

248981

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



248981



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ Pyknotic Nuclei เป็นดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์  
ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ในแพะพื้นเมืองไทย

Use of Pyknotic Nuclei as morphological index for  
follicular and oocyte health in Thai-Native goat



ผศ. พญ. พิสมัย ยืนยาว และคณะ  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
พ.ศ. 2554

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ Pyknotic Nuclei เป็นดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์  
ในแพะพื้นเมืองไทย

Use of Pyknotic Nuclei as morphological index for follicular and  
oocyte health in Thai-Native goat

คณะผู้วิจัย

พิสมัย	ยีนยาว
ไชยณรงค์	นาวานุเคราะห์
สุวิทย์	อุปสัย
ทศพล	มุลมณี
ศรุตวิวงศ์	บุญคง
อารีย์	ไกรสุรย์



ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงต่อสำนักบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ ในการให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการปฏิบัติงานการใช้ห้องปฏิบัติการสัตววิทยา และคอกสัตว์ทดลองของหมวดโคเนื้อ สุดท้ายขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโทที่มีส่วนร่วมสนับสนุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ให้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2554

## การใช้ Pyknotic Nuclei เป็นดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ ในแพะพื้นเมืองไทย

พิสมัย ยืนยาว<sup>1\*</sup>, ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์<sup>2</sup>, สุวิทย์ อุปลัย<sup>3</sup>, ทศพล มุลมณี<sup>2</sup>,  
ศรุติวงศ์ บุญคง<sup>2</sup>, และอารีย์ ไกรสุรย์<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

248981

งานวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประเมินความสัมพันธ์ของ Pyknotic Nuclei และปริมาณเส้นเลือดที่เป็นดัชนีชี้วัดทางสัณฐานวิทยาความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ในแพะพื้นเมืองไทย โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้รังไข่ (n=45) จากแพะพื้นเมืองไทยที่โตเต็มที่ (อายุ 12-26 เดือน) โดยการผ่าตัดผ่านหน้าท้อง หลังจากนั้นตัดรังไข่แล้วดูดเก็บ โอโอไซต์เพื่อนำมาประเมินคุณภาพและประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิล เนื้อเยื่อรังไข่จะถูกนำมาตรึงในสารละลาย Carnoy solution เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากทำพาราฟินเนื้อเยื่อรังไข่แล้ว ตัดเนื้อเยื่อรังไข่ให้มีความหนา 7  $\mu\text{m}$  เพื่อนำไปย้อมกับสารละลาย Periodic Acid Schiff (PAS)-hematoxylin ต่อไป ความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลประเมินจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้เป็น 2 ประเภท คือ ฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ และไม่สมบูรณ์ นอกจากนั้นแล้วยังจำแนกฟอลลิเคิลตามขนาดได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-6 มม.) กลาง (7-10 มม.) และใหญ่ (มากกว่า 10 มม.) ปริมาณเส้นเลือดวิเคราะห์โดยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรีแบบฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้โปรตีน (Factor VIII) แล้วคำนวณหาปริมาณเส้นเลือดจากพื้นที่ของชั้นที่ก้ำที่ย้อมติดสารฟลูออเรสเซนซ์ของ Factor VIII (จับกับเซลล์เอนโดทีเลียล) ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาพบว่าฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์จะมีเซลล์กรานูโลซาหลายชั้นและมีการอัดแน่นของชั้นเซลล์กรานูโลซา ในทางตรงกันข้ามฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์มีชั้นเซลล์กรานูโลซาน้อย ไม่อัดตัวกันแน่น และพบการปรากฏของ Pyknotic Nuclei ในชั้นเซลล์กรานูโลซา และกระจัดกระจายในช่องว่างของฟอลลิเคิล (antrum) โอโอไซต์ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์จะมีคุณภาพดีมีเซลล์ cumulus ที่สมบูรณ์และมีการกระจายตัว จากการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการย้อมด้วย PAS-hematoxylin แสดงให้เห็นถึงการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งปรากฏ Pyknotic Nuclei ที่เซลล์กรานูโลซา และจากการวิเคราะห์ปริมาณเส้นเลือด พบว่า ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด ความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือด และความหนาแน่นของพื้นที่ผิวเส้นเลือด 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) แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่เส้น

เลือดต่อจำนวนเส้นเลือดไม่พบความแตกต่างระหว่างฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้แล้วเมื่อพิจารณาโดยไม่คำนึงถึงปัจจัยความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล พบว่า ความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือด 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  $19.40 \pm 1.32 \mu\text{m}^2/\text{no.}$  ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ( $0.42 \pm 0.06\%$   $0.0009 \text{ no./}\mu\text{m}^2$   $4.97 \pm 0.44 \mu\text{m}^2/\text{no.}$  ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของพื้นที่ผิวของเส้นเลือดในฟอลลิเคิลขนาดเล็กมีมากกว่า ( $0.0067 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ) เปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ( $0.0014 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลาง ( $0.0043 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ;  $P > 0.05$ ) ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล และปริมาณเส้นเลือด มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิล นอกจากนั้นผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่า Pyknotic Nuclei และปริมาณเส้นเลือดสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ในแพะพื้นเมืองไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์ ฟอลลิเคิล โอโอไซต์ แพะพื้นเมืองไทย Pyknotic Nuclei

<sup>1</sup> ภาควิชาสัตวศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

<sup>3</sup> ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

\* ผู้รับผิดชอบงานวิจัยหลัก pyuenyao@yahoo.com, pyuenyao@gmail.com

## Use of Pyknotic Nuclei as morphological index for follicular and oocyte health in Thai- native goat

Pissamai Yuenyao<sup>1\*</sup>, Chainarong Navanukraw<sup>2</sup>, Suwit Uopasai<sup>3</sup>, Tossapol Moonmanee<sup>2</sup>,  
Saruttiwong Boonkong<sup>2</sup>, and Aree Kraisoorn<sup>2</sup>

### ABSTRACT

248981

The aims of the research were to determine the relationship of Pyknotic Nuclei as morphological index and vascularity for follicular and oocyte health in Thai- native goat. Ovaries (n=45) from adult Thai-native goats (12-36 months of age) were collected by surgical laparotomy. Oocytes were aspirated, recovered, and morphologically evaluated to assess quality. Ovarian tissue sample were fixed in Carnoy solution and used for immunohistochemistry. Follicular health was determined morphologically and classified into two groups (healthy and unhealthy follicles). All follicles were classified 3 classes of size as follows: small (3-6 mm), medium (7-10 mm), and large size (>10 mm). Paraffin-embedded sections (7  $\mu\text{m}$ ) from each ovary were used for detection of Pyknotic nuclei and Factor VIII with pas- hematoxylin. Vascularity was determined by area that exhibited positive staining for Factor VIII (occupied by endothelial cells) in the theca layer. The histological analysis showed that of healthy follicles had an intact granulosa layer with a compact and well organized arrangement. On the other hand, unhealthy follicles had granulosa layer with uncompact and had numbers of Pyknotic Nuclei of the granulosa layer. Healthy follicles yielded mostly oocytes with a complete or fully expanded of cumulus cells. Differences in the morphology of the oocytes from unhealthy follicles mostly oocytes with an incomplete or partially expanded cumulus investment that never developed into an embryo. Histological section of ovarian after staining pas-hematoxylin, showed a degeneration of follicle containing Pyknotic Nuclei in unhealthy granulosa cells. Follicular capillary area density, capillary number density, and capillary surface density were greater ( $P<0.01$ ) in healthy follicles ( $4.60\pm 0.45\%$ ,  $0.0027 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ , and  $0.0060 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ; respectively) compared with unhealthy ( $1.76\pm 0.42\%$ ,  $0.0011 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ , and  $0.0016 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ; respectively). However, area per capillary was not different between healthy and unhealthy follicles. Regardless

of follicular health, follicular capillary area density, capillary number density, and area per capillary were greatest ( $P < 0.01$ ) in small ( $5.04 \pm 0.39\%$ ,  $0.0028 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ , and  $20.74 \pm 2.23 \mu\text{m}^2/\text{no.}$ ; respectively) and medium follicles ( $4.72 \pm 0.48\%$ ,  $0.0025 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ , and  $19.40 \pm 1.32 \mu\text{m}^2/\text{no.}$ ; respectively) compared with large follicles ( $0.42 \pm 0.06\%$ ,  $0.0009 \text{ no./}\mu\text{m}^2$ , and  $4.97 \pm 0.44 \mu\text{m}^2/\text{no.}$ ; respectively). However, capillary surface density was greatest in small follicles ( $0.0067 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ) compared with large follicles ( $0.0014 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ) but were not different when compared with medium follicles ( $0.0043 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ;  $P > 0.05$ ). These results also indicated the interaction of follicular healthy and vascularity may play significant roles in follicular growth and atresia. In addition, the results suggest that Pyknotic Nuclei and vascularity could be used as potential morphological index for follicular and oocyte health in Thai- native goat.

**Keywords:** follicle, morphological index, oocyte, Pyknotic Nuclei, Thai- native goat

---

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, 40002

<sup>3</sup> Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, 40002

\* Corresponding author: pyuenyao@yahoo.com, pyuenyao@gmail.com

## 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. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.1 การเจริญเติบโตและการพัฒนาของฟอลลิเคิล	1
1.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ และฟอลลิเคิลที่ไม่	1
1.3 การเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลและการเกิด Pyknotic Nuclei	6
2. ความสำคัญที่มาของโครงการวิจัย	6
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
4. ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
5. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี	7
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	9
1. อุปกรณ์และวิธีการ	9
2. การเก็บรวบรวมข้อมูล	10
3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	10

**สารบัญเรื่อง (ต่อ)**  
**(Table of Contents)**

	หน้า
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์	11
2. การเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลและการเกิด Pyknotic Nuclei	13
3. ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิล	14
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	24

## สารบัญตาราง

### (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ (n=23) และไม่สมบูรณ์ (n=9)	14
2	ปริมาณเส้นเลือดของฟอลลิเคิลทั้ง 3 ขนาด	15

## สารบัญภาพ

### (List of Illustrations)

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างต่างๆ บนรังไข่	1
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 และห้วงลูกศรแสดง basement membrane	12
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโอโอไซต์ที่สมบูรณ์ (A) และไม่สมบูรณ์ (B)	12
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลายและปรากฏลักษณะของ Pyknotic Nuclei (ปลายห้วงลูกศร) ในชั้นเซลล์กรานูโลซา โดย G คือ เซลล์กรานูโลซา TI คือ เซลล์ทีกาชั้นใน และ TE คือ เซลล์ทีกาชั้นนอก	13
5	เนื้อเยื่อฟอลลิเคิลที่ย้อมติด factor VIII (ฟลูออเรสเซนส์สีเขียว) 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 โดยห้วงลูกศรแสดง basement membrane และขนาด bar เท่ากับ 50 $\mu$ m	16

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

BCS	body condition score
DF	dominant follicle
DNA	deoxyribonucleic acid
E2	estradiol
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FSH	follicle-stimulating hormone
GC	granulosa cell
h	hour
LH	luteinizing hormone
mRNA	messenger ribonucleic acid
$\mu\text{m}$	micrometer
O	oocyte
PAS	Periodic Acid Schiff
SAS	statistical analysis system
S	stroma layer
TC	theca cell
TE	theca externa
TI	theca interna
VEGF	vascular endothelial growth factor