

บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์

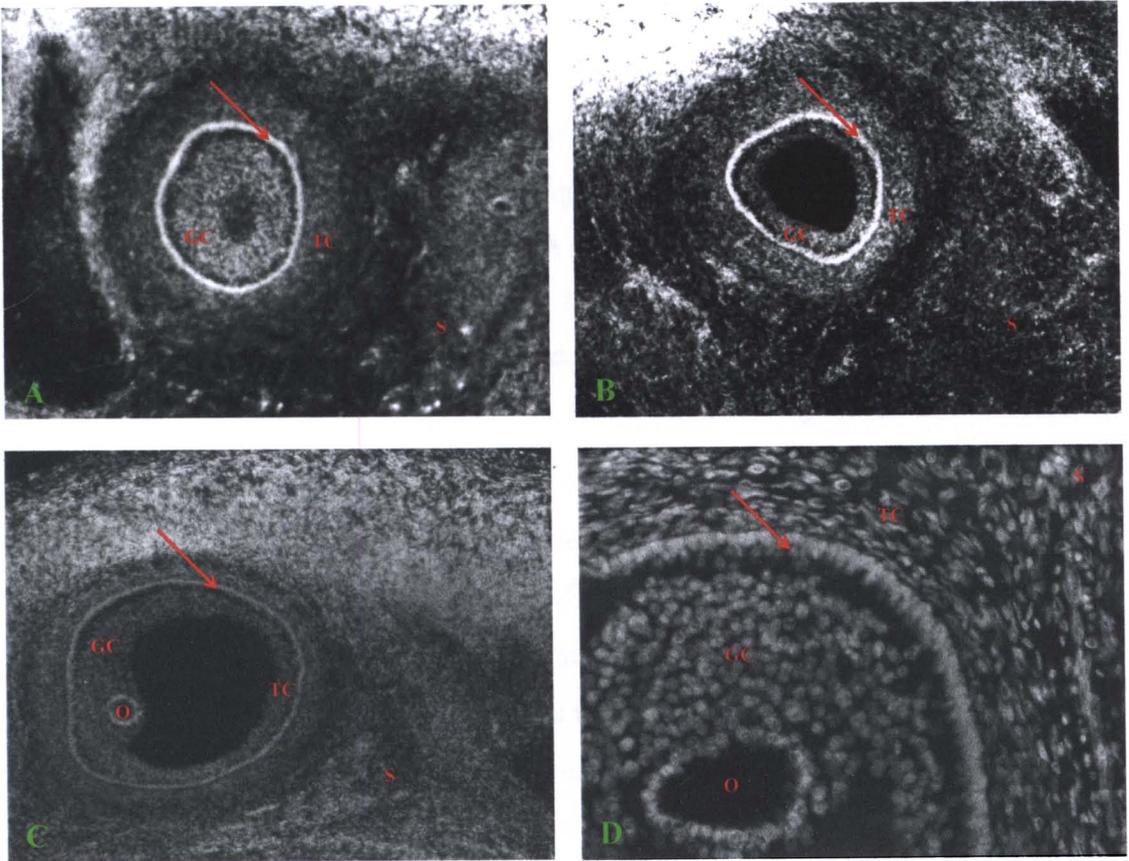
(Results and Discussion)

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย ได้ตามแผนการทดลอง ดังนี้

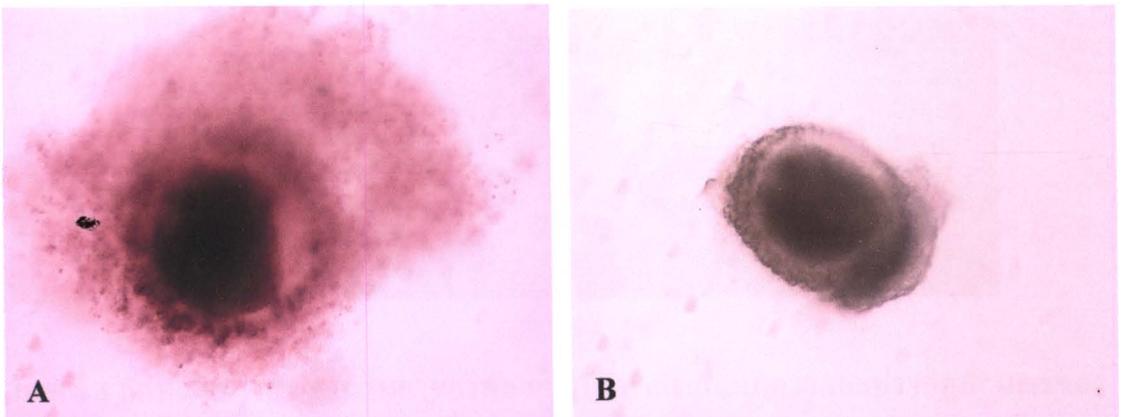
1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์

ลักษณะทั่วไปของแพะที่เข้าการทดลองมีระดับคะแนนของร่างกาย (body condition score; BCS) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) การพัฒนาของฟอลลิเคิลนั้นเริ่มจาก primordial follicle ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงแบนเพียงชั้นเดียวล้อมรอบภายใน (ภาพที่ 2A) โดยมีการพัฒนารูปร่างและสะสมโครงสร้างที่จำเป็นต่างๆ เป็นฟอลลิเคิลที่กำลังพัฒนาซึ่งประกอบด้วย primary follicle ที่มีชั้นกรานูโลซาเป็นรูปทรงเหลี่ยม (cuboidal cell) (ภาพที่ 2B) และ secondary follicle มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์กรานูโลซาเป็นเซลล์หลายๆ ชั้น ภายในมีโอโอไซต์ที่ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น หรือมากกว่า 2 ชั้น (ภาพที่ 2C, D)

ทำการประเมินคุณภาพของโอโอไซต์ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอไซต์ โดยพิจารณาจากชั้นของ cumulus cell ที่ล้อมรอบโอโอไซต์และไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ได้ดังนี้ โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี มีชั้นของ cumulus cell ล้อมรอบตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป และมีไซโตพลาสซึมเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 3A) และโอโอไซต์ที่ไม่สมบูรณ์ ไม่มีชั้นของ cumulus cell ล้อมรอบ หรือมีไซโตพลาสซึมบิดเบี้ยวไม่คงรูป (ภาพที่ 3B)



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์บนรังไข่ของแพะพื้นเมืองไทย ซึ่งมีฟอลลิเคิลในแต่ละระยะดังนี้ primordial follicle (A) primary follicle (B) และ secondary follicle (C, D) โดย GC คือ เซลล์กรานูโลซา TC คือ เซลล์ทีกา O คือ โอโอไซต์ S คือ ชั้น Stroma และหัวลูกศรแสดง basement membrane

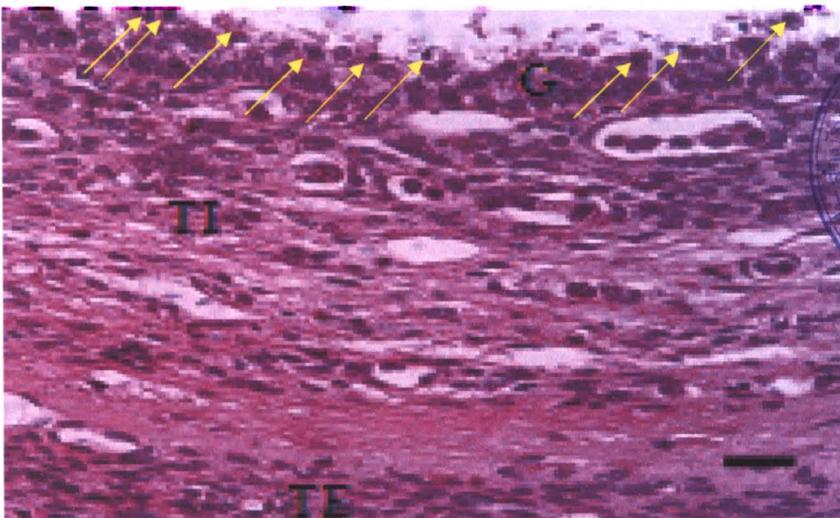


ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอไซต์ที่สมบูรณ์ (A) และไม่สมบูรณ์ (B)



2. การเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลและการเกิด Pyknotic Nuclei

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลาย พบว่าฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ คือ ฟอลลิเคิลที่เสื่อมสลายจะมีชั้นกรานูโลซาเพียง 1-2 ชั้น และลักษณะของเซลล์กรานูโลซาไม่อัดแน่นมีการกระจายตัว และที่สำคัญคือปรากฏลักษณะของ Pyknotic Nuclei (ภาพที่ 4) จากการศึกษาของ Blondin et al. (1996) พบว่า การปรากฏ Pyknotic Nuclei สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งฟอลลิเคิลที่ไม่เสื่อมสลาย (nonatretic) ฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลาย (intermediate) และฟอลลิเคิลที่เสื่อมสลาย (atretic) แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเกิด Pyknotic Nuclei ในฟอลลิเคิลแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกัน กล่าวคือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ ≤ 5 , 5-15 และ $\geq 15\%$ ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาของ Thomas et al. (2003) พบว่าฟอลลิเคิลที่เก็บมาจากรังไข่ของแกะและทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีการปรากฏของ Pyknotic Nuclei เพียง 1.5% รวมทั้ง Silva et al. (2002) ที่ทำการศึกษาโดยใช้การเกิด Pyknotic Nuclei เป็นดัชนีชี้วัดการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ และจำแนกประเภทของการเสื่อมสลายออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 (Type 1) พบการเสื่อมสลายเฉพาะโอโอไซต์ และชนิดที่ 2 (Type 2) พบการเสื่อมสลายทั้งเซลล์กรานูโลซาและโอโอไซต์ จากการทดลองพบว่า ฟอลลิเคิลในระยะ primordial และ primary follicle จะพบการเสื่อมสลายแบบชนิดที่ 1 เป็นส่วนใหญ่ ตรงกันข้ามกับฟอลลิเคิลในระยะ secondary follicle จะพบการเสื่อมสลายแบบชนิดที่ 2 และเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสลายของ primordial, primary และ secondary follicle เท่ากับ 8.5, 14.3 และ 16.8% ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลายและปรากฏลักษณะของ Pyknotic Nuclei (ปลายหัวลูกศร) ในชั้นเซลล์กรานูโลซา โดย G คือ เซลล์กรานูโลซา TI คือ เซลล์ที่ก้ำชั้นใน และ TE คือ เซลล์ที่ก้ำชั้นนอก



3. ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิล

จากการศึกษาปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิล โดยประเมินจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกฟอลลิเคิลเป็น 2 กลุ่ม คือ ฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ (healthy follicle) และฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ (unhealthy follicle) โดยคำนวณหาปริมาณเส้นเลือดวิเคราะห์โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีแบบ ฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้โปรตีน (factor VIII) ผลการทดลองพบว่า เมื่อพิจารณาจากความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด (capillary area density) ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด (capillary number density) และความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด (capillary surface density) มีมากกว่า ($P < 0.01$) ในฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ ($4.60 \pm 0.45\%$ $0.0027 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ และ $0.0060 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$; ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ ($1.76 \pm 0.42\%$ $0.0011 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ และ $0.0016 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ตามลำดับ) แต่พื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด (area per capillary) ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบระหว่างฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ (n=23) และไม่สมบูรณ์ (n=9)

ชนิดของฟอลลิเคิล	ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด (%) ¹	ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด (no./ μm^2) ²	ความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) ³	พื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด ($\mu\text{m}^2/\text{no.}$) ⁴
สมบูรณ์	4.60 ± 0.45^a	0.0027 ± 0.0002^a	0.0060 ± 0.0008^a	17.32 ± 1.93
ไม่สมบูรณ์	1.76 ± 0.42^b	0.0011 ± 0.0002^b	0.0016 ± 0.0004^b	14.13 ± 2.98

¹ ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด = พื้นที่เส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

² ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด = จำนวนเส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

³ ความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด = เส้นรอบวงของเส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

⁴ พื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด = พื้นที่เส้นเลือด/จำนวนเส้นเลือด

เมื่อพิจารณาฟอลลิเคิลตามขนาดโดยไม่คำนึงถึงความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลพบว่าความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด และพื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือดมีมากกว่า ($P < 0.01$) ในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ($5.04 \pm 0.39\%$ $0.0028 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ และ $20.74 \pm 2.23 \mu\text{m}$; ตามลำดับ) และขนาดกลาง ($4.72 \pm 0.48\%$ $0.0025 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ และ $19.40 \pm 1.32 \mu\text{m}$; ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ($0.42 \pm 0.06\%$ $0.0009 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ $4.97 \pm 0.44 \mu\text{m}$ ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือดในฟอลลิเคิลขนาดเล็กก็มีมากกว่า ($0.0067 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) เปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ($0.0014 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลาง ($0.0043 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$; $P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลทั้ง 3 ขนาด

ชนิดของฟอลลิเคิล	ความหนาแน่น ของพื้นที่เส้นเลือด (%) ¹	ความหนาแน่น ของจำนวนเส้น เลือด(no./ μm^2) ²	ความหนาแน่นของ พื้นผิวของเส้นเลือด ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) ³	พื้นที่เส้นเลือดต่อ จำนวนเส้นเลือด ($\mu\text{m}^2/\text{no.}$) ⁴
ขนาด 3-6 มม. (n=15)	5.04±0.39 ^a	0.0028±0.0003 ^a	0.0067±0.0011 ^a	20.74±2.23 ^a
ขนาด 7-10 มม. (n=9)	4.72±0.48 ^a	0.0025±0.0002 ^a	0.0043±0.0009 ^{ab}	19.40±1.32 ^a
ขนาด >10 มม. (n=8)	0.42±0.06 ^b	0.0009±0.0002 ^b	0.0014±0.0006 ^b	4.97±0.44 ^b

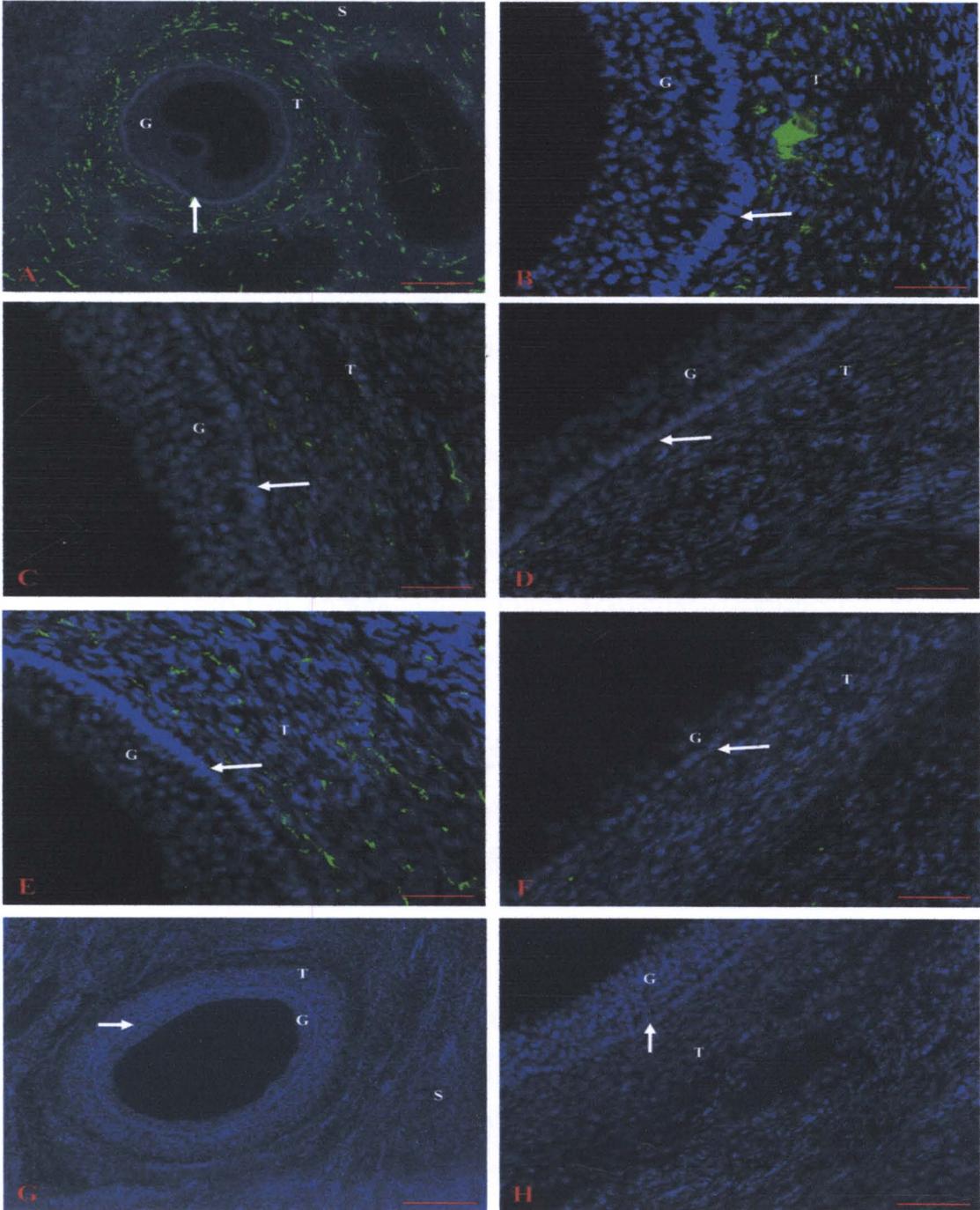
¹ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด = พื้นที่เส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

²ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด= จำนวนเส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

³ความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด = เส้นรอบวงของเส้นเลือด/พื้นที่ของชั้นทีกา

⁴พื้นที่เส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด = พื้นที่เส้นเลือด/จำนวนเส้นเลือด

ภาพที่ 5 แสดงเนื้อเยื่อรังไข่ที่ย้อมติด Factor VIII ซึ่ง Factor VIII (เป็นดัชนีชี้วัดปริมาณเส้นเลือด) สามารถพบได้ในชั้นทีกาของทั้งฟอลลิเคิลขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ (ภาพที่ 3, A ถึง F) ในชั้นทีกาของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ขนาดกลาง และฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ จะพบการย้อมติด factor VIII ได้มาก (ภาพที่ 3, A ถึง C และ E) แต่ในฟอลลิเคิลขนาดใหญ่และไม่สมบูรณ์จะย้อมติดเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 3, D และ F) แต่ในเซลล์กรานูโลซาจะไม่พบการย้อมติด Factor VIII จากการศึกษาที่ผ่านมา (Redmer et al., 2001; Hunter et al., 2004; Grazul-Bilska et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญเติบโตจะต้องมีการสร้างเส้นเลือด และมีการแสดงออกของ angiogenic factor โดยทั่วไปแล้ว angiogenic factors ประกอบด้วย vascular endothelial growth factor (VEGF) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกในรังไข่ของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (Redmer and Reynolds 1996; Grazul-Bilska et al., 2006) ในแกะและโค จะมีการแสดงออกของ VEGF และ eNOS ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลในรังไข่ โดยปริมาณเส้นเลือดนี้จะช่วยดำรงไว้ไม่ให้ฟอลลิเคิลเกิดการเสื่อมสลาย (Redmer and Reynolds 1996; Grazul-Bilska et al., 2006; 2007) ทั้ง VEGF และ eNOS เป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในแกะ (Hunter et al., 2004; Fraser, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ angiogenic factors ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้เพิ่มความหนาแน่นของพื้นผิวของเส้นเลือด (พิจารณาจากการแสดงออกของ factor VIII) ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้จะสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณเลือดที่จะไปเลี้ยงฟอลลิเคิล และเกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนสารอาหาร ฮอร์โมน (gonadotropins) และปัจจัยกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factors) (Grazul-Bilska et al. 2006, 2007) โดยแท้จริงแล้วปริมาณเส้นเลือดในชั้นทีกาจะเป็นดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล (Mattioli et al., 2001)



ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อฟอลลิเคิลที่ข้อมติค Factor VIII (ฟลูออเรสเซนต์สีเขียว) ในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (A กำลังขยาย 5x และ B กำลังขยาย 20x) ขนาดกลาง (C) ขนาดใหญ่ (D) ฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ (E) ไม่สมบูรณ์ (F) และกลุ่มควบคุม (G และ B) โดย G คือ เซลล์กรานูโลซา T คือ เซลล์ทีกา และ S คือ ชั้น strom โดยหัวลูกศรแสดง basement membrane และขนาด bar เท่ากับ 50 μm