บทที่ 3
ผลการวิจัยและวิจารณ์
(Results and Discussion)

<u>การทดลองที่ 1</u> ปริมาณโปรตีนของคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

3.1 จำนวนของคอร์ปัส ลูเทียมในช่วงวงรอบการเป็นสัด

ลักษณะทั่วไปของแพะที่เข้าการทดลองมีระดับคะแนนของร่างกาย (body condition score; BCS) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และจากข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนาการของคอร์ปัส-ลูเทียมบนรังไข่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจำนวน CH ในกลุ่มแพะที่ใช้ PMSG ที่เวลา 72 และ96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.00 ± 0.52 และ3.33 ± 0.56 ตามลำดับเปรียบเทียบกับ CH ในกลุ่มของแพะที่ให้ FSH ที่เวลา 72 และ96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.17 ± 0.48 และ1.33 ± 0.42 ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน CH ในกลุ่มแพะที่ใช้ PMSG และ FSH ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามในส่วนของจำนวน CL ในกลุ่มของแพะที่ให้ PMSG และFSH ที่เวลา 24ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.00 ± 0.00 และ1.00 ± 0.37 ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน CL ในกลุ่มแพะที่ใช้ PMSG และ FSH ที่เวลา 48, 72 และ96 ชั่วโมง ภายหลังมีการตกไข่ (ตารางที่ 3)

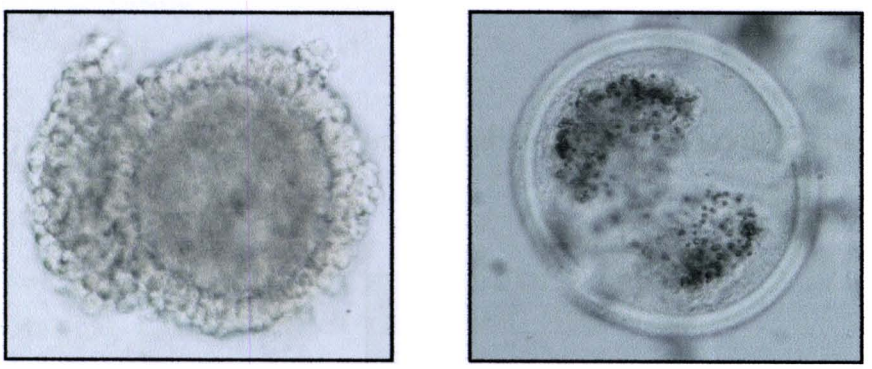
จากการทดลองในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า PMSG และ FSH สามารถกระตุ้นเพิ่มตกไข่ได้ โดยดูจากจำนวนของ CH มากกว่า 1 โดยเริ่มตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 72 (วันที่ 3) เป็นต้นไป นอกจากนี้ กลุ่มแพะทรีทเมนท์ที่ 1 (ฉีด PMSG) มีการตกไข่มากกว่ากลุ่มแพะทรีทเมนท์ที่ 2 (ฉีด FSH) สอดคล้องกับ Saharrea et al. (1998) รายงานว่าการใช้ PMSG สามารถกระตุ้นเพิ่มตกไข่หลายฟอง และมีโอกาสในการเกิด premature luteolysis ขึ้น อัตราการตกไข่จึงสูงกว่าการใช้ FSH ในการกระตุ้นซึ่งมีโอกาสเกิด premature luteolysis น้อยกว่า

ตารางที่ 3 ผลของการใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่แตกต่างกันต่อจำนวนของคอร์ปัส ลูเทียม (CL) คอร์ปัส เฮโมราจิคาร์ (CH) ของแพะพื้นเมืองไทย ภายหลังการตกไข่

ช่วงเวลา	14 วัน CIDR + PMSG	14 วัน CIDR + FSH	P-value
CH at 24 h	0.83 ± 0.17	0.67 ± 0.33	0.67
CH at 48 h	2.17 ± 0.40	1.00 ± 0.63	0.23
CH at 72 h	3.00 ± 0.52[a]	1.17 ± 0.48[b]	0.03
CH at 96 h	3.33 ± 0.56[a]	1.33 ± 0.42[b]	0.03
CL at 24 h	0.00 ± 0.00[b]	1.00 ± 0.37[a]	0.04
CL at 48 h	0.83 ± 0.17	1.50 ± 0.62	0.55
CL at 72 h	2.17 ± 0.40	2.17 ± 0.83	0.90
CL at 96 h	3.33 ± 0.49	2.50 ± 0.89	0.67

[a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถว และคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3.2 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง



(a) โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี (b) โอโอไซต์คุณภาพปานกลาง

ภาพที่ 7 (a) แสดงลักษณะโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี (b) แสดงลักษณะโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง

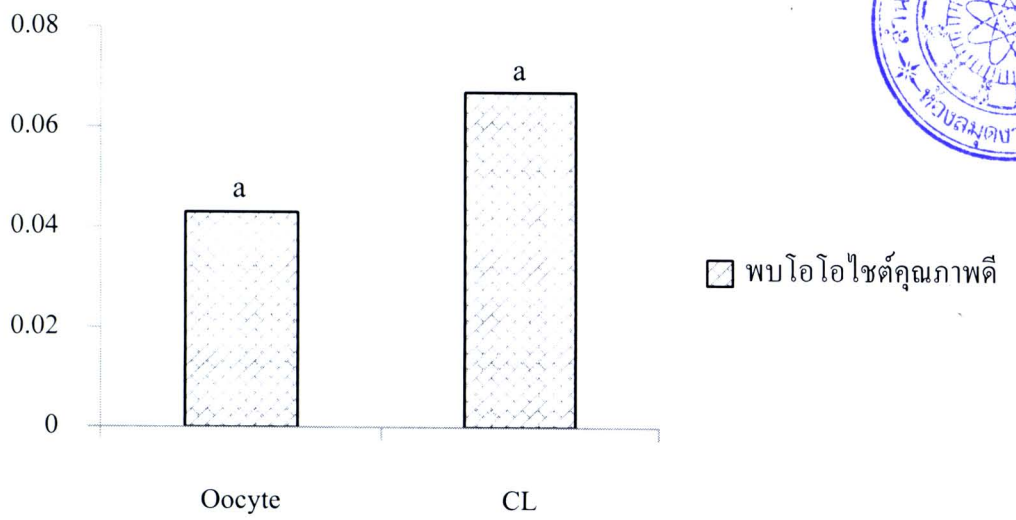
3.2.1 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี และโอโอไซต์ที่มีคุณภาพปานกลาง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า กลุ่มโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.045±0.012 ไมโครกรัมต่อโอโอไซต์ และโอโอไซต์ที่มีคุณปานกลางมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.029±0.009 ไมโครกรัมต่อโอโอไซต์

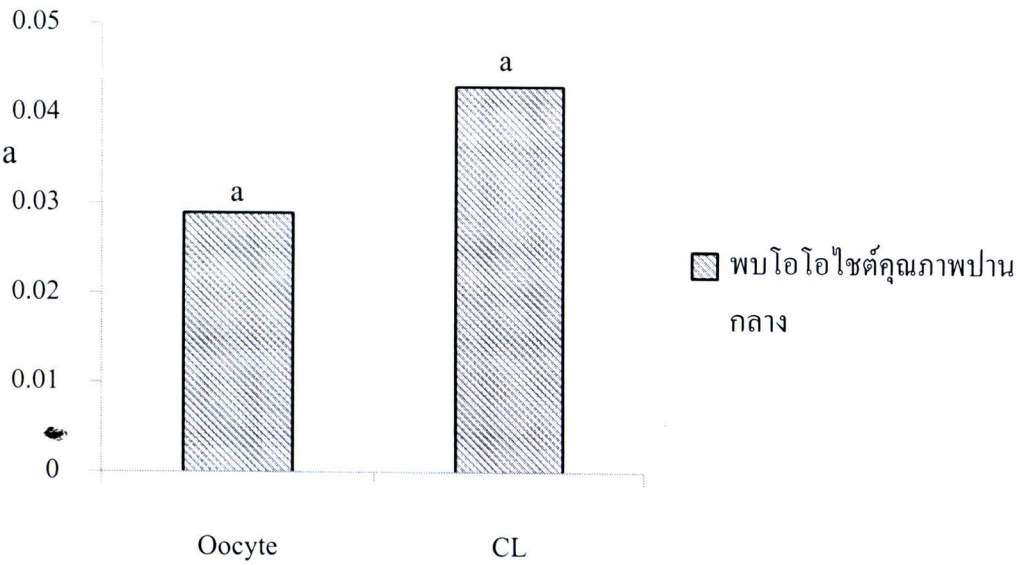
3.2.2 ปริมาณโปรตีนของคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า โปรตีนของ CL หลังมีการตกไข่และพบโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.067±0.006 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครกรัมและโปรตีนของ CL หลังมีการตกไข่ และพบโอโอไซต์ที่มีคุณภาพปานกลางมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 0.043±0.005 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครกรัม

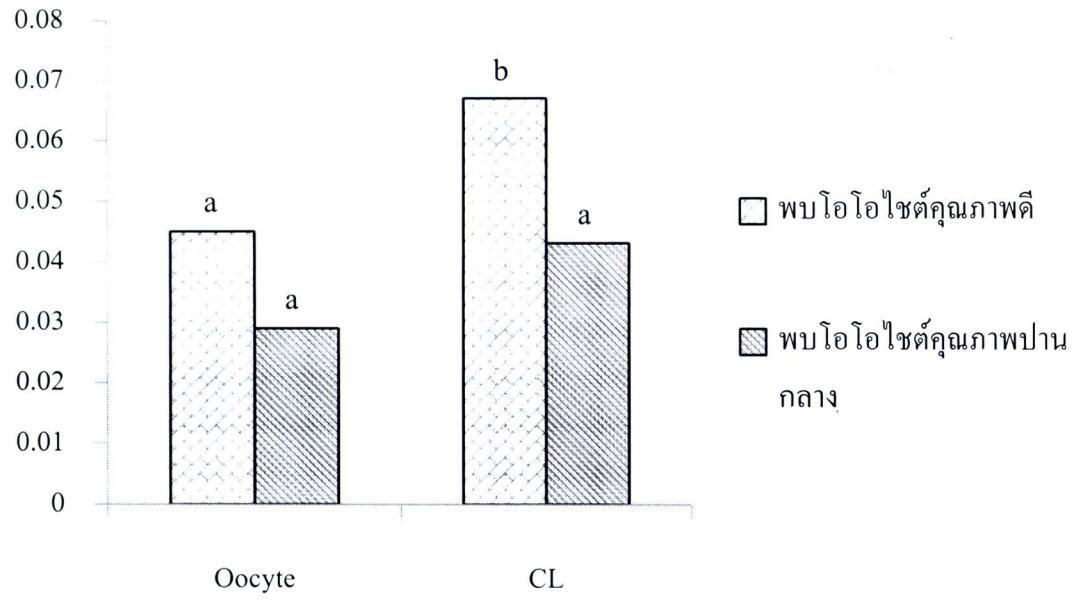
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 8 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี



ภาพที่ 9 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง



[a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแท่งกราฟลวดลายเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ภาพที่ 10 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลางที่ และ คอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

จากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี พบว่า ปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 8) เช่นเดียวกับปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง พบว่าปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 9) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของโปรตีนจาก CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดีมากกว่าปริมาณของโปรตีนจาก CL ที่จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง ($P<0.01$) (ภาพที่ 10)

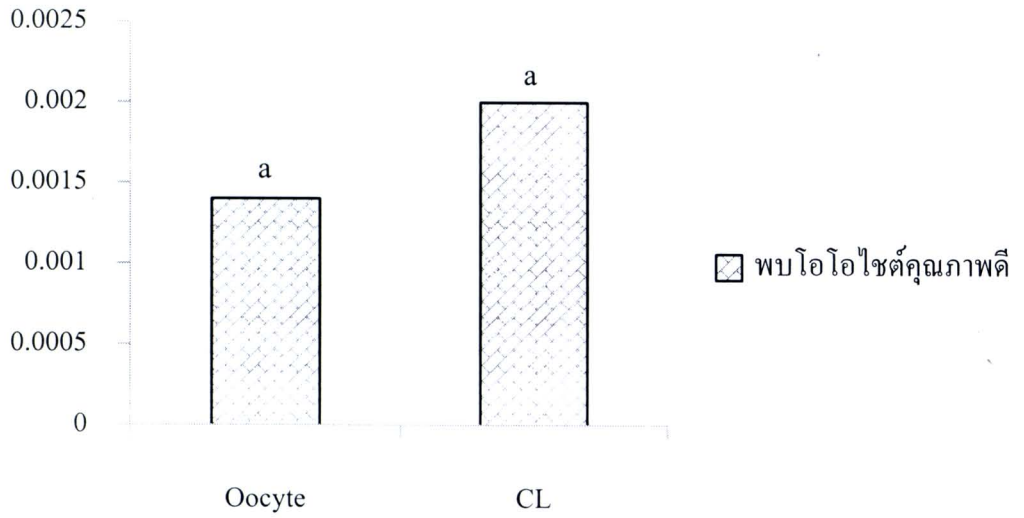
3.3 ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

3.3.1 ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี และโอโอไซต์ที่มีคุณภาพปานกลาง

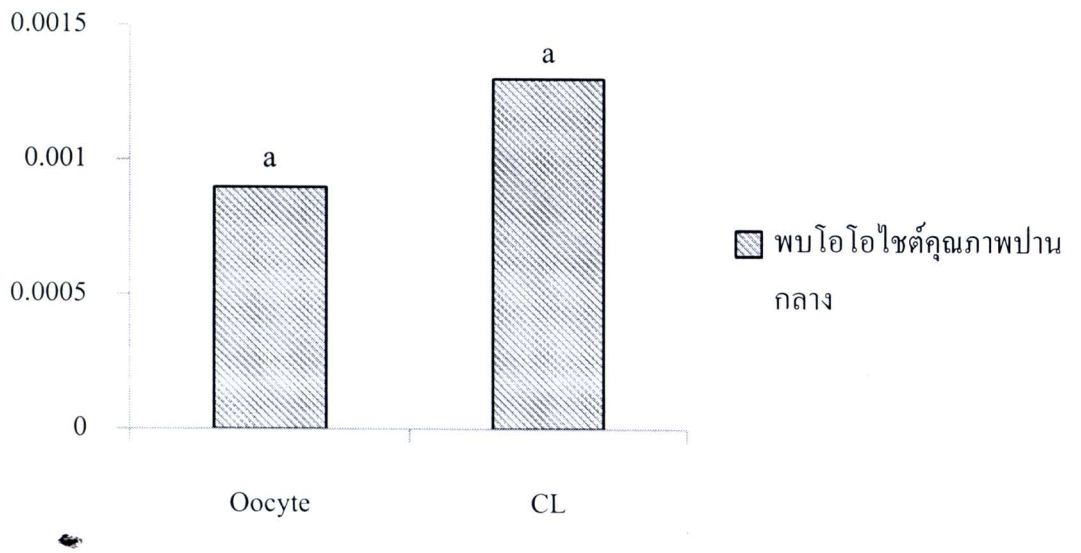
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า กลุ่มโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 0.0014±0.0003 ไมโครกรัมต่อโอโอไซต์ และโอโอไซต์ที่มีคุณปานกลางมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 0.0009±0.0002 ไมโครกรัมต่อโอโอไซต์

3.3.2 ปริมาณดีเอ็นเอของคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

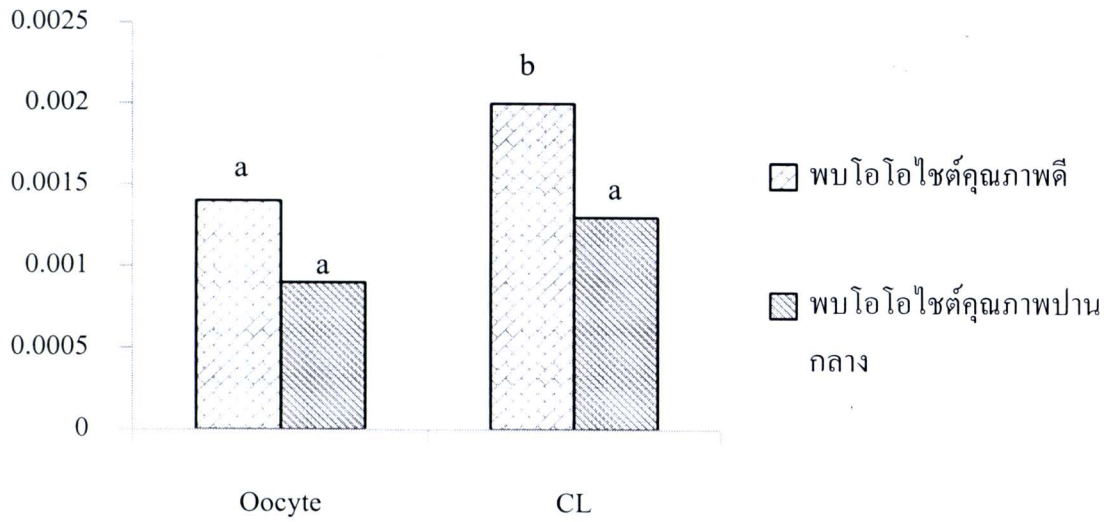
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดีมีค่าเฉลี่ย 0.0020±0.0002 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครกรัม และปริมาณดีเอ็นเอของ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลางมีค่าเฉลี่ย 0.0013±0.0002 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครกรัม



ภาพที่ 11 ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี



ภาพที่ 12 ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง



[a, b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแท่งกราฟลวดลายเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ภาพที่ 13 ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง และ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง

จากการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 11) เช่นเดียวกับปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์และ CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลางพบว่าปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 12) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของดีเอ็นเอจาก CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดีมากกว่าปริมาณของดีเอ็นเอจาก CL จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง ($P<0.05$) (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 4 การเพิ่มขนาดของโอโอไซต์และคอร์ปัส ลูเทียม จากปริมาณดีเอ็นเอและโปรตีนรวมทั้งสัดส่วนโปรตีนต่อ ดีเอ็นเอ

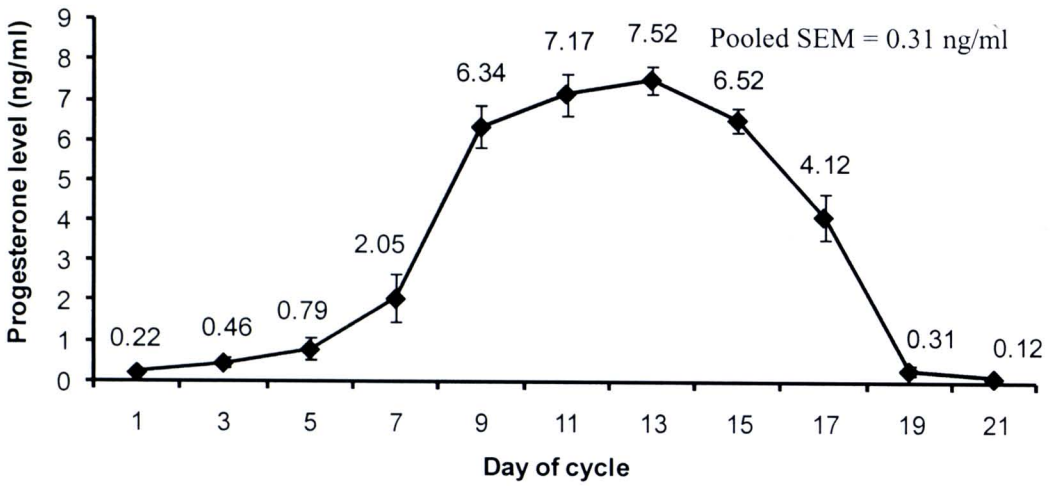
กลุ่มการทดลอง	โปรตีน (ไมโครกรัม)		ดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม)		โปรตีนต่อดีเอ็นเอ	
	Oocyte	CL	Oocyte	CL	Oocyte	CL
โอโอไซต์คุณภาพดี	0.045[a]	0.067[b]	0.0014[a]	0.0020[b]	33.388[a]	33.541[a]
โอโอไซต์คุณภาพปานกลาง	0.029[a]	0.043[a]	0.0009[a]	0.0013[a]	32.948[a]	33.519[a]

[ab]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (โปรตีนและดีเอ็นเอ $P<0.001$ และ $P<0.05$ ตามลำดับ)

สัดส่วนระหว่างโปรตีนต่อดีเอ็นเอในกลุ่มโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี และคอร์ปัส ลูเทียมจากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 33.39±0.33 และ 33.54±0.14 ในขณะที่สัดส่วนระหว่างโปรตีนต่อดีเอ็นเอในกลุ่มโอโอไซต์ที่มีคุณภาพปานกลาง และคอร์ปัส ลูเทียมจากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 32.95±0.55 และ 33.55±0.34 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสัดส่วนโปรตีนต่อดีเอ็นเอระหว่าง โอโอไซต์ และ CL พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 4)

3.4 การศึกษาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในช่วงวงรอบการเป็นสัด

ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (P4) ในซีรั่มของแพะในวงรอบของการเป็นสัดวันที่ 0 ถึงวันที่ 21 ของแพะทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบว่ามีความสอดคล้องกันกับการพัฒนาของฟอลลิเคิลในช่วง follicular phase และ lueteal phase ในช่วงที่ไม่มีการตั้งท้องเกิดขึ้น



ภาพที่ 14 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในช่วงวงรอบการเป็นสัด

ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในช่วงวงรอบการเป็นสัดสรุปไว้ดัง ภาพที่ 14 ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (P4) มีระดับต่ำใน 5 วันแรกของวงรอบการเป็นสัดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5±0.2 ng/ml ฮอร์โมน P4 จะมีความเข้มข้นสูงขึ้นในวันที่ 6, 7, 8, 9,10, 11 และสูงสุดในวันที่ 13 (7.52 ng/ml)ของวงรอบการเป็นสัด บ่งบอกถึงมีการเจริญและพัฒนาของ CL เกิดขึ้น ฮอร์โมน P4 มีความเข้มข้นลดลงในวันที่ 14, 15, 16, 17, 18 และมีค่าน้อยกว่า 1 ng/ml ในวันที่19, 20, และต่ำที่สุดในวันที่ 21 (0.12 ng/ml) การลดลงของความเข้มข้นของ ฮอร์โมน P4 เป็นผลมาจาก เกิดการเสื่อมสะลายของ CL จากผลของระดับความเข้มข้นของ P4 ในช่วงวงรอบการเป็น

สัดของแพะพื้นเมืองไทย พบว่าผลที่ได้เหมือนและสอดคล้องกับงานของ Zarkawi and Soukouti, (2001) ที่มีการทดลองวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในแพะพันธุ์ West African Dwarf และพันธุ์ indigenous กล่าวโดยสรุปในงานทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าระยะ lueteal phase มีช่วงเวลาที่ยาวนานกว่าระยะ follicular phase ในช่วงเวลาของวงรอบการเป็นสัดในแพะพื้นเมืองไทยเพศเมียที่มีวงรอบการเป็นสัดที่ปรกติ

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวน CL, จำนวนลูกและรกกับหลอดเลือดและความหนาแน่นของหลอดเลือดในระหว่างการตั้งท้อง

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักรกและจำนวนคอร์ปัส ลูเทียมของแม่แพะพื้นเมืองไทยที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว สองตัว และสามตัว ในวันที่ 65 และ 130 ของการตั้งท้อง

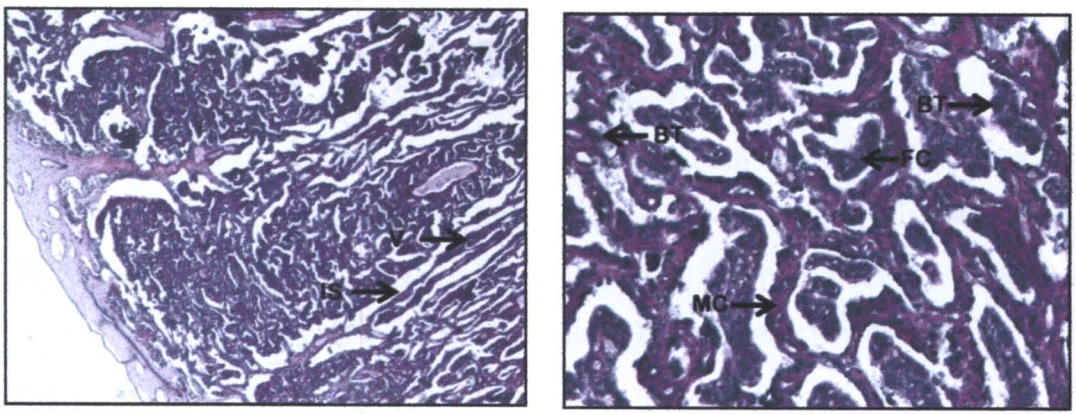
ผลการศึกษาพบว่าแม่แพะที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว (single pregnancy) ในวันที่ 65 และ 130 มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรก (placenta) เท่ากับ 800 และ 2,800 กรัม ตามลำดับ และตรวจพบ 1 CL บนรังไข่ ส่วนแม่แพะที่ตั้งท้องลูกสองตัว (twin pregnancy) ที่ 65 และ 130 วัน ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรกเท่ากับ 839 และ 3,625 ตามลำดับ ตรวจพบ 2 CL บนรังไข่ และในแม่แพะที่ตั้งท้องลูกสามตัว (triplet pregnancy) มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรก วันที่ 130 มีค่าเท่ากับ 4,280 กรัม ตรวจพบ 3 CL บนรังไข่ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 น้ำหนักรกและจำนวนคอร์ปัส ลูเทียมของแม่แพะพื้นเมืองไทยที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว สองตัว และสามตัวในวันที่ 65 และ 130 ของการตั้งท้อง

Treatment	Placental weight (g)	No. CL
SP		1
65 วัน	800	
130 วัน	2,800	
TP		2
65 วัน	839	
130 วัน	3,625	
TrP		3
130 วัน	4,280	

SP = single pregnancy, TP = twin pregnancy, TrP = triplet pregnancy

3.6 การศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อรกแพะพื้นเมืองไทย



a b

ภาพที่ 15 สัณฐานวิทยาเนื้อเยื่อ placentome ของแม่แพะพื้นเมืองไทย (a) 100X (b) 200X

หมายเหตุ: V = Villi, IS = Intervillous space, BT = Binucleate trophoblast, MC = Marternal compartment, FC = Fetal compartment

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 6 การศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย จำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ในเนื้อเยื่อรก

ค่าที่ต้องการศึกษา	สูตรคำนวณ
CAD[1]	
ความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย (total capillary area/ unit of tissue area) (พื้นที่หลอดเลือดฝอยทั้งหมด/ พื้นที่เนื้อเยื่อ)	= 11271950.5 μm^2 / 21682741.5 μm^2 x 100
(Reynolds et al., 2005; Vonnahme et al., 2003)	= 51.99 %
CND[2]	
จำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ Number of capillary/ unit of tissue area (จำนวนของหลอดเลือดฝอย/ พื้นที่เนื้อเยื่อ)	= 20 capillary / 21682741.5 μm^2
(Reynolds et al., 2005)	= 9.2×10^5 capillary/ μm^2

[1]Capillary Area Density
[2]Capillary Number Density

จากการศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อรก โดยการย้อมสีสไลด์ด้วยสี Periodic Chiff stain (PAS) พบว่าเนื้อเยื่อ placentome มีหลอดเลือดจำนวนมาก พบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย capillary area density (CAD) ในเนื้อเยื่อรก มีค่าเท่ากับ $9.2x10^5$ capillary/ μm^2 ซึ่งจากการศึกษาของ Redmer et al. (2009) รายงานว่าเนื้อเยื่อคารันเคิลที่เป็นส่วนประกอบของรกของแม่แกะวันที่ 130 ของการตั้งท้อง พบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย มีค่าเท่ากับ $1795 x10^6$ ในขณะที่จำนวนหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ capillary number density (CND) ในเนื้อเยื่อรกของแพะพื้นเมืองไทยที่ตั้งท้องในวันที่ 130 วัน มีค่าเท่ากับ 51.99 % ซึ่งจากการศึกษาของ Redmer et al. (2009) รายงานว่าเนื้อเยื่อคารันเคิลที่อยู่ในรกของแม่แกะวันที่ 130 ของการตั้งท้องมีค่าจำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ (capillary area density; %) เท่ากับ 40.7 %

Bell et al. (1999) ทำการศึกษาการขนส่งอาหารผ่านรกและการเจริญของตัวอ่อนฟีตัส พบว่าพัฒนาการของรกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงต้นถึงช่วงกลางของการตั้งท้อง ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนในช่วงปลายของการตั้งท้อง ซึ่งรกที่มีพัฒนาการต่ำจะมีศักยภาพในการขนส่งออกซิเจน กลูโคส และกรดอะมิโนต่างๆ ลดลง การขนส่งออกซิเจนถูกจำกัดด้วยอัตราการไหลของเลือด แต่การขนส่งกลูโคส และกรดอะมิโนถูกกำหนดโดยจำนวนและการทำงานของโปรตีนที่ช่วยในการขนส่งบางชนิด (specific transport proteins) นอกจากนี้ Fowden et al. (2006) กล่าวว่าความสามารถในการขนส่งสารอาหารผ่านรกขึ้นกับขนาด สัณฐานวิทยา การขนส่งเลือด และปริมาณของ transporter ของรก ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะส่งผลต่อการสังเคราะห์และเมแทบอลิซึมของสารอาหารและฮอร์โมนของเนื้อเยื่อมดลูก-รก ซึ่งการควบคุมศักยภาพในการขนส่งสารอาหารผ่านรกผ่าน programming effect ทางโภชนาการและกลูโคคอร์ติคอยด์ รวมทั้ง IGF2 gene