., Greenberg C.R., Patterson d. and Warburton D. 1994. Medical Genetics. 4th ed. Philadelphia: Lea Febiger. 211, 256 - 257.

O'Kelly J.C. 1985. Testosterone, feed intake and growth rate in male cattle. Nutrition Reports International. 32: 935 - 342.

Otiang'a-Owiti G.E., Oduor-Okelo D., Kamau G.K., Makori N., Hendrickx A.G. 1997. Morphological study of a six-legged goat with duplication of the intestinal, lower urinary and genital tracts. Anatomical Record 247: 432 - 438.

Pailhoux E., Popescu P.C., Parma P. et al. 1994. Genetic analysis of 38 XX males with genital ambiguities and true hermaphrodites in pigs. Animal Genetics. 25: 299 - 305.

Rieck G.W. 1972. Syndactyly in Red Pied cattle. Giessener Beitrage zur Erbpalthologie and Zuchthygiene. 4: 1 - 13.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2 (7731): 971 - 972.

Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S. et al. 1990. A gene from the human sex – determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA – birding motif. Nature: 346: 240 - 244.

Singh A.P., Al-Dahash S.Y.A. and Al-Badrny M.S. 1988. A clinical study on congenital anomalies in farm animals in Mosul (Irag). Iraqi J. Vet. Sci. 1: 116 - 134.

Sweeney L.J. 1988. Basic Concepts in Embryology. New York: McGraw – Hill Companies. 347 – 372.

Sysa P.S., Winiecki B. and Liwska J. 1997. Hypospadia in a male bovine. Zuchthygiene. 12: 77 - 81.

Wagner J.R., Carr M.C., Bauer S.B., Colodny A.H., Ratik A.B., Hendren W.H. 1996.Congenital posterior urethral perineal fistulae: a unique form of urethral duplication. Urology 48: 277 - 280.

Walther M.M. and Woodard J.R., 1996. Subpubic fistula: a urethral duplication. Journal of Urology 155: 1728 - 1729.

Werner M.H., Huth J.R., Gronenborn A.M. and Clore G.M. 1996. Molecular determinants of mammalian sex. Trends in Biol. Sci. August: 302 - 307.

Yang H. Fries R. and Stranzinger G. 1993. The sex - determining Region Y (SRY) gene is mapped to p12 –p 13 of the Y chromosome in pig (*Sus scrofa domestica*) by in situ hybridization. Anim. Genet. 24: 297 - 300.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chromosomal study on a bull with congenitally abnormal urethra.

Duangsmorn Suwattana*, Weerapong Koykul** and Vivat Chavananikul*

Department of Animal Husbandry and** Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

ABSTRACT

A six–years old bull (*Bos indicus*) was found to have hypospadia (congenital rupture of the ventral aspect of penile urethra) with normal–sized testes and slightly hypoplastic penis. Karyotype obtained from conventinal staining of chromosomes and GTG – and RBA – bandings revealed a normal chromosomal make-up of 60,XY male. Levels of serum testoterone, estradiol and progesterone were of normal ranges. Histology of testicular tissue and localization of gene (e.g. SRY) should be undertaken to determine the exact cause of hypospadia. Based on phynotypic abnormalities, it would appear that this bull is a male pseudohermaphrodite.

Key words: urethra, hypospadia, male pseudohermaphrodite, karyotype, bull

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย