อภิปรายและวิจารณ์ผล

การเก็บแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

การเก็บแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากกระแสเลือดจะต้องมีการฝึกฝนมากเพียงพอจนเกิดความ ชำนาญ เนื่องจากจะต้องเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดตัวอ่อนที่มีขนาดเล็กมากด้วยมือเปล่าโดยไม่ได้ใช้ เครื่องมือช่วยควบคุมการเคลื่อนที่ของเข็ม ดังนั้นการขยับหรือสั่นไหวของมือแม้เพียงเล็กน้อยก็จะเป็นปัญหาได้ อีกทั้งเส้นเลือดยังเปราะบางไม่มีเนื้อเยื่อโดยรอบที่จะช่วยยึดบังคับปลายเข็ม และหากเส้นเลือดฉีกขาดก็จะมี เลือดไหลอาบมาบนตัวอ่อนทำให้ยากต่อการมองเห็นเส้นเลือดหรือรายละเอียดอื่นๆ ผ่านกล้องจุลทรรศน์ การทำงานภายใต้กล้อง stereoscope ด้วย glass capillary pipette ที่ต่อเข้ากับสายยางและ mouth piece เพื่อดูดเก็บเลือด จึงต้องอาศัยความชำนาญในการควบคุมมือและปากให้ทำงานสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี ในการเก็บเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ระยะพัฒนาการที่เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างคือระยะที่ 13-15 HH เนื่องจากสามารถเก็บเลือดได้เกือบทั้งหมด และเป็นระยะที่มีเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในกระแสเลือดเป็น ปริมาณมากที่สุด เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากเคลื่อนที่เข้าสู่กระแส เลือดในระยะที่ 10-11 HH จนมีจำนวนสูงสุดในระยะ 14-15 HH จากนั้นจำนวนก็จะลดลงโดยเริ่มมีการ เคลื่อนย้ายเข้าสู่ genital ridges [30]

ปัญหาอุปสรรคต่อการเก็บเลือดที่พบมากในการศึกษานี้คือ คุณภาพของไข่และตัวอ่อนที่ใช้ในการ ศึกษา พัฒนาการระยะแรกโดยเฉพาะโครงสร้างเส้นเลือดของตัวอ่อนมีความผันแปรสูง มีตัวอ่อนจำนวนมากที่ มีโครงสร้างเส้นเลือดเป็นเกาะแก่งแม้อยู่ในระยะพัฒนาการที่เหมาะสม และอีกปัญหาใหญ่ของตัวอ่อนที่ใช้ใน การศึกษานี้คือ ความผันแปรของคุณภาพไข่ หากไข่ขาวเหลวมากจะทำให้โอกาสที่ไข่จะแตกในระหว่างที่ เจาะเก็บเลือดค่อนข้างสูง เมื่อไข่แตกจะทำให้ระยะโฟกัสในกล้องเปลี่ยนไปเนื่องจากไข่ยุบตัวลง การปรับโฟกัส กล้องใหม่ค่อนข้างเป็นอุปสรรคเนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องถือเข็มอยู่ในมือข้างหนึ่ง นอกจากนี้ ตัวอ่อนอาจฉีก ขาดเสียหายจนไม่สามารถเก็บเลือดได้เลย

งานวิจัยเกี่ยวกับเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดสัตว์ปีกจำนวนมากใช้การศึกษาเซลล์จาก genetal ridges [15, 31, 32] ที่มีวิธีการเก็บเซลล์ได้ง่ายกว่าและได้จำนวนเซลล์มากกว่า อย่างไรก็ตามแม้ว่าเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดใน genital ridges จะมีลักษณะทั่วไปเหมือนกับที่อยู่ในกระแสเลือดคือเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสกลมขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมมาก และปรากฏเครื่อง หมายหลักระบุชนิดเซลล์คือ SSEA-1, vasa protein และการย้อมติดสี PAS เช่นเดียวกัน [33, 34] แต่ก็มีลักษณะในรายละเอียดย่อยที่แตกต่างกัน เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ฟ้าในระยะที่อยู่ใน genital ridges มีลักษณะแบน มีไมโตคอนเดรียมาก และมี microvilli ที่เจริญมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่อยู่ใน กระแสเลือด [35] จึงอาจมีคุณสมบัติทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน อีกทั้ง

เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากสองแหล่งนี้ ปรากฏในระยะพัฒนาของตัวอ่อนที่ต่างกัน โดยเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเริ่มเคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือดในช่วง พัฒนาการของตัวอ่อนระยะที่ 11 HH **จากนั้นจึงมีการเคลื่อนย้ายจากกระแสเลือดเข้าไปอยู่ใน** genetal ridges **ในระยะพัฒนาการที่** 15 HH [30] **ซึ่งก็มีรายงานว่าการแสดงออกของ** c-kit **บนเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดใน** genetal ridges **มีปริมาณมากขึ้นตามระยะพัฒนาการของตัวอ่อนที่เพิ่มขึ้น** [36] **ประกอบกับมี ข้อมูลจากนักวิจัย** (unpublished data) **ว่าการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากกระแสเลือดให้ผลผลิต ที่เป็น** germline chimera **มากกว่าการถ่ายฝากเซลล์จาก** genital ridges **การพัฒนาเทคโนโลยีไคเมอร่า ภายใต้โครงการนี้จึงเลือกที่จะใช้เซลล์จากกระแสเลือดต่อไป**

สำหรับการแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกให้บริสุทธิ์นั้นได้มีรายงานวิจัยที่ใช้วิธีการนอกเหนือจากการใช้ density separation เช่น การใช้ immunomagnatic purification [37, 38] การใช้แอมโมเนียม คลอไรด์โปแตสเซียมบัฟเฟอร์ในการสลายเซลล์เม็ดเลือด [39] แต่จากการแลกเปลี่ยนข้อมูลกับผู้เชี่ยวชาญ จากประเทศญี่ปุ่นทราบว่าวิธีการเหล่านั้นให้ผลกระทบต่อเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดมากกว่าการใช้ Nycodenz และทำให้อัตราการรอดของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงและความสำเร็จในการสร้างลูกผสมไคเมอร่าลดลง ซึ่ง density separation โดยใช้ Nycodenz เป็นวิธีการที่ผู้เชี่ยวชาญจากหลายๆ ประเทศยังเลือกใช้กันอยู่ (ข้อมูลจากการประชุมที่ Okinawa, ประเทศญี่ปุ่น)

<u>การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา</u>

Rho-kinase (ROCK) inhibitor เป็นปัจจัยที่เชื่อว่าช่วยให้เซลล์ในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนมีโอกาสรอดชีวิตและเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น ดังเช่นรายงานการศึกษาจำนวนมากแสดงถึงประโยชน์ของ ROCK inhibitor โดยเฉพาะต่อการเลี้ยง Human Embryonic Stem Cell (hESC) [40, 41] แต่เนื่องจาก ROCK inhibitor มีราคาสูงมาก ผู้วิจัยจึงทดลองเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงโดยเพาะเลี้ยงใน KAv-1 ที่ไม่มี ROCK inhibitor ผลการทดลองพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย fibrobalst และเซลล์เหล่านี้สามารถสนับสนุน การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดได้เช่นกัน หลังจากปรึกษาแลกเปลี่ยนข้อมูลกับนักวิจัยชาวญี่ปุ่นจึงได้ ข้อสรุปว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อตัวอ่อนอาจไม่จำเป็นต้องใช้ ROCK inhibitor หรือใช้เพียงรอบแรกของ การเลี้ยงเซลล์ที่เก็บมาจากตัวอ่อน และสามารถละได้ในส่วนการเพาะเลี้ยงใน passage ถัดไป ดังนั้นโครงการ นี้จึงสรุปการใช้ ROCK inhibitor เฉพาะในขั้นตอนที่อาจก่อความเสียหายต่อเซลล์ เช่น 1) การตัดย่อยเนื้อเยื่อ ตัวอ่อนให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงใน passage แรก 2) การแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่เจริญ เกาะกันเป็นโคโลนีให้ได้เซลล์เดี่ยวเพื่อ subpassage [42-44] และ 3) การเลี้ยงเซลล์ที่ thaw จากการเก็บ แช่แข็ง [45-47]

<u>การศึกษา proteome และ secretome ของเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา</u>

ผลการศึกษา proteome และ secretome เบื้องต้นแม้จะพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ พี่เลี้ยงจากนกกระทา ไก่ฟ้าพญาลอ และไก่ฟ้าหลังขาว แต่โปรตีนที่พบมีปริมาณการแสดงออกต่างกันนั้น เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมเป็นหลัก โดยไม่พบโปรตีนที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับการสนับสนุนการเพาะ เลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด เช่น bFGF, LIF, TGF-beta หรือ SCF [48-53] แต่อย่างใด โปรตีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ทำงานในลักษณะเป็น autocrine, paracrine พบมีการผลิตและคัดหลั่งจากเซลล์ใน ปริมาณน้อย ขณะที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรั่มโปรตีนปริมาณสูง จึงอาจเป็นปัญหาต่อการค้นหาโปรตีนที่มี ปริมาณสัมพันธ์ต่อโปรตีนรวมน้อยมากเหล่านี้

<u>การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด</u>

ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ปีกด้วยการเก็บแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดใน ไนโตรเจนเหลวนั้น ควรจะต้องมีวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ได้ผลดีกับสัตว์ปีกหลากหลายชนิด ซึ่งการศึกษาใน โครงการนี้ก็พบว่า การอาหารเลี้ยงเซลล์ KAv-1 ที่มี 5% FCS และ 5% Chicken serum ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากตัวอ่อนนกกระทาสามารถส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสัตว์ปีกในตระกูล Gallus และ Lophura ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังพบว่าระบบการเลี้ยงที่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงยังมีปัจจัยผันแปร ที่ไม่ทราบแน่ชัดทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพหรือประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้แน่นอน ปัจจัย ผันแปรนี้อาจมาจากคุณภาพของตัวอ่อนที่ส่งผลต่อเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด คุณภาพของเซลล์พี่เลี้ยง และ คุณภาพของซีรัม โดยเฉพาะซีรัมไก่ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ตลอดช่วงการทดลองเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเป็น ระยะเวลา 2 ปี พบว่าซีรัมไก่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละรอบที่ซื้อและแตกต่างกันระหว่างบริษัทอย่าง ชัดเจนจากลักษณะที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า แม้ว่าจะสั่งซื้อจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายซีรั่มที่มีการยอมรับโดย ทั่วไปแล้วก็ตาม ซึ่งประเด็นคุณภาพของซีรั่มไก่นี้ผู้เชี่ยวชาญฝ่ายญี่ปุ่นได้เคยยกปัญหาขึ้นมาเช่นกัน แต่เนื่อง จากการเตรียมซีรัมไก่จำนวนมากเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีการวางแผนล่วงหน้า โดยเฉพาะไก่ที่จะใช้ เก็บซีรั่มจะต้องปลอดจากไวรัสและไมโคพลาสมา เนื่องจากไม่สามารถกำจัดด้วยการกรองตามมาตรฐานทั่วไป

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะที่อยู่ต่าง Order และ Family อาจต้องการปัจจัยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์และการอยู่รอด ของเซลล์แตกต่างไป ซึ่งจำเป็นต้อง ทดสอบความเหมาะสมของ KAv-1 และเซลล์พี่เลี้ยงจากตัวอ่อนนกกระทา ก่อนที่จะสรุปวิธีการเพาะเลี้ยงที่ เหมาะสมสำหรับเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากสัตว์ปีกชนิดนั้นๆ ได้

ในการศึกษานี้พบข้อมูลที่สำคัญเกี่ยวกับการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา ซึ่งบ่งชี้ ชัดว่าความหนาแน่นของเนื้อเยื่อต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงมีผลมากต่อการเจริญแบ่งเซลล์ของ fibroblast-like cells แผ่ออกจากเนื้อเยื่อ และเป็นที่ทราบกันว่า**ความหนาแน่นของเซลล์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการ**

เจริญแบ่งตัวของ เซลล์หลายชนิด ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกี่ยวข้องปริมาณสารที่คัดหลั่งจากเซลล์ที่ส่งเสริมการอยู่รอดและการเจริญเพิ่ม จำนวนของเซลล์ข้างเคียง [54]

การเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเสริม 10% FCS, human-recombinant SCF, basic fibroblast growth factor (bFGF), Leukemia inhibitory factor (LIF) และ insulin-like growth factor ร่วมกับการใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของไก่ [31] เซลล์พี่เลี้ยงเป็นปัจจัยผันแปรที่สำคัญเนื่องจากโดยธรรมชาติของเซลล์พัฒนามาจาก primary culture ซึ่งมี โอกาสที่จะพบความแตกต่างด้านคุณสมบัติของเซลล์ที่นำมาใช้จากต่าง passage และต่างสายผลิตได้มาก ขณะที่ยังไม่ทราบว่าเซลล์พี่เลี้ยงนี้สนับสนุนการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดด้วยปัจจัยใด จึงส่งผลให้ ควบคุมมาตรฐานได้ยาก นอกจากนี้การใช้เซลล์พี่เลี้ยงต่างสปีชีส์ยังเป็นข้อกังวลด้านโอกาสปนเปื้อนของเซลล์ พี่เลี้ยงนี้ไปกับเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดและเมื่อใช้ถ่ายฝากให้กับตัวรับก็อาจทำให้ตัวรับเป็นไคเมอร่าที่มีโครโมโซมแปลกปลอมจากเซลล์พี่เลี้ยงได้

ด้วยเหตุนี้จึงได้มีความพยายามพัฒนาระบบการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่อาศัยเซลล์พี่เลี้ยง แต่จนถึงปัจจุบันยัง ไม่มีรายงานความสำเร็จเทียบเท่ากับระบบที่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง การเลี่ยงเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงอาจใช้ conditioned medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการปรับองค์ประกอบด้วยเซลล์พี่เลี้ยงก่อนนำมาใช้ เลี้ยงเซลล์ ร่วมกับการเสริม growth factors [28, 32, 55, 56] อย่างไรก็ตาม conditioned media ก็ยัง มีปัญหาด้านความผันแปรและยากต่อการควบคุมมาตรฐาน ในความพยายามค้นหาสารที่ทราบแน่ชัดมา ทดแทนเซลล์พี่เลี้ยงเพื่อการควบคุมมาตรฐานการเพาะเลี้ยงนั้น มีเพียงรายงานที่พบว่า bFGF สามารถช่วยส่ง เสริมการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกในระบบปราศจากเซลล์พี่เลี้ยง [50] เช่นเดียวกับราย งานในหนู และคน [49]

แม้ว่าการศึกษาของ choi *et al.* (2010) [50] จะไม่พบประโยชน์ของ SCF ในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด แต่อาจเป็นเพราะในการศึกษานั้นใช้ human recombinant SCF ซึ่งโครง สร้างของ SCF มีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์มากพอควร และอาจส่งผลให้เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ ตอบสนองต่อ human recombinant SCF ได้ไม่ดีหรือเหมือนกับเมื่อตอบสนองต่อ chicken SCF

<u>อิทธิพลของ *SCF* และ *e-cadherin* ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด</u>

การที่กลุ่มที่ได้รับ STI571 มีโคโลนีของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเล็กมากและมีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกับ จำนวนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงและน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนนั้น อาจหมายความว่าปัจจัยที่ส่งเสริมการ เจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในระบบการเลี้ยงมาตรฐาน (กลุ่มควบคุม) คือ SCF ที่ผลิตและคัด หลั่งจากเซลล์พี่เลี้ยง ขณะที่ปริมาณที่คัดหลั่งมานี้อยู่ในระดับที่ไม่ได้ออกฤทธิ์สูงสุด การเสริม SCF ในอาหาร เลี้ยงเซลล์ จึงมีแนวโน้มกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม และจากที่พบว่าเซลล์ สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่อยู่ในกระแสเลือดมีการแสดงออกของ c-kit receptor จึงเป็นไปได้มากว่าผลการส่งเสริม การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของ SCF เป็นอิทธิพลทางตรงต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามการศึกษายืนยัน ผลร่วมกับการศึกษากระบวนการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผ่าน signaling pathway เพิ่มเติมจะเป็นข้อมูล ยืนยันที่สำคัญถึงบทบาทของ SCF ดังกล่าว ซึ่งควรทำการศึกษาในอนาคตต่อไป

นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ SCF โดยการขัดขวางการตอบสนองของตัวรับ c-kit ด้วย STI571 อาจมีผลต่อทั้ง secretory และ membrane-bound SCF ซึ่งมีรายงานว่า membrane-bound SCF เป็นปัจจัยเพื่อการมีชีวิตรอด (survival factor) ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีก เช่นเดียวกับที่มีรายงานในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของหนูและสุกร [48, 57, 58] จึงทำให้กลุ่มที่ เสริม STI571 มีจำนวนเซลล์น้อยมากจนเหมือนกับไม่มีการเพิ่มจำนวน

SCF มีบทบาทส่งเสริมการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิด เช่น melanoblasts, hematopoietic stem cells รวมถึง PGCs [59] ซึ่งพบว่ามีการทำงานร่วมของ SCF ในลักษณะ ส่งเสริมกันกับปัจจัยอื่นๆ เช่น Leukemia inhibitory factor (LIF), basic fibroblast growth factor และ forskolin ด้วย [52] ซึ่งปัจจัยทั้งหลายเหล่านี้อาจมีการผลิตจากเซลล์พี่เลี้ยงก็เป็นได้ ส่วนการยืนยันว่า มีการผลิตปัจจัยเหล่านี้ขึ้นในระบบการเลี้ยงโดยเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากเซลล์ตัวอ่อนของนกกระทาหรือไม่ และปัจจัยเหล่านี้มีบทบาทต่อการเพิ่มจำนวน PGC ของสัตว์ปีกเพียงใด ยังต้องอาศัยการพิสูจน์ต่อไป

นอกจากกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของ SCF แล้ว การศึกษานี้ยังพบว่า การขัดขวาง E-cadherin ด้วย anti E-cadherin ก็ทำให้มีจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดลดน้อยลงมากเช่นเดียวกัน จากการสังเกตการเพาะ เลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด พบว่าเซลล์จะเคลื่อนที่มารวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มเล็กๆ ประกอบด้วยเซลล์ 3-5 เซลล์ ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนกลายเป็นโคโลนี จึงตั้งสมมติฐานว่าการรวมกลุ่มกันของเซลล์อาจมี บทบาทสำคัญในการสื่อสารระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระยะ ต่อมา การรวมกลุ่มของเซลล์มักอาศัย adhesion molecule เช่น E-cadherin, catenin, fibronectin และมีผลต่อสรีรวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่สำคัญเช่น การเคลื่อนที่สู่อวัยวะเป้าหมาย [60-64] หรือการกำหนดให้เซลล์ในระยะ gastrulation ของหนูมีคุณสมบัติเป็นเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด [65] ซึ่งข้อมูลการศึกษา adhesion molecule หรือการแสดงออกของตัวรับต่อ extracellular matrix ที่เป็น adhesion molecules บนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกมีน้อยมาก แม้ว่าจะมีการตรวจสอบการ ปรากฏของ extracelluar matrix ตามแนวทางการเคลื่อนที่ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดและเสนอว่าอาจมี บทบาทต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เหล่านั้น แต่ไม่มีการยืนยันชัดเจนถึงการแสดงออกของตัวรับบนเซลล์ในข่วง เวลาดังกล่าว [66]

การที่จำนวนโคโลนีเกิดขึ้นน้อยมากหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม anti E-cadherin และโคโลนีที่ตรวจพบก็มีขนาดเล็กและมีจำนวนเซลล์น้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนเริ่มต้นนั้น อาจแปรผลได้ว่าการยับยั้ง E-cadherin มีผลให้เซลล์สืบพันธุ์ต้น กำเนิดไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ หรือหากมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้บ้างแต่ไม่มีการรวมกลุ่มเป็น โคโลนีเนื่องจากการยับยั้งการเกาะยึดระหว่างเซลล์ จะส่งผลให้การตรวจนับเซลล์ผิดพลาดได้ เนื่องจากการติด ตามหาเซลล์เดี่ยวที่ไม่รวมกลุ่มเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนีอยู่บนเซลล์พี่เลี้ยงนั้นค่อนข้างทำได้ยาก

ผลการทดลองในเบื้องต้นนี้แสดงว่า E-cadherin อาจมีบทบาทส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติในทางใดทางหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า ไวตามินเอส่งเสริมการเพิ่ม จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ด้วยการกระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecule คือ cadherin และ catenins [47]

การสร้าง germline chimera จากการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

พบว่าตำแหน่งที่ถ่ายฝากเซลล์ที่เหมาะสมคือตำแหน่งเส้นเลือด sinus terminalis ของตัวอ่อนระยะที่ 13-15 HH และพบว่าระยะพัฒนาการของตัวอ่อนมีผลต่อการวางตัวของตัวอ่อนในไข่มาก ถ้าตัวรับ มีพัฒนาการไกลเกินกว่าระยะที่ 15 HH มาก จะพบว่าตัวอ่อนมักจะคว่ำลงไปอยู่ด้านข้างหรือด้านล่าง ของไข่เมื่อวางไข่ในแนวนอนให้หน้าต่างที่เปิดไว้ที่เปลือกไข่อยู่ด้านบน และบ่อยครั้งเส้นเลือดที่สามารถเข้าถึง ได้ผ่านช่องหน้าต่างจะเป็นเส้นเลือดในช่วงกลางถึงด้านท้ายลำตัวของตัวอ่อน จากการแลกเปลี่ยนข้อมูลกับ นักวิจัยต่างชาติ พบว่าบางห้องปฏิบัติมีการถ่ายฝากเซลล์ผ่านเส้นเลือดในตำแหน่งท้ายลำตัว ซึ่งหลังจาก ทดลองพบว่า มีตัวอ่อนจำนวนหนึ่งมีเลือดคั่งในหัวใจเป็นสาเหตุให้หัวใจวายหลังจากฉีดเข้าเส้นเลือดใน ตำแหน่งด้านท้ายของลำตัว เชื่อว่าเส้นเลือดในส่วนท้ายเป็นบริเวณเชื่อมต่อของ arteries และ veins และเป็นได้ว่าการฉีดเซลล์แขวนลอยในตำแหน่งนี้มีโอกาสที่จะผลักดันสวนทางเข้าไปใน arteries เป็นผลให้ เกิดแรงต้านต่อการปั๊มเลือดออกจากหัวใจทำให้เกิดเลือดคั่งและหัวใจวายดังกล่าว นอกจากนี้มีการถ่ายฝาก เซลล์ผ่าน dorsal aorta [15] ซึ่งเป็นเส้นเลือดใหญ่และฉีดได้ง่าย แต่การทดลองฉีดเข้า vitelline artery พบว่าตัวอ่อนเสียเลือดมากจากแรงดันเลือดที่ทำให้เลือดไหลออกมาหลังจากถอน capillary pipette ออก แม้ว่าปลาย capillary ที่ใช้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 30 μm เป็นผลให้อัตรารอดของตัวอ่อน ลดลง

หลังจากทดลองพัฒนาทักษะการถ่ายฝากเซลล์สู่ตัวรับเป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่าเป็นขั้นตอนที่ต้อง อาศัยความชำนาญมาก และมีรายละเอียดที่ผู้วิจัยจะต้องปรับหาเทคนิคที่เหมาะสมที่ตนเองทำได้ดี อีกทั้ง คุณภาพไข่รวมถึงตัวอ่อนเป็นปัจจัยสำคัญมากเช่นกัน ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญของโครงการนี้

เนื่องจากแหล่ง ผลิตไข่ฟักอยู่ต่างจังหวัดทั้งหมด จะต้องใช้เวลาขนส่งไข่หลายชั่วโมง และการขนส่งไข่ไม่ได้ใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ไข่อาจเริ่มมีพัฒนาการไปก่อนที่จะเข้าตู้ฟัก ระยะเวลาในการฟักไข่ที่เหมาะสมจึงคลาดเคลื่อนไป โดยที่ ความคลาดเคลื่อนเพียง 1 ชั่วโมงก็มีผลให้ตัวอ่อนมีอายุน้อยหรือมากเกินไปได้ นอกจากนั้นแหล่งไข่ฟักยังเป็น ฟาร์มที่ผลิตเพื่อการค้าไม่ใช่เพื่อการวิจัย ความผันแปรของพัฒนาการของตัวอ่อนในระยะแรกจึงไม่ใช่ปัญหาที่ ต้องแก้ไขสำหรับฟาร์มเนื่องจากไม่มีผลกระทบต่ออัตราการฟักเป็นตัวและอัตรามีชีวิตรอดของลูกไก่

การวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียส่วน d-loop

ลำดับเบสในส่วน d-loop มีความแตกต่างและสามารถแยกกลุ่มพันธุ์ไก่พื้นเมืองในสปีชีส์เดียวกันได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ็นในไมโตคอนเดรียจึงอาจใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบว่า การถ่ายฝาก เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดนั้นมีผลสัมฤทธิ์ในการผลิต germline chimera หรือไม่ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการ ทดสอบลูกผสมไคเมอร่าที่จะดำเนินการต่อไป อย่างไรก็ตามยังต้องเลี้ยงไก่ที่ได้รับการถ่ายฝากเซลล์ต้นกำเนิด จนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จึงจะสามารถเก็บน้ำเชื้อมาวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ โดยภาพรวม การรับถ่าย ทอดเทคโนโลยีการสร้างไคเมอร่าทำได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ หากแต่ประสิทธิภาพยังต่ำ พบว่าลูกไก่ฟ้าพญาลอ และลูกไก่ส่วนใหญ่ที่เกิดจากการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในโครงการนี้ มีร่างกายอ่อนแอตั้งแต่แรกเกิด และมักเสียชีวิตภายใน 1-2 สัปดาห์

การสร้าง *somatic chimera*

โดยภาพรวม สามารถสร้าง somatic chimera **ที่เกิดจากการถ่ายฝากเซลล์ในกระแสโลหิตของ ตัวอ่อนไก่พันธุ์ประดู่หางดำ ให้ตัวรับที่เป็นตัวอ่อนของไก่พันธุ์เหลืองหางขาว ซึ่งตัวรับนี้สามารถพัฒนาต่อไป และฟักเป็นลูกไก่ที่มีทั้งเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ต้นกำเนิดของตัวเอง และจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการถ่าย ฝากมาได้เป็นผลสำเร็จ โดย** somatic chimera **ที่ได้มีการแสดงออกของสีขนและผิวหนังที่เป็นลักษณะของไก่ พันธุ์ประดู่หางดำและพันธุ์ชี ชัดเจน ซึ่งเทคโนโลยีไคเมอร่านี้ จะเป็นประโยชน์สำคัญต่อการอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ในอนาคต เช่นการสร้างไคเมอร่าที่สามารถผลิตชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในทางการแพทย์ได้ โดยอาศัยเทคนิคการดัดแปรพันธุกรรมของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด ก่อนที่จะถ่ายฝากเซลล์ เป็นต้น**

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โครงการได้รับถ่ายทอดเทคโนโลยีและดำเนินการได้ผลตามมาตรฐานสามารถนำไปใช้ประโยชน์และ ถ่ายทอดได้ การค้นพบองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับอิทธิพลของ SCF **ต่อการเหนี่ยวนำการ**

เคลื่อนที่ของเซลล์ สืบพันธุ์ต้นกำเนิดสู่อวัยวะเป้าหมายจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีการสร้างไคเมอร่าซึ่งมีความ สำคัญต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ปีก รวมถึงประโยชน์ต่อการ ศึกษาต่อยอดต่อไป มีบุคคลากรวิจัยรุ่นใหม่ที่ได้รับการฝึกทักษะจนมีความชำนาญ สามารถนำเทคโนโลยีเซลล์ สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกไปขยายผลได้ โครงการนี้ได้มีส่วนสนับสนุนการศึกษาขั้นสูง และได้สร้างเครื่อ ข่ายวิจัยทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ

การค้นพบเบื้องต้นเกี่ยวกับบทบาทของ SCF และ E-cadherin ต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวน ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่เป็นข้อมูลที่น่าสนใจที่ควรมีการศึกษายืนยันผลต่อไป การศึกษานี้อาจนำไปสู่ การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกให้มีประสิทธิภาพสูง และยังเป็นข้อมูล พื้นฐานเพื่อการศึกษาวิจัยต่อยอดในเชิงลึกต่อไปได้

เนื่องจากประโยชน์ของเทคโนโลยีนี้เป็นการนำไปใช้เพื่ออนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ปีกซึ่งเป็นทรัพยากรของประเทศและของโลก ดังนั้นขั้นตอนการนำไปปฏิบัติจึงเกี่ยวข้องนโยบายระดับประเทศ ที่ต้องมีการกำหนดแผนงานระยะยาว เช่นการเก็บรักษาความหลากหลายทางชีวภาพด้วยการจัดตั้งธนาคาร เซลล์แห่งชาติ เป็นต้น ซึ่งหน่วยงานระดับมหาวิทยาลัยสามารถให้การสนับสนุนทางด้านการพัฒนาเทคโนโลยี แต่การดำเนินงานให้ยั่งยืนต้องอาศัยหน่วยงานที่รับผิดชอบโดยตรงระดับประเทศ ดังเช่นที่มีการจัดตั้งธนาคาร เซลล์แห่งชาติในหลายประเทศทั่วโลก

บรรณานุกรม

1. Harvey, C.A., et al., Patterns of animal diversity in different forms of tree cover in agricultural landscapes. Ecol Appl, 2006. 16(5): p. 1986-99.
2. Sodhi, N.S., et al., Long-term avifaunal impoverishment in an isolated tropical woodlot. Conserv Biol, 2006. 20(3): p. 772-9.
3. Pain, D.J., et al., Mortality of globally threatened Sarus cranes Grus antigon from monocrotophos poisoning in India. Sci Total Environ, 2004. 326(1-3): p. 55-61.
4. Koenig, R., Ornithology. Vulture research soars as the scavengers' numbers decline. Science, 2006. 312(5780): p. 1591-2.
5. Sodhi, N.S., et al., Deforestation and avian extinction on tropical landbridge islands. Conserv Biol, 2010. 24(5): p. 1290-8.
6. Swan, G., et al., Removing the threat of diclofenac to critically endangered Asian vultures. PLoS Biol, 2006. 4(3): p. e66.
7. Custer, C.M., T.W. Custer, and E.F. Hill, Mercury exposure and effects on cavity-nesting birds from the Carson River, Nevada. Arch Environ Contam Toxicol, 2007. 52(1): p. 129-36.

8. Brasso, R.L. and D.A. Cristol, Effects of mercury exposure on the reproductive success of tree swallows (Tachycineta bicolor). Ecotoxicology, 2008. 17(2): p. 133-41.
9. Burger, J. and M. Gochfeld, Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. Environ Res, 1997. 75(2): p. 160-72.
10. Olsen, B., et al., Global patterns of influenza a virus in wild birds. Science, 2006. 312(5772): p. 384-8.
11. Machalaba, C.C., et al., Global avian influenza surveillance in wild birds: a strategy to capture viral diversity. Emerg Infect Dis, 2015. 21(4): p. e1-7.
12. Caron, A., et al., Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. Vet Res, 2015. 46: p. 83.
13. Tajima, A., et al., Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (Gallus domesticus). Theriogenology, 1993. 40(3): p. 509-19.
14. Naito, M., et al., Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. Mol Reprod Dev, 1994. 39(2): p. 153-61.
15. Tajima, A., et al., Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. J Exp Zool, 1998. 280(3): p. 265-7.
16. Nakamura, Y., et al., Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. Biol Reprod, 2010. 83(1): p. 130-7.
17. Naito, M., et al., Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. J Reprod Fertil, 1999. 117(2): p. 291-8.
18. Naito, M., et al., Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. J Reprod Fertil, 1994. 102(2): p. 321-5.
19. Liu, C., et al., Production of chicken progeny (Gallus gallus domesticus) from interspecies germline chimeric duck (Anas domesticus) by primordial germ cell transfer. Biol Reprod, 2012. 86(4): p. 101.
20. Kang, S.J., et al., Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: effect of donor cell sex on chimeric semen production. Theriogenology, 2009. 72(4): p. 519-27.
21. Kang, S.J., et al., Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. Biol Reprod, 2008. 79(5): p. 931-7.

22. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. Dev Dyn, 1992. 195(4): p. 231-72.
23. Zhao, D.F. and T. Kuwana, Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. Br Poult Sci, 2003. 44(1): p. 30-5.
24. Yasuda, Y., et al., A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. J Reprod Fertil, 1992. 96(2): p. 521-8.
25. Fridolfsson, A. and H. Ellegren, A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. Journal of Avian Biology, 1999. 30: p. 6.
26. Shim, H. and G.B. Anderson, In vitro survival and proliferation of porcine primordial germ cells. Theriogenology, 1998. 49(3): p. 521-8.
27. Shamblott, M.J., et al., Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(23): p. 13726-31.
28. Karagenc, L. and J.N. Petitte, Soluble factors and the emergence of chick primordial germ cells in vitro. Poult Sci, 2000. 79(1): p. 80-5.
29. Heo, Y.T., et al., Production of somatic chimera chicks by injection of bone marrow cells into recipient blastoderms. J Reprod Dev, 2012. 58(3): p. 316-22.
30. Nakamura, Y., et al., Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. Poult Sci, 2007. 86(10): p. 2182-93.
31. Park, T.S. and J.Y. Han, Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. Mol Reprod Dev, 2000. 56(4): p. 475-82.
32. Shiue, Y.L., et al., Establishment of the long-term in vitro culture system for chicken primordial germ cells. Reprod Domest Anim, 2009. 44(1): p. 55-61.
33. Mozdziak, P.E., et al., Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. Poult Sci, 2005. 84(4): p. 594-600.
34. Macdonald, J., et al., Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. PLoS One, 2010. 5(11): p. e15518.
35. Kim, J.N., et al., Detection and characterization of primordial germ cells in pheasant (Phasianus colchicus) embryos. Theriogenology, 2005. 63(4): p. 1038-49.
36. Reedy, M.V., R.L. Johnson, and C.A. Erickson, The expression patterns of c-kit and Sl in chicken embryos suggest unexpected roles for these genes in somite and limb development. Gene Expr Patterns, 2003. 3(1): p. 53-8.

37. Ono, T. and Y. Machida, Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (Coturnix japonica). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1999. 122(2): p. 255-9.
38. Kim, J.N., et al., Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. Mol Reprod Dev, 2004. 68(1): p. 81-7.
39. Yamamoto, Y., et al., A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. Biol Reprod, 2007. 77(1): p. 115-9.
40. Emre, N., et al., The ROCK inhibitor Y-27632 improves recovery of human embryonic stem cells after fluorescence-activated cell sorting with multiple cell surface markers. PLoS One, 2010. 5(8): p. e12148.
41. Gauthaman, K., C.Y. Fong, and A. Bongso, Effect of ROCK inhibitor Y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hESCs) in vitro: its benefits in hESC expansion. Stem Cell Rev, 2010. 6(1): p. 86-95.
42. Holm, F., et al., Passaging techniques and ROCK inhibitor exert reversible effects on morphology and pluripotency marker gene expression of human embryonic stem cell lines. Stem Cells Dev, 2013. 22(13): p. 1883-92.
43. Rungsiwiwut, R., et al., The ROCK inhibitor Y-26732 enhances the survival and proliferation of human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells upon dissociation. Cells Tissues Organs, 2013. 198(2): p. 127-38.
44. Watanabe, K., et al., A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol, 2007. 25(6): p. 681-6.
45. Heng, B.C., Effect of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Tissue Cell, 2009. 41(5): p. 376-80.
46. Li, X., et al., ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. Hum Reprod, 2009. 24(3): p. 580-9.
47. Yu, M., K. Guan, and C. Zhang, The promoting effect of retinoic acid on proliferation of chicken primordial germ cells by increased expression of cadherin and catenins. Amino Acids, 2011. 40(3): p. 933-41.
48. Pesce, M., et al., Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). Development, 1993. 118(4): p. 1089-94.

49. Cheng, L., et al., Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. Development, 1994. 120(11): p. 3145-53.
50. Choi, J.W., et al., Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. PLoS One, 2010. 5(9): p. e12968.
51. De Felici, M. and M. Pesce, Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation. Prog Growth Factor Res, 1994. 5(2): p. 135-43.
52. Dolci, S., M. Pesce, and M. De Felici, Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. Mol Reprod Dev, 1993. 35(2): p. 134-9.
53. Donovan, P.J., Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. Curr Top Dev Biol, 1994. 29: p. 189-225.
54. Ko, J.Y., et al., Effect of cell-density on in-vitro dopaminergic differentiation of mesencephalic precursor cells. Neuroreport, 2005. 16(5): p. 499-503.
55. Park, J.H., et al., Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells. Mol Cells, 2004. 17(2): p. 309-15.
56. Rathjen, J., et al., Identification of a biological activity that supports maintenance and proliferation of pluripotent cells from the primitive ectoderm of the mouse. Biol Reprod, 2003. 69(6): p. 1863-71.
57. Durcova-Hills, G., et al., Primary culture of porcine PGCs requires LIF and porcine membrane-bound stem cell factor. Zygote, 1998. 6(3): p. 271-5.
58. Lee, C.K. and J.A. Piedrahita, Effects of growth factors and feeder cells on porcine primordial germ cells in vitro. Cloning, 2000. 2(4): p. 197-205.
59. Godin, I., et al., Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature, 1991. 352(6338): p. 807-9.
60. De Felici, M., M.L. Scaldaferri, and D. Farini, Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. Front Biosci, 2005. 10: p. 542-51.
61. Blaser, H., et al., Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 17): p. 4027-38.
62. Dzementsei, A., et al., Migratory and adhesive properties of Xenopus laevis primordial germ cells in vitro. Biol Open, 2013. 2(12): p. 1279-87.
63. Alvarez-Buylla, A. and H. Merchant-Larios, Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. Exp Cell Res, 1986. 165(2): p. 362-8.

64. Ffrench-Constant, C., et al., Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. Development, 1991. 113(4): p. 1365-73.

65. Okamura, D., et al., Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice. Development, 2003. 130(26): p. 6423-30.

66. Urven, L.E., U.K. Abbott, and C.A. Erickson, Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ cells. Anat Rec, 1989. 224(1): p. 14-21.

ภาคผนวก

<u>การเผยแพร่ผลงาน</u>

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

Teinlek, P., K. Siripattarapravat and C. Tirawattanawanich. 2014. Phylogenetic analysis of Red junglefowl in Thailand and Thai native chicken based on complete sequence of mitochondrial DNA d-loop region. *The 39th International Conference on Veterinary Sciences*, Bangkok, Thailand.

Madapong, A., P. Teinlek, K. Siripattarapravat and C. Tirawattanawanich. 2014. *In vitro* model for the study of stromal cell-derived factor-1 (Sdf-1) mediated migration of primordial germ cells. *The 39th International Conference on Veterinary Sciences*, Bangkok, Thailand.

Tirawattanawanich, C. 2013. Primordial germ cell cryo-banking for genetic conservation of Thai indigenous birds. *International forum on avian germplasm conference in Seoul,* Seoul, Korea.

Srihawong, T., T. Kuwana, Y. Minoguchi, K. Siripatarapravat and C. Tirawattanawanich. 2011. Chemoattractant action of avian stem cell factor on chicken primordial germ cell migration. *2nd International Workshop on Preservation of Avian Primordial Germ Cells and Its Usage*, P5 Okinawa, Japan, Jan.

Tirawattanawanich, C., K. Siripatarapravat and T. Srihawong. 2010. A progress report on PGC culture. *The 6th Internationa Meeting on "Cryo-Phoenix Project",* P15 Tsukuba, Japan, Nov.

Tirawattanawanich, C. and Roytrakul, S. 2010. Conservation of Endangered Wild Birds Using Primordial Germ Cell. *International Workshop for Preservation of the Avian Primordial Germ Cells and Its Usage*, Okinawa, Japan.

เรื่องเต็มการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

Tirawattanawanich, C. 2012. Conservation of Red Junglefowl biodiversity by primordial germ cell cryopreservation. *The 15th AAAP Animal Science Congress,* Thailand.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Srihawong, T., Kuwana, T., Siripattaraprawat, K and Tirawattanawanich, C. 2015. Chicken primordial germ cell motility in response to stem cell factor sensing. *Int J Dev Biol*. 59: 453-460.

รายนามหัวหน้าโครงการและคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

ผศ.น.สพ.ดร.ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ โทรศัพท์/โทรสาร 02-579-7538, e-mail: fvetcnt@ku.ac.th

<u>ผู้ร่วมวิจัย</u>

1. รศ.น.สพ.ดร. วรวิทย์ วัชชวัลคุ

สังกัด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ โทรศัพท์ 081-981-1545

2. ผศ.น.สพ.ดร. ไชยันต์ เกษรดอกบัว

สังกัด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ โทรศัพท์ 02-5790058

3. ผศ.น.สพ. คงศักด์ เที่ยงธรรม

สังกัด ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิคสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ โทรศัพท์ 08-7909-9209

4. น.สพ. เกษตร สุเตชะ

สังกัด โรงพยาบาลสัตว์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ โทรศัพท์ 02-579-0058

5. ผศ.สพ.ญ.ดร. กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัติ

สังกัด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 02-579-0058