



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของการพัฒนาคอร์ปัส
ลูเทียมในระบบสืบพันธุ์แพะพื้นเมืองไทย

Molecular reproductive biology of corpus
luteum development in Thai-native goat



ผศ. นสพ. สุวิทย์ อุปสัย และคณะ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553



248977



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของการพัฒนาคอร์ปัส ลูเทียมในระบบสืบพันธุ์แพะพื้นเมืองไทย

Molecular reproductive biology of corpus luteum development in Thai-native goat

คณะผู้วิจัย

สุวิทย์	อุปสัย
ธีระ	ฤทธิรอด
ไชยณรงค์	นาวานุเคราะห์
จิรัฐติ	ธรรมศิริ
ทศพล	มูลมณี

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงต่อสำนักบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ในห้องปฏิบัติการ และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาในการปฏิบัติงาน และคอกสัตว์ทดลองของหมวดโคเนื้อ สุดท้ายขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโทที่มีส่วนร่วมสนับสนุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ให้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน พ.ศ. 2554

การศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของการพัฒนาคอร์ปัส ลูเทียมในระบบสืบพันธุ์แพะพื้นเมืองไทย

สุวิทย์ อุปสัย¹, ชีระ ฤทธิรอด², ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์³, จิรัฐติ ธรรมศิริ³,

และ ทศพล มุลมณี³

248977

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อศึกษา 1) สังเคราะห์องค์ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลของคอร์ปัส ลูเทียม (CL) โดยการศึกษาการพัฒนาของ CL ในช่วงวงจรการเป็นสัด โดยศึกษาผลของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน (P4) สังเคราะห์ 14 วันร่วมกับการใช้ฮอร์โมน PMSG เปรียบเทียบกับ FSH วิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน คีเอ็นเอ และสัดส่วนโปรตีนต่อคีเอ็นเอ ของโอโอไซต์ และ CL 2) ความสัมพันธ์ของจำนวน CL จำนวนลูกและรก (พลาเซนทา) กับหลอดเลือดและความหนาแน่น ของหลอดเลือดในระหว่างการจัดท้อง

การทดลองที่ 1 ใช้แพะพื้นเมืองไทยยังไม่เคยตั้งท้อง จำนวน 12 ตัว อายุ 7 เดือนขึ้นไป สุ่ม สัตว์เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ฮอร์โมน P4 สังเคราะห์ร่วมกับฮอร์โมน PMSG หรือ FSH จาก การศึกษาพบว่าจำนวนคอร์ปัส เฮโมเรจิกัม (CH) ในกลุ่มของแพะที่ให้ PMSG ที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 3.00 ± 0.52 และ 3.33 ± 0.56 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับในกลุ่มของแพะที่ให้ FSH ที่เวลา 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 1.17 ± 0.48 และ 1.33 ± 0.42 ($P < 0.05$) ปริมาณโปรตีนและคีเอ็นเอของโอโอ ไซต์คุณภาพดีและโอโอไซต์คุณภาพปานกลางไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีน ของ CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพดี (0.067 ± 0.006) มากกว่า ($P < 0.01$) CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง (0.043 ± 0.005) ในขณะที่ปริมาณคีเอ็นเอของ CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพดี (0.002 ± 0.0002) มากกว่า ($P < 0.05$) CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง (0.0013 ± 0.0002) สัดส่วนของโปรตีนต่อคีเอ็นเอของ CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพดีไม่แตกต่างกับ CL ที่มีโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง ($P > 0.05$) ความเข้มข้น ของฮอร์โมน P4 มีระดับต่ำใน 5 วันแรกของวงจรการเป็นสัดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ± 0.2 ng/ml ฮอร์โมน P4 จะมีความเข้มข้นสูงขึ้นในวันที่ 6, 7, 8, 9, 10, 11 และสูงสุดในวันที่ 13 (7.52 ng/ml) ของ วงจรการเป็นสัด บ่งบอกถึงมีการเจริญและพัฒนาของ CL เกิดขึ้น ฮอร์โมน P4 มีความเข้มข้นลดลง ในวันที่ 14, 15, 16, 17, 18 และมีค่าน้อยกว่า 1 ng/ml ในวันที่ 19, 20, และต่ำที่สุดในวันที่ 21 (0.12 ng/ml) การลดลงของ ฮอร์โมน P4 เป็นผลมาจากการเสื่อมสลายของ CL

การทดลองที่ 2 ใช้แพะพื้นเมืองไทยตั้งท้องแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. แพะท้องตัวเดียว single pregnancy (SP) 2. แพะท้องสองตัว twin pregnancy (TP) 3. แพะท้องสามตัว triplet pregnancy (TrP) ผลการศึกษาพบว่ากลุ่ม SP ที่ 65 และ 130 วัน มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักพลาเซนทา เท่ากับ 800 และ 2,800 กรัม ตามลำดับและพบ 1 CL บนรังไข่ กลุ่ม TP ที่ 65 และ 130 วัน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักพลาเซนทา

248977

เท่ากับ 839 และ 3,625 กรัม ตามลำดับและพบ 2 CL บนรังไข่และในกลุ่ม TrP มีค่าน้ำหนักเฉลี่ย
 พลาเซนทา ที่ 130 วัน เท่ากับ 4,280 กรัม และพบ 3 CL บนรังไข่ น้ำหนักพลาเซนทา จะเพิ่มขึ้นตาม
 จำนวนวันในการตั้งท้องและพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนลูกและจำนวน CL ที่พบ จากการ
 ทดลองทั้งสองสรุปได้ว่า CL มีการพัฒนาที่รวดเร็วมากในวงจรการเป็นสัด และมีความสัมพันธ์กับ
 จำนวนลูก และหลอดเลือดที่มาหล่อเลี้ยงเพื่อรักษาสภาพการตั้งท้อง

คำสำคัญ: คอรัสปีส ดูเทียม ชีววิทยาการสืบพันธุ์ แพะพื้นเมืองไทย

¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

² คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

³ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

* ผู้รับผิดชอบงานวิจัยหลัก : suwuop@kku.ac.th

Molecular reproductive biology of corpus luteum development in Thai-native goat

Suwit Uopasai^{1*}, Theera Rittitod², Chainarong Navanukraw³, Jiratti Thammasiri³,
and Tossapol Moonmancee³

ABSTRACT

248977

The aims of the research were to 1) determine growth and development of corpus luteum (CL) in Thai-native goat throughout the estrous cycle focusing on effect of synthetic progesterone (P4) with PMSG or FSH and quantitative protein and DNA analyses of oocyte and CL observed on the ratio of the protein and DNA 2) determine the relationship between capillary number density and capillary area density in placenta during pregnancy.

Experiment 1. Non pregnant Thai-native goats (n=12), 7 months of age, were randomly assigned for estrous synchronization and superovulation protocols (progesterone 14 days + PMSG vs. progesterone 14 days + FSH). Numbers of corpus hemorrhagica (CH) in PMSG group at 72 and 96 h were 3.00 ± 0.52 and 3.33 ± 0.56 , respectively while numbers of CH in FSH group at 72 and 96 h were 1.17 ± 0.48 and 1.33 ± 0.42 , respectively. Total protein and DNA contents of the good and fair quality of oocytes were not significantly different ($P > 0.05$). However, the protein contents of CL with the good quality of oocytes (0.067 ± 0.006) were significantly ($P < 0.001$) greater than that of the CL with fair quality of oocytes (0.043 ± 0.005). While the DNA contents of CL with the good quality of oocytes (0.002 ± 0.0002) were greater ($P > 0.05$) than that of the CL with fair quality of oocytes (0.0013 ± 0.0002). No significant difference in the ratio of protein and DNA content between CL with good and fair quality of the oocyte was observed. The P4 concentration was low during the first 5 days of the estrous cycle by which the average concentration was 0.5 ± 0.2 ng/ml. The P4 concentrations were increased on day 6, 7, 8, 9, 10, 11 and higher on day 13 which was 7.52 ng/ml, due to the presence of the mature CL. The P4 concentrations were decreased on day 14, 15, 16, 17, 18, and less than 1 ng/ml by day 19, 20, and lower on day 21 which was 0.12 ng/ml, due to presence of the regression of CL.

Experiment 2. Pregnant Thai-native goats were randomly assigned to three group 1) group 1 single pregnancy (SP) 2) group 2 twin pregnancy (TP) 3) group 3 triplet pregnancy (TrP). For the single pregnancy, the average placental weight was 800 and 2,800 g on day 65 and 130 of gestation, with 1 CL. For the double pregnancy, the average placental weight was 839 and 3,628 g on day 65

248977

and 130 of gestation with 2 CL. For the triplet, the average placental weight was 4,280 g on day 130 of gestation with 3 CL. Weight of placenta increased significantly from day 65 to 130 of gestation. The relationship between CL numbers and vasculature was observed during pregnancy. Based on the results, CL development rapidly increased and changed throughout the estrous cycle and positively correlated with fetal number and vasculature to maintain gestation in goats.

Keywords: corpus luteum, reproductive biology, Thai-native goat

¹ Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, 40002

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, 40002

³ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, 40002

* Corresponding author: suwuop@kku.ac.th

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)	ก
บทคัดย่อภาษาไทย (Abstract)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	ง
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	ฉ
สารบัญตาราง (List of Tables)	ช
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.1 การพัฒนาของคอร์ปัส ลูเทียม	1
1.2 หน้าที่ของคอร์ปัส ลูเทียม	5
1.3 บทบาทของคอร์ปัส ลูเทียม ต่อการอยู่รอดของตัวอ่อน	6
2. ความสำคัญที่มาของโครงการวิจัย	8
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
4. ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
5. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	9
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
การทดลองที่ 1	11
การทดลองที่ 2	15
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์	17
การทดลองที่ 1	17
การทดลองที่ 2	24
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	33

สารบัญตาราง

(List of Tables)

ตารางที่	หน้า
1 ร้อยละของเซลล์ที่ต่างชนิดกันในคอร์ปัส ลูเทียมแพะจากการนับ 506 เซลล์	3
2 ผลของการผ่าตัดเอารังไข่และคอร์ปัส ลูเทียม ออกในระหว่างการตั้งท้องในแพะ	8
3 ผลของการใช้ฮอร์โมน โกลนาโดโทรปินที่แตกต่างกันต่อจำนวนของคอร์ปัส ลูเทียม (CL) คอร์ปัส เฮโมราจิการ์ (CH) ของแพะพื้นเมืองไทย ภายหลังการตกไข่	18
4 การเพิ่มขนาดของโอโอไซต์และคอร์ปัส ลูเทียม จากปริมาณดีเอ็นเอและโปรตีนรวมทั้งสัดส่วนโปรตีนต่อ ดีเอ็นเอ	22
5 น้ำหนักรกและจำนวนคอร์ปัส ลูเทียมของแม่แพะพื้นเมืองไทยที่ตั้งท้องลูกตัวเดียว สองตัว และสามตัวในวันที่ 65 และ 130 ของการตั้งท้อง	24
6 การศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย จำนวนของหลอดเลือดฝอยต่อหน่วยพื้นที่ในเนื้อเยื่อรก	25

สารบัญภาพ

(List of Illustrations)

ภาพที่	หน้า
1 การพัฒนาของ CL จากฟอลลิเคิล (Follicle)	2
2 ภาพถ่ายจากกล้อง electron microscope แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของ CL ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ที่ต่างชนิดกัน	4
3 ภาพ large luteal cell จากกล้อง electron microscope ที่กำลังขยาย 7,000 เท่า	4
4 ภาพ small luteal cell จากกล้อง electron microscope ที่กำลังขยาย 9,200 เท่า	4
5 คอร์ปัส ลูเทียมแพะในระหว่างวงจรการเป็นสัด	5
6 ภาพโปรแกรมการเหนี่ยวนำวงจรการเป็นสัด (a) ใช้ PMSG (b) ใช้ FSH	12
7 (a) แสดงลักษณะโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี (b) แสดงลักษณะโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง	18
8 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี	19
9 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพปานกลาง	19
10 ปริมาณโปรตีนของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง	20

11	ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์ คุณภาพดี	21
12	ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์ และคอร์ปัส ลูเทียม จากรังไข่ที่พบโอโอไซต์ คุณภาพปานกลาง	21
13	ปริมาณดีเอ็นเอของโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลางที่ และ CL จากรังไข่ ที่พบโอโอไซต์คุณภาพดี และคุณภาพปานกลาง	22
14	ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในช่วงวงจรการเป็นสัด	23
15	สัณฐานวิทยาเนื้อเยื่อ placentome ของแม่แพะพื้นเมืองไทย (a) 100X (b) 200X	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

(List of Abbreviations)

BCS	Body condition score
CH	Corpora haemorrhagica
CL	Corpus luteum
LLC	Large luteal cell
SLC	Small luteal cell
Ang	Angiopoietins
FSH	Follicle-stimulating hormone
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
P4	Progesterone
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropin
SAS	Statistical analysis system
CRD	Completely Randomized Design
EGF	Epidermal growth factor
IGF	Insulin like growth factor
°C	Degree celcius
CND	Capillary number density
CAD	Capillary area density
%	Percentage
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
IP ₃	Inositol triphosphate
DAG	Diacylglycerol
BSA	Bovine serum albumin