ผลของสารอะทราซีนต่อการเจริญพันธุ์ของหนูเม้าส์เพศเมีย
Effect of atrazine on fertility of female mice

อำพา เหลืองภิรมย์ (Ampa Luangpirom)[1*]
ทัศนีย์ภรณ์ จันทร์ศรจักร (Tussaneeporn Junsanjuk)[2]

บทคัดย่อ

อะทราซีน (atrazine) เป็นสารปราบวัชพืชแบบไม่เลือก ที่ใช้อย่างกว้างขวางในทางเกษตรกรรม สารนี้ยังออกฤทธิ์เป็นแอนติอีสโตรเจนในสัตว์เพศเมียและแอนติแอนโดรเจนในสัตว์เพศผู้ จากผลการศึกษานี้ทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าสารปราบวัชพืชนี้อาจรบกวนวงอีสตรัส การเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่ และต่อเนื้อเยื่อมดลูกของหนูเมาส์เพศเมีย โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ป้อนสารอะทราซีนขนาด 0, 20 หรือ 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวให้แก่หนูเม้าส์เป็นเวลา 28 วันติดต่อกัน แล้วทำการวิเคราะห์ผลหลังหยุดให้สาร 0, 14 และ 28 วัน ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารทั้งสองกลุ่มมีวงอีสตรัสเปลี่ยนไปโดยมีระยะโปรอีสตรัสยาวขึ้นแต่ระยะไดอีสตรัสสั้นลง ผลการตรวจจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่และมดลูก พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารทั้งสองกลุ่มมีจำนวน preantral follicle ลดลงแต่จำนวน atretic follicle เพิ่มขึ้นและความหนาของชั้นเอนโดมีเทรียมก็ลดลงด้วย ลักษณะดังกล่าวสามารถกลับมาเป็นปกติหลังหยุดให้สาร 28 วัน ผลการวิจัยสรุปได้ว่าอะทราซีนมีผลต่อภาวะเจริญพันธุ์ของหนูเมาส์เพศเมียโดยมีผลรบกวนวงอีสตรัส การเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่และจุลพยาธิสภาพของมดลูกและผลดังกล่าวเป็นผลชั่วคราว

Abstract

Atrazine is widely used as a nonselective herbicide in agricultural fields. Previous studies had shown that atrazine acts as an anti-estrogen in female animals and anti-androgen in male animals. This information led us to hypothesize that this herbicide disrupts the estrous cycle, follicle development and uterine histology of female mice. Experimental mice were gavaged with atrazine at doses of 0, 20 or 30 mg / 100 g BW for 28 consecutive days. Results were determined at 0, 14 and 28 days after treatment. After 0 days of withdrawal,

[1]*รองศาสตราจารย์ ศูนย์อนุกรมวิธานประยุกต์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น*
[2] *อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดร จ.อุดรธานี*
[*]*corresponding author, e-mail:amplua@kku.ac.th*

04 150 4/2/09, 9:47 AM
Black

the estrous cycle of both treated groups was significantly increased in the duration of proestrus but decreased in the duration of diestrus. Histological examination of ovaries and uteri of both treated groups showed decrease in the number of preantral follicles and endometrial thickness, but an increase in the number of atretic follicles. All of these effects were reversible after 28 days of withdrawal. In conclusion, atrazine affects on the fertility of female mice were caused by disruption of the estrous cycle, follicle development and histology of the uterus. However, it is a temporary effect.

คำสำคัญ: อะทราซีน, วงอีสตรัส, รังไข่และมดลูก
Keywords: atrazine, estrous cycle, ovaries and uterus

บทนำ

อะทราซีน (atrazine) เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม chloro-S-triazine (C6H14Cl N5 : 2 chloro-4-ethylamino-6-isopropylmino-S- triazine) ที่ใช้ปราบวัชพืชในแปลงพืชปลูกอย่างกว้างขวาง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย สับปะรด หน่อไม้ฝรั่ง และผลไม้หลายชนิด (รังสิต , 2533) ครึ่งชีวิตของอะทราซีนนานกว่า 60 วัน และตกค้างในดินนานถึง 7-8 เดือน จึงทำให้มีการปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน นอกจากนี้พืชบางชนิดมีเมแทบอลิซึมที่สามารถลดการทำลายและลดพิษของอะทราซีนได้ ทำให้พืชสามารถทนต่อการถูกทำลายทำให้ต้องใช้อะทราซีนเพิ่มขึ้นในการปราบวัชพืช (WHO, 1984) อะทราซีนสามารถซึมผ่านผิวหนังของคนเรา ถ้าปนเปื้อนในอาหารจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วในทางเดินอาหาร และถูกเมแทบอลิซึมขับออกทางปัสสาวะ 37 % ภายใน 72-96 ชั่วโมง ขับออกมากับกากอาหาร 14 % ภายใน 24 ชั่วโมง การตกค้างของอะทราซีนในร่างกายจะถูกสะสมในเนื้อเยื่อตับไต ปอดและโดยเฉพาะในเนื้อเยื่อไขมัน เนื่องจากอะทราซีนมีโครงสร้างคล้ายสเตอรอยด์ (ATSDR, 2006) คนและสัตว์ถ้าได้รับอะทราซีนในปริมาณสูงจะเกิดพิษเฉียบพลัน เช่น ปวดศีรษะ อาเจียน ปวดกล้ามเนื้อ เหงื่อออกมาก เป็นตะคริว หายใจติดขัด ตาพร่ามัว และอาจเสียชีวิตได้ ส่วนพิษเรื้อรังพบในกรณีได้รับอะทราซีนในปริมาณน้อยและเป็นเวลานาน ความเข้มข้นของพิษจะถูกสะสมเพิ่มมากขึ้นจนก่อพิษได้ เช่นเป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตและโรคพากินสัน (Rodriguez et al., 2005) มะเร็งเต้านม (Cooper et al., 2007) มะเร็งต่อมลูกหมาก (ATSDR, 2006) และเป็นหมัน (Cooper et al., 2002 ; Stoker et al , 2000; ATSDR, 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์หลายชนิดเกี่ยวกับผลของอะทราซีนต่อความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของระบบสืบพันธุ์อันเป็นสาเหตุสำคัญทำให้สัตว์เป็นหมัน Wilhelms et al. (2006)รายงานว่า นกกะทาเพศเมียที่ได้รับอะทราซีน 500 ไมโครกรัม /กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีน้ำหนักรังไข่ลดลง 48.3% และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลง 73.6 % Spiteri et al. (1999) ได้ให้อะทราซีน 0.14-14 ppm. แก่ตัวอ่อนจรเข้ระยะก่อนสร้างอวัยวะเพศพบว่ามีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยมีการสลายของเซลล์บุผิวในระบบท่อของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย(Mullerian duct) ส่วนการศึกษาในสัตว์ที่ใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับอะทราซีนในช่วงอายุ 23-53 วัน มีผลยืดเวลาการเปิดของปลายอัณฑะ ต่อมเซมินัลเวสซิเคิลมีขนาดลดลง และปริมาณฮอร์โมนเทสทอสเตอโรนในอัณฑะก็ลดลงด้วย ทำให้การเจริญสู่วัยเจริญพันธุ์ของหนูแรทเพศผู้ช้าลง (Trentacoste et al., 2000) และคุณภาพของน้ำอสุจิก็ลดลงด้วย (อำพา และทัศนีย์ภรณ์ , 2008) ถ้าแม่หนูได้รับอะทราซีนในระยะตั้งท้องจะมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ในลูกหนูเพศผู้ (Rosenberg et al., 2008) ส่วนหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารอะทราซีนก่อนมีการเปิดของช่องคลอด

(vaginal opening) จะมีผลยืดเวลาของการเปิดช้ากว่าปกติ (Laws et al., 2003) และถ้าได้รับสารในวัยเจริญพันธุ์ มีผลรบกวนวงอีสตรัส (oestrus cycle) ทำให้มีระยะไดอีสตรัสยาวขึ้นแต่ระยะอีสตรัสลดลง (Eldridge et al.,1999, Simic,2006) มีผลชักนำการเกิดท้องเทียม (Toppari et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการหลั่ง LH และ prolactin surge ถ้าให้ในวันที่หนูมีระยะโปรอีสตรัสของวงอีสตรัสจะทำให้ไม่มีการตกไข่ (Cooper et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของอะทราซีนต่อวงอีสตรัส ต่อการสร้างฟอลลิเคิลในรังไข่และการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูกในหนูเม้าส์เพศเมียในวัยเจริญพันธุ์ ผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลบอกความเป็นพิษของอะทราซีนที่อาจเกิดกับคนและสัตว์ในเขตเกษตรกรรมที่มีการใช้อะทราซีนในการกำจัดวัชพืช

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ (*Mus musculus* L.) สายพันธุ์ ICR เพศเมียอายุ 6-7 สัปดาห์ จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เลี้ยงและทดลองในเรือนสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ช่วงสว่าง: มืด = 14:10 ชั่วโมง หนูทดลองได้รับอาหารสำเร็จรูปและน้ำดื่มตลอดเวลา

การเตรียมสารละลายอะทราซีน

สารอะทราซีนในรูปผง (80% WP, บริษัทเคเมอร์ จำกัด) นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 20 และ 30 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เพื่อให้สัตว์ทดลองในขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัว

การตรวจสอบคุณภาพของระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย

-การตรวจวงอีสตรัสใช้วิธีตรวจสอบเซลล์บุผิวของช่องคลอด (vaginal smear) ตามวิธีของ Cooper et al.(1993)

-การหาค่า proestrus index และ diestrus index ปรับจากวิธีของ Baligar และ Kaliwal (2001)

-การจำแนกชนิดของฟอลลิเคิลในรังไข่ตามวิธีของ Pederson และ Peter (1968)

การทดลอง

1. ผลของสารอะทราซีนต่อวงอีสตรัส

หนูเม้าส์เพศเมียจำนวน 54 ตัว แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่มๆละ 18 ตัว กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมให้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร /100 กรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 และ3 ป้อนสารละลายอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นแต่ละกลุ่มแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยๆ ละ 6 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มหยุดให้อะทราซีน 0, 14 และ 28 วันตามลำดับ ทำการตรวจวงอีสตรัสทุกวันตลอดการทดลองทุกกลุ่ม นับจำนวนวันของแต่ละระยะของวงอีสตรัสและหาค่า proestrus index และ diestrus index เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

2. ผลของอะทราซีนต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อมดลูก

จากการทดลองที่ 1 วันสุดท้ายของการทดลองของแต่ละกลุ่ม นำหนูมาฆ่า ผ่าตัดหน้าท้องนำรังไข่และมดลูกมารักษาสภาพด้วยสารละลาย Bouin และนำไปทำสไลด์ด้วยวิธีพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสีฮีมาทอกไซลินและสีอีโอซิน (H&E) ทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวน ฟอลลิเคิลชนิดต่างๆในรังไข่ และวัดความหนาของชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูก เปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

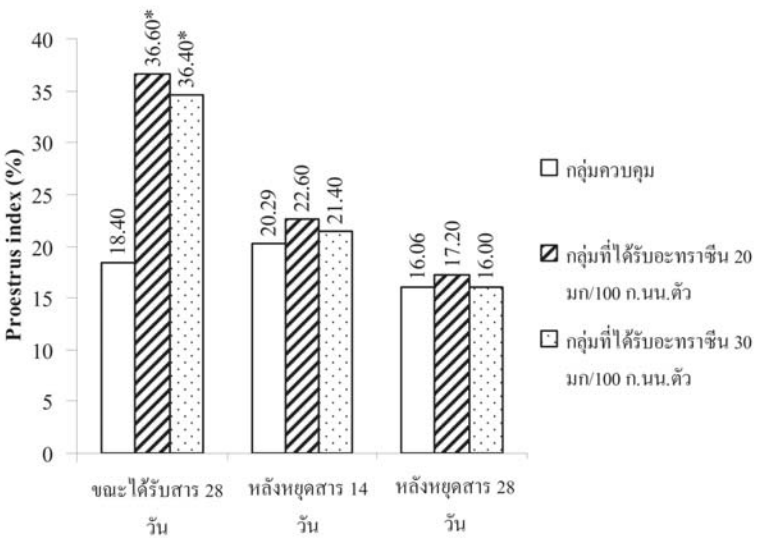
การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของระยะต่างๆของวงอีสตรัส จำนวนฟอลลิเคิลชนิดต่างๆ และความหนาของชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูกของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple test ของโปรแกรม SAS (มนต์ชัย, 2544)

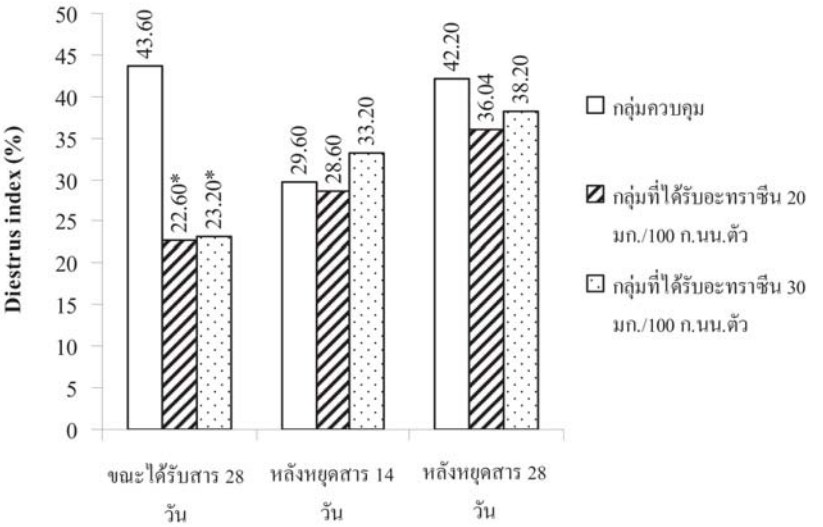
ผลการทดลอง

ผลของอะทราซีนต่อวงอีสตรัส

หนูเม้าส์กลุ่มควบคุมมีวงอีสตรัสยาว 5 วัน โดยมีระยะโปรอีสตรัส : ระยะอีสตรัส :ระยะเมตอีสตรัส :ระยะไดอีสตรัส = 0.92: 0.98 : 0.92: 2.18 (= 1:1: 1: 2) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 28 วัน มีระยะโปรอีสตรัส: ระยะอีสตรัส : ระยะเมตอีสตรัส: ระยะไดอีสตรัส = 1.83 : 1.03 : 0.89 : 1.13 และ 1.73 : 1.06 : 0.92 : 1.06 ตามลำดับ โดยมีระยะโปรอีสตรัสและระยะอีสตรัสยาวขึ้นแต่ระยะไดอีสตรัสสั้นลง เมื่อหาค่า proestrus index และ diestrus index พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 28 วันมีค่า proestrus index = 36.60 และ 34.60 % และค่า diestrus index = 22.60 และ 23.20 % ตามลำดับซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (proestrus index = 18.40 % และ diestrus index = 43.60 %) อย่างมีนัยสำคัญที่ $P< 0.05$ หลังหยุดให้อะทราซีน 14 วันพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัมมีค่า proestrus index = 22.60 และ 21.40 % ส่วนค่า diestrus index = 28.60 และ 33.20 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อหยุดให้อะทราซีน 28 วัน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัมมีค่า proestrus index เท่ากับ 17.20 และ 16.00 % ส่วนค่า diestrus index = 36.40 และ 38.20 % ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1 และ 2)



รูปที่ 1. กราฟแสดง Proestrus index ของหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีน
* ได้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P< 0.05$



รูปที่ 2. กราฟแสดง Diestrus index ของหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีน
*ได้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ P< 0.05

ผลของอะทราซีนต่อการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่

หนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัวมีจำนวน preantral follicles = 5.83 ± 0.60 และ 5.33 ± 0.49 ฟองตามลำดับ ซึ่งลดลง และ atretic follicles = 6.50 ± 0.74 และ 7.66 ± 0.49 ฟองตามลำดับซึ่งเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (preantral follicles = 8.16 ± 0.47 และ atretic follicles = 1.50 ± 0.34 ฟอง) อย่างมีนัยสำคัญที่ P < 0.05 ส่วนจำนวน corpus luteum ก็ลดลงแต่ไม่แตกต่างจากลุมควบคุม (ตารางที่ 1) หลังหยุดให้อะทราซีนเป็นเวลา 14 วันพบว่าหนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวมีจำนวน preantral follicles = 6.16 ± 0.47 ฟองซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (7.83 ± 0.60 ฟอง) อย่างมีนัยสำคัญที่ P < 0.05 และ atretic follicles = 2.33. ± 0.49 ฟอง แต่ไม่แตกต่างจาก กลุ่มควบคุม (1.33 ± .033 ฟอง) ส่วนหนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวมีจำนวน preantral follicles และ atretic follicles = 6.33 ± 0.42 และ 2.50 ± 0.56 ฟอง และไม่แตกต่างจากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2) เมื่อหยุดให้สารเป็นเวลา 28 วันพบว่าหนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน ขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัวมีจำนวน preantral follicles และ atretic follicles ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3)

ผลการตรวจจุลพยาธิสภาพของรังไข่ที่ได้จากหนูที่มีวงอีสตรัสในระยะโปรอีสตรัส พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารอะทราซีนทั้งสองกลุ่มมี preantral follicle corpus luteum ลดลงแต่ antral follicles และ atretic follicles เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มควบคุมมี antral follicle และมี corpus luteum เก่าอันเกิดจากการตกไข่ครั้งก่อน (รูปที่ 3:P_{0-0}) หลังหยุดให้สารเป็นเวลา 14 วันพบว่าหนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับอะทราซีนพบ preantral follicle และ antral follicles (รูปที่ 3:P_{20-14} และ P_{30-14}) เมื่อหยุดให้

สารเป็นเวลา 28 วันพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทั้งสองกลุ่มพบ corpus luteum และ antral follicles (รูปที่ 3:P_{0-28} 1:P_{20-28} และ P_{30-28}) ส่วนผลการตรวจจุลพยาธิสภาพของรังไข่ที่ได้จากหนูในระยะไดอีสตรัสพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารอะทราซีนทั้งสองกลุ่มไม่พบ corpus luteum แต่พบ antral follicles และ Graffian follicles (รูปที่ 4:D_{20-0} และ4:D_{30-0}) ขณะที่กลุ่มควบคุมพบ corpus luteum อันใหม่และเก่า (รูปที่ 4:D_{0-0}) หลังหยุดให้สารเป็นเวลา 14 และ 28 วันพบว่าหนูเม้าส์กลุ่มควบคุมกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนทั้งสองกลุ่มพบ corpus luteum, preantral follicles และ antral follicles (รูปที่ 4: D_{0-14} ,D_{0-28} , D_{20-14} , D_{20-28} , D_{30-14} และ D_{30-28})

ตารางที่ 1. ชนิดและจำนวนฟอลลิเคิลในรังไข่ของหนูเมส์ขณะได้รับสารอะทราซีน 28 วัน

สารอะทราซีน (มก/100 ก. นน.ตัว) N=6	จำนวนฟอลลิคิลในระยะต่างๆ (ฟอง/ตัว)				
	Preantral follicle	Antral follicle	Graffian follicle	Corpus luteum	Atretic follicle
0	8.16±0.47	2.16±0.47	2.00±0.36	2.50±0.42	1.50±0.34
20	5.83±0.60*	3.50±0.42NS	1.50±0.34NS	1.83±0.30NS	6.50±0.74*
30	5.33±0.49*	3.61±0.47NS	1.66±0.33NS	1.83±0.30NS	7.66±0.49*

N=จำนวนสัตว์ทดลอง; NS = ได้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม $P > 0.05$;

* =ได้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ตารางที่ 2. ชนิดและจำนวนฟอลลิเคลในรังไข่ของหนูเมส์หลังหยุดให้สารอะทราซีน 14 วัน

สารอะทราซีน (มก/100 ก. นน.ตัว) N=6	จำนวนฟอลลิคิลในระยะต่างๆ (ฟอง/ตัว)				
	Preantral follicle	Antral follicle	Graffian follicle	Corpus lutea	Atretic follicle
0	7.83±0.60	2.83±0.30	2.16±0.30	2.20±0.37	1.33±0.33
20	6.16±0.47*	2.66±0.27NS	2.00±0.36NS	2.33±0.33NS	2.33±0.49NS
30	6.33±0.42NS	2.66±0.33NS	1.83±0.30NS	3.00±0.36NS	2.50±0.56NS

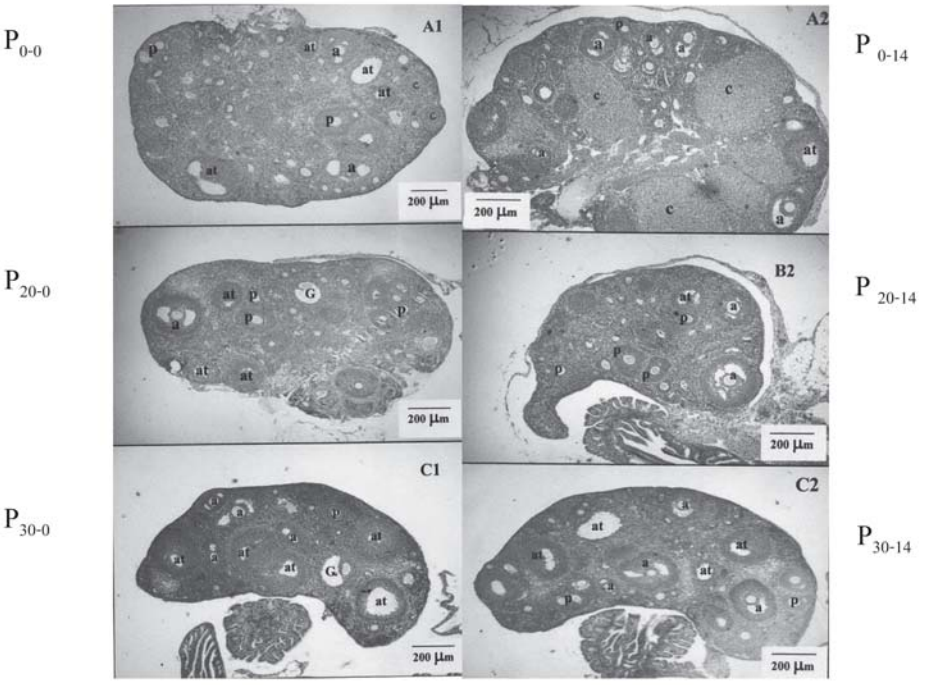
N=จำนวนสัตว์ทดลอง; NS = ได้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม $P > 0.05$;

*=ได้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

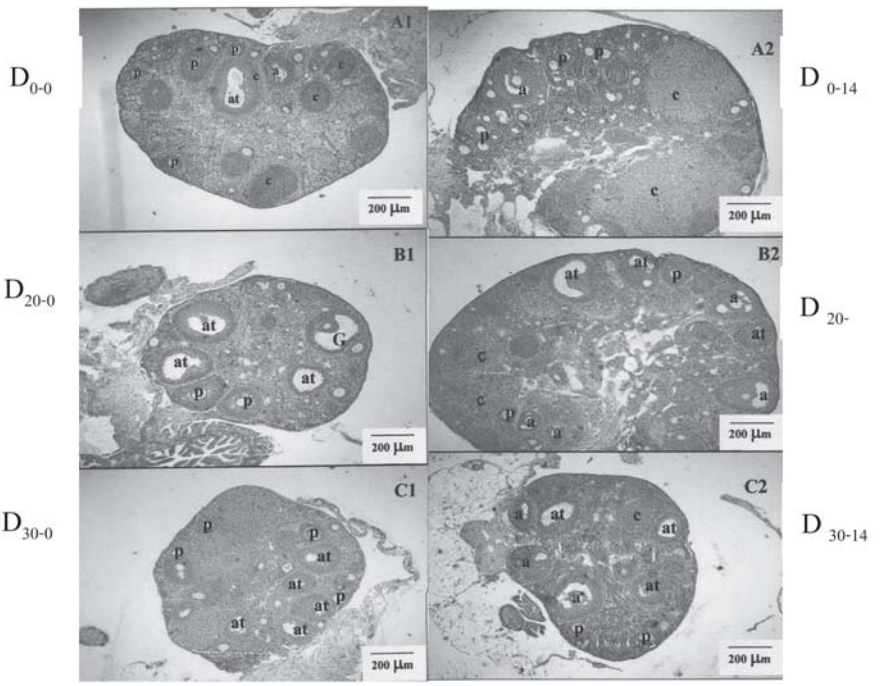
ตารางที่ 3. ชนิดและจำนวนฟอลลิเคิลในรังไข่ของหนูเมาส์หลังหยุดให้สารอะทราซีน 28 วัน

สารอะทราซีน (มก/100 ก. นน.ตัว) N=6	จำนวนฟอลลิคิลในระยะต่างๆ (ฟอง/ตัว)				
	Preantral follicle	Antral follicle	Graffian follicle	Corpus lutea	Atretic follicle
0	8.16±0.30	2.83±0.30	2.33±0.21	3.00±0.36	1.16±0.30
20	7.50±0.61^{NS}	3.00±0.25^{NS}	2.16±0.47^{NS}	3.16±0.47^{NS}	1.33±0.42^{NS}
30	8.00±0.57^{NS}	3.16±0.30^{NS}	2.99±0.33^{NS}	2.50±0.34^{NS}	1.66±0.49^{NS}

N=จำนวนสัตว์ทดลอง; NS = ได้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม P > 0.05;



รูปที่ 3. รังไข่ตัดตามแนวขวางของหนูที่ได้รับอะทราซีน 28 วันในวันระยะโปรอีสตรัส (P) (H & E, x 40) แสดง preantral follicle (p); antral follicle (a) ; Graffain follicle (g); corpus luteum (c)และ atretic follicle (at) ซ้าย: (P_{0-0});กลุ่มควบคุมพบ preantral follicle มากมาย ;: (P_{20-0}) และ (P_{30-0}); กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวพบ preantral follicles ลดลง แต่ atretic follicles เพิ่มขึ้น ขวา: หลังหยุดให้สาร 14 วัน (P_{0-14}); กลุ่มควบคุมพบ corpus luteum และ antral follicles มากมาย: (P_{20-14} และ P_{30-14}); กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวพบ preantral follicles และ antral follicles



รูปที่ 4. รังไข่ตัดตามแนวขวางที่ได้จากหนูเม้าส์ที่ได้รับอะทราซีน 28 วันในวันระยะไดอีสตรัส (D) (H&E, x 40) แสดง preantral follicle(p); antral follicle(a) ; Graffain follicle(g); corpus luteum(c) และ atretic follicle (at) ซ้าย: (D_{0-0}); กลุ่มควบคุมพบ corpus luteum มากมาย , (D_{20-0}); กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวไม่พบ corpus luteum แต่พบ antral follicles และ Graffian follicles ส่วน (D_{30-0}) ; กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวไม่พบ corpus luteum แต่พบ antral follicles และ preantral follicles มากมาย ขวา :หลังหยุดให้สาร 14 วัน (D_{0-14}):กลุ่มควบคุมพบ corpus luteum มากมาย : (D_{20-14} และ D_{30-14}); กลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักตัวพบ corpus luteum , antral follicles และ atretic follicles

ผลของอะทราซีนต่อจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อมดลูก

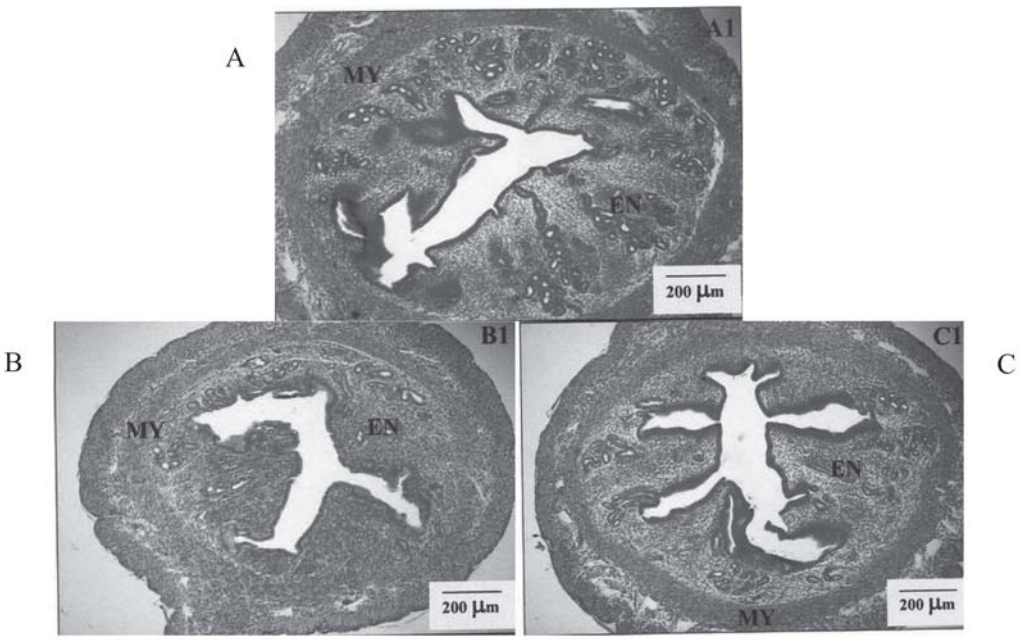
หนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวพบมีชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูกหนา = 545.55 ± 141.32 และ 465.56 ± 118.50 ไมโครเ-มตรตามลำดับ ซึ่งลดลงและแตกต่างจากกลุ่มควบคุม(611.11 ± 177.08 ไมโครเมตร) อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ หรือคิดเป็นร้อยละ 84.50 และ 72.12 และมีต่อมในชั้นเอนโดมีเทรียมลดลงด้วย หลังหยุดให้สาร 14 วัน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 20 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว มีชั้นเอนโดรมีเทรียมของมดลูกหนา = 585.00 ± 149.02 ไมโครเมตร ซึ่งลดลงและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อหยุดให้สาร 14 และ 28 วันพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีน 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวมีความหนาของชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูกหนา = 546.67 .± 134.38 และ 634.45 ± 170.19 ไมโครเมตรตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละ 99.96 และ 100.35 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 5)

ตารางที่ 4. ความหนาของชั้นเอนโดรมีเทรียมในมดลูกของหนูที่ไรับอะทราซีน หลังหยุดให้สารอะทราซีน 14 และ 28 วัน

สารอะทราซีน (มก /100 ก. นน.ตัว) N=6	ความหนาของชั้นเอนโดมีเทรียม (X±SE, ไมโครเมตร) /%		
	ขณะได้รับสาร	หลังหยุดให้สาร 14 วัน	หลังหยุดให้สาร 28 วัน
0	645.56±242.33 (100)	611.11±177.08 (100)	632.32±183.24 (100)
20	545.55±141.32* (84.50)	585.00±149.02NS (95.69)	631.94±166.16NS (99.96)
30	465.56±118.50* (72.12)	546.67±134.38* (89.46)	634.45±170.19NS (100.35)

N = จำนวนสัตว์ทดลอง; NS = ได้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม P > 0.05;

* =ได้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ P < 0.05



รูปที่ 5. มดลูกของหนูเม้าส์ตัดตามแนวขวาง (H&E, x400) แสดงชั้น myometrium (MY) และชั้น endometrium (EN) A; กลุ่มควบคุม พบชั้น endometrium หนาและมีต่อมมากมาย: B และ C ;กลุ่ม ได้รับอะทราซีน 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัวพบมีชั้น endometrium บางและมีต่อมน้อย

สรุปและวิจารณ์ผล

หนูกลุ่มได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัวมีการเปลี่ยนแปลงของวงอีสตรัส โดยมีระยะโปรอีสตรัสยาวขึ้น ส่วนระยะไดอีสตรัสสั้นลงอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ หรือคิดค่า proestrus index ได้สูงถึง 33.32 และ 35.11 % ขณะกลุ่มควบคุมมีค่า proestrus index = 18.40 % สามารถบ่งชี้การมีฮอร์โมนอีสโตรเจนสูงในเลือดในขณะนั้น (Eldridge et al.,1999; Cummings et al.,2000) แต่มีระดับไม่สูงถึงระดับสูงสุด (estrogen peak) จึงไม่สามารถมีผล positive feedback ต่อการหลั่ง LH ทำให้ไม่เกิด LH surge จึงไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ได้และไม่เข้าสู่ระยะอีสตรัส ทำให้ระยะโปรอีสตรัสยาวขึ้น ผลนี้ขัดแย้งกับการศึกษาของ Cooper et al. (1996) ซึ่งได้ให้อะทราซีน 15 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัว แก่หนูทดลองพันธุ์ Long Evan และพันธุ์ Sprague-Dawley ทางปากเป็นเวลา 21วันมีผลทำให้เกิดภาวะท้องเทียม ซึ่งเป็นภาวะมีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูง และถ้าให้ในขนาด 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้ไม่มีวงอีสตรัส แสดงถึงภาวะที่รังไข่ไม่ทำงาน แต่อย่างไรก็ตามผลของอะทราซีนต่อวงอีสตรัสเป็นผลชั่วคราวสามารถกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเมื่อหยุดให้สาร 14 วัน

เมื่อตรวจสอบจุลพยาธิสภาพของรังไข่พบว่ากลุ่มที่ได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัวมี prentral follicles และ corpus luteum ลดลง แต่ antral follicles เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะมีฟอลลิเคิลที่เสีย (atretic follicle) เพิ่มขึ้นถึง 1.75 และ 1.88 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Roa และ Kaliwal (2002) รายงานว่าอะทราซีนสามารถยับยั้งการหลั่ง LH surge ถ้าให้ในระยะโปรอีสตรัส ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พบจำนวน atretic follicle เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากกลุ่มที่ได้รับอะทราซีน มีไข่ที่โตพร้อมตกไข่แต่ไม่สามารถตกไข่จึงเสื่อมกลายเป็น atretic follicle ขณะเดียวกันจำนวน corpus luteum ก็ลดลงแสดงถึงมีการตกไข่ลดลง แต่เมื่อหยุดให้อะทราซีนเป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวน corpus luteum เพิ่มขึ้นและ atretic follicles ก็ลดลง แสดงให้เห็นว่าผลของ อะทราซีนต่อรังไข่เป็นผลชั่วคราว โดยเริ่มกลับคืนหลังหยุดให้สาร 14 วัน และกลับคืนเป็นปกติหลังหยุดให้สาร 28 วัน

ผลของอะทราซีนต่อเนื้อเยื่อของมดลูก พบว่าหนูกลุ่มได้รับอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักตัว มีชั้นเอนโดมีเทรียมของมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งๆที่ผลจากการตรวจวงอีสตรัสและจุลพยาธิสภาพของรังไข่บ่งชี้ว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอะทราซีนมีระดับอีสโตรเจนในเลือดสูง อาจเป็นไปได้ว่าการตอบสนองของมดลูกต่อฮอร์โมนอีสโตรเจนลดลง จากการศึกษาในทำนองเดียวกันนี้ในหนูแรทพบว่าอะทราซีนขนาด10-30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้น้ำหนักของมดลูกลดลง (Eldridge et al., 1994) และมีผลยับยั้งการสร้างอีสโตรเจนรีเซฟเตอร์ในมดลูก (Tezak et al., 1992: Mitak et al., 2002) จึงทำให้มดลูกตอบสนองต่อฮอร์โมนอีสโตรเจนลดลง ความหนาของมดลูกจึงลดลง

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าอะทราซีนขนาด 20 และ 30 มิลลิกรัม /100 กรัมน้ำหนักตัว ถ้าให้แก่หนูเม้าส์เป็นเวลา 28 วันมีผลทำให้วงอีสตรัสผิดปกติ โดยมีระยะโปรอีสตรัสยาวขึ้นแต่ระยะไดอีสตรัสสั้นลง ไม่มีการตกไข่และการตอบสนองของมดลูกต่อฮอร์โมนจากรังไข่ก็ลดลง โดยอะทราซีนทั้งสองขนาดที่ให้ได้ผลเหมือนกัน แสดงว่าเป็นผลแบบ non-dose dependent และผลดังกล่าวเป็นผลชั่วคราวสามารถกลับคืนหลังหยุดให้สาร 28 วัน ดังนั้นการที่คนและสัตว์ที่อาศัยในบริเวณที่มีการใช้สารอะทราซีนอาจได้รับผลทางอ้อมต่อระบบสืบพันธุ์และการเจริญพันธุ์ของเพศเมียซึ่งทำให้เป็นหมันชั่วคราวได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

รังสิต สุวรรณเขต.2533 **สารกำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช**.ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 62-70.

มนต์ชัย ดวงจินดา. 2544. **การใช้โปรแกรม SAS เพื่อวิเคราะห์งานวิจัยทางสัตว์** พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์คลังนานา ขอนแก่น.

อำพา เหลืองภิรมย์ และ ทัศนีย์ภรณ์ จันทร์ศรจักร 2008. ผลของสารอะทราซีนต่อการสร้างสเปริม์ของหนูเม้าส์. **ว.วิทย.มข**.36 (suplement):44-50.

ATSDR.2006. Blackground information for atrazine and deethyatrazine, Allanta: GA; **Agency for Toxic Substance and Disease Registry.**

Baligal, P.N. and Kaliwal. B.B.2001 Induction of gonadal toxicity of female rats after chronic exposure to mancozeb. **Indust Health** 39:235-243.

Cooper, R.L., Goldman, J.M. and Vandenbergh, J.G. 1993.Monitoring of the estorus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In: **Methods in toxicology female reproductive toxicology**. J.J. Heindel and R.E. Chapin (Eds), vol. 3,pp. 57-58. Academic Press, San Diego.

Cooper, R.L., Stoker, T.E.and Mcelroy, W.K. 2000. Effect of atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. **J Toxicol Sci** 53:297-307.

Cooper, R.L. Laws, S.C., Das P.C., Narotsky, M.G., Goldman, J.M., Tyrey, E.L. and Stoker, T.E. 2007. Atrazine and reproduction function: Mode and mechanism of action studies. **Wiley Inter Science**. 80:98-112.

Cummings, R.L., Rhodes,B.E. and Cooper, R.L. 2000. Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in four strains of rats. **J Toxicol Sci** 58:135-143.

Eldridge, J.C., Fleenore-Heyser, D.G., Extron,P.C. and Wezel, L.T.1994 Short trem effects of chlorotriazines on estrus in Sprague-Dawly ans Fischer 344 rats. **J Toxicol Environ Health** 43:155-167.

Eldridge, J.C., Wetzel, L.T. and Tyrey, L. 1999. Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine adminitration. **J Environ Health Perspect** 104:491-499.

Laws, S. Ferrell, T.M., Stokers, T.E.and Cooper,R.L.2003Pubertal develoment in female Wistarrats following exposure to propazineand atrazine biotranformation by products, diamino- S-chlorotriazine. **Toxicol Sci** 76:190-200.

Mitak, M., Goimerac, T., Cvertila, D. and Cvetnic, Z. 2002. Effect of atrazine and zearalenone on the number of receptor binding sites for 3 H-estradiol in therat uterus cytosol. **Original Paper** 47:12-16.

Pederson, T. and Pete, H. 1968. A proposal for classification of follicles in the mouse ovary. **J Reprod Fert** 73: 261-270.

Roa, P. and Kaliwal, B. 2002. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. **J Indust Health** 40: 237-244.

Rodriguez, V.M., Thiruchelvan, M. and Cory-Slechta, A. 2005. Sustained exposure to the wildly used herbicide atrazine: Altered function and loss of neurons in brain monomine systems. **Environ Health Perspect** 113(6): 708-711.

Rosenberg, B.G., Chen,H., Folmer, J., Liu, J. Papadopoulos, V. and Zirkin, B.R. 2005. Gestational exposure to atrazine : Effect on the postnatal development of male off spring. **J Androl** 29(3): 304-311.

Simic, B., Knielwald, J. and Knielwald, Z.2006. Effect of atrazine on reproductive performance in the rat. **J Appl Toxicol** 14(6): 401-404.

Spiteri, I.D., Guillette, L.J. and Crain, D.A.1999. The functional and obsevation of the neonatal reproductive system of alligators exposed in ovo to atrazine, 2,4-D or estradiol. **Toxicol Indust Health** 15(1-2): 181-186.

Stoker, T.E, Laws, S.C., Guicidi, D.L. and Cooper, R.L. 2000. The effect of atrazine on puberty in the male Wistar rats: An evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicol Sci** 58: 50-59.

Stoker, T.E., Jeffay,S.C., Zucker, R.M., Cooper, R.L. and Perreault, S.D. 2003. Abnormal fertilization is responsible for reduced fecundity following thiram-induced ovulatory delay in the rat. **J Biol Reprod** 68: 2142-2149.

Tezak, Z., Simic, B. and Kniewald, J. 1992. Effect of pesticides on oestradiol-receptor complex formation in rat uterus cytosol. **J Chem Toxicol** 30: 879-881.

Toppari, Y., Yoshida, A., Nakagawa, S., Hama, T. and Mayumi, T. 1996. Effect of Bredium on early embryonic development in rats. **Bull Biol Phramacol**. 16: 133-136.

Trentacoste, S.V., Friendman, A.S., Younger, R.T., Breckenridge, C.B. and Zirkin, B.R.2001. Atrazine effect on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in pubertal male rats. **J Androl** 22(1): 142-148.

Wilhelm, W., Fitzpatrick, K.F., Scanges, C.G. and Anderson,L.L. 2006. Effect of atrazine on circulating reproductive hormones and gonadal histology in young japanese quail. **Arch Environ Contam Toxicol** 51(1): 117-122.

World Health Organization. 1984. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Environmental Health Criteria** Geneva, Finland.