ทศพล มูลมณี. 2556. **การควบคุมการทำงานของฟอลลิเคิลและคอร์ปัส ลูเทียมบนรังไข่ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร.ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์,
รศ. ดร. สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย,
รศ. ดร. กนกวรรณ จารุกำจร

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษา 1) ลักษณะเฉพาะของปริมาณเส้นเลือดการแสดงออกของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ดัชนีชี้วัดกิจกรรมการแบ่งเซลล์ (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ในฟอลลิเคิลของคลื่นฟอลลิเคิลแรก 2) ประเมินอิทธิพลของการใช้ฮอร์โมน FSH และหยุดใช้ฮอร์โมน ต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล กิจกรรมการแบ่งเซลล์ คุณภาพของโอโอไซต์ และการพัฒนาของเอ็มบริโอ และ 3) ประเมินผลของการแทนที่ฮอร์โมน GnRH ด้วยฮอร์โมน hCG ในโปรแกรมกำหนดเวลาการผสมเทียมต่ออัตราการตกไข่ อัตราการผสมติด accessory CL และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1.1 การศึกษาปริมาณเส้นเลือดในฟอลลิเคิลของโค ด้วยวิธี immunolocalization ของ Factor VIII และการทดลองที่ 1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นเลือด กิจกรรมการแบ่งเซลล์ และการแสดงออกของ eNOS ในฟอลลิเคิลของคลื่นฟอลลิเคิลแรก

การทดลองที่ 1.1 ใช้โคเนื้อลูกผสมบราห์มันจำนวน 8 ตัว โดยเก็บรังไข่ในวันที่ 6 ของวงรอบการเป็นสัด จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อรังไข่ในพาราฟินสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Factor VIII (ดัชนีชี้วัด endothelial cells) ด้วยวิธี immunofluorescence จำแนกฟอลลิเคิลบนรังไข่ตามขนาด (เล็ก กลาง และใหญ่) และสัณฐานวิทยา (สมบูรณ์ และเสื่อมสลาย) จากนั้นตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือดด้วยวิธีการวิเคราะห์รูปภาพ (image analysis) ผลการศึกษาพบว่า โปรตีน Factor VIII มีการแสดงออกที่ชั้น theca cells และ stroma ของฟอลลิเคิล แต่ไม่พบการแสดงออกในชั้น granulosa cells ค่าความหนาแน่นของพื้นที่เส้นเลือดต่อหน่วยพื้นที่ (capillary area density; CAD) และค่าความหนาแน่นของจำนวนเส้นเลือดต่อหน่วยพื้นที่ (capillary number density; CND) ของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและขนาดกลางมากกว่า ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับ

ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ค่าเฉลี่ย CAD CND และขนาดพื้นที่ของเส้นเลือดต่อจำนวนเส้นเลือด (area per capillary; APC) ของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์มากกว่า ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลที่เสื่อมสลาย นอกจากนี้พบว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างอิทธิพลของความสมบูรณ์ และขนาดของฟอลลิเคิลต่อปริมาณเส้นเลือดในฟอลลิเคิล จากผลการศึกษาแสดงได้ว่าการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Factor VIII ด้วยวิธี immunofluorescence สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดของ endothelial cells เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือด (CAD CND และ APC) ในฟอลลิเคิลของโคได้

การทดลองที่ 1.2 ใช้โคเนื้อลูกผสมบราห์มันจำนวน 10 ตัว โดยเก็บรังไข่ในวันที่ 6 ของวงรอบการเป็นสัด จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อรังไข่ในพาราฟินสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Factor VIII ด้วยวิธี immunofluorescence และใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีน eNOS และ PCNA วิเคราะห์หาปริมาณเส้นเลือด และการย้อมติด eNOS และ PCNA ด้วยวิธี image analysis จำแนกฟอลลิเคิล (n=82) บนรังไข่ตามขนาด (เล็ก กลาง และใหญ่) และสัณฐานวิทยา (สมบูรณ์ และเสื่อมสลาย) ผลการศึกษาพบว่า โปรตีน Factor VIII และ eNOS มีการแสดงออกในเส้นเลือดของชั้น theca cells ของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์มากกว่า ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลที่เสื่อมสลาย ค่าดัชนีชี้วัดการแบ่งเซลล์ (labeling indices; LIs) ของ granulosa cells และ theca cells ในฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ขนาดเล็กและขนาดกลางมากกว่า ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ นอกจากนี้พบว่า ค่าปริมาณเส้นเลือด (CAD และ CND) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการแสดงออกของโปรตีน eNOS และค่า LIs ของ granulosa cells และ theca cells แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับขนาดของฟอลลิเคิล จากผลการศึกษาได้เน้นถึงความสำคัญของปริมาณเส้นเลือด กิจกรรมการแบ่งเซลล์ และการแสดงออกของ eNOS ทั้งในฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญเติบโตและเสื่อมสลายของคลื่นฟอลลิเคิลแรก

การทดลองที่ 2 ใช้แพะเพศเมียจำนวน 40 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มควบคุมวันที่ 17 กลุ่มควบคุมวันที่ 20 กลุ่มที่แพะได้รับ FSH เพียง 1 วัน และหยุดให้ฮอร์โมน 2 วัน (1 d FSH + 2 d W) กลุ่มที่แพะได้รับ FSH 2 วัน และหยุดให้ฮอร์โมน 1 วัน (2 d FSH + 1 d W) และกลุ่มที่แพะได้รับ FSH ต่อเนื่อง 3 วัน (3 d FSH) ทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้องเก็บรังไข่ในวันที่ 17 หรือ 20 ของวงรอบการเป็นสัด ประเมินจำนวนของฟอลลิเคิลและเจาะดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลบนรังไข่นำเฉพาะโอโอไซต์ที่สมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ ต่อจากนั้นนำโอโอไซต์ที่พัฒนาสมบูรณ์มาปฏิสนธิกับอสุจิในหลอดทดลอง จากนั้นเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ต่อจากนั้นทำการแช่แข็งและเก็บตัวอย่างเอ็มบริโอ (ระยะมอรูล่า และบลาสโตซีส) ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างเอ็มบริโอที่แช่แข็งมาสกัด mRNA และนำตัวอย่าง mRNA ที่ได้ไปทำ reverse transcription ในการสังเคราะห์ cDNA วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ

โปรตีน Bcl-2 และ Cx43 ในตัวอย่างเอ็มบริโอด้วยวิธี quantitative RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมดมากที่สุด (P<0.05) ในกลุ่มแพะที่ได้รับฮอร์โมนแบบ 3 d FSH และมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ จำนวนโอโอไซต์ที่สมบูรณ์ในกลุ่ม 3 d FSH มากกว่า (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ จำนวนโอโอไซต์ที่แบ่งเซลล์ จำนวนเอ็มบริโอระยะมอรูล่า และบลาสโตซีสในกลุ่ม 3 d FSH และ 2 d FSH + 1 d W มากกว่า (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ การแสดงออกของ Bcl-2 และ Cx43 mRNA ในเอ็มบริโอของแพะจากกลุ่ม 3 d FSH มากกว่า (P<0.05) เมื่อเทียบกับเอ็มบริโอของแพะในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นการกระตุ้นแพะด้วยฮอร์โมน FSH แบบ 3 d FSH และ 2 d FSH + 1 d W เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโอโอไซต์คุณภาพดี และเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ได้

การทดลองที่ 3 ใช้โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเชี่ยน จำนวน 36 ตัว โดยแบ่งโคนม ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 (modified Ovsynch; GPH) กลุ่มที่ 2 (Ovsynch+hCG) และกลุ่มที่ 3 (Ovsynch+GnRH) ผลการทดลองพบว่า อัตราการการตกไข่และอัตราการผสมติดของโคนมทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกัน ขนาดและจำนวนของ CL ในวันที่ 8 และ 12 หลังทำการผสมเทียมของโคนมทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกัน โคนมในกลุ่ม Ovsynch+hCG มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในวันที่ 12 หลังการผสมเทียมสูงกว่า (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovsynch+GnRH แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม GPH จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า การแทนที่ฮอร์โมน GnRH ด้วยฮอร์โมน hCG ในโปรแกรมกำหนดเวลาการผสมเทียม สามารถใช้ในการเหนี่ยวนำการสร้าง accessory CL และเพิ่มระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ภายหลังการผสมเทียมได้

ดังนั้น จากข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถใช้ความรู้ที่เกี่ยวกับปริมาณเส้นเลือด (CAD CND และ APC) กิจกรรมการแบ่งเซลล์ และการแสดงออกของโปรตีน eNOS เป็นสิ่งชี้วัดการเจริญเติบและการพัฒนาของฟอลลิเคิลได้ ซึ่งการเจริญเติบโตและพัฒนาของฟอลลิเคิลช่วยสนับสนุนให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมภายในฟอลลิเคิลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์และส่งผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิ การใช้ฮอร์โมน FSH แบบ 3 d FSH และ 2 d FSH + 1 d W มีความเหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลได้หลายๆ ฟอลลิเคิล และสามารถผลิตโอโอไซต์ที่มีคุณภาพได้ ซึ่งการคัดเลือกโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (IVM) การปฏิสนธิกับอสุจิในหลอดทดลอง (IVF) และการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในหลอดทดลอง (IVC) จะช่วยเพิ่มผลสำเร็จที่ได้จากการใช้เทคโนโลยีช่วยการสืบพันธุ์ และการจัดการโดยการแทนที่ฮอร์โมน GnRH ด้วยฮอร์โมน hCG ในโปรแกรมกำหนดเวลาการผสมเทียม สามารถใช้ในการควบคุมการทำงานของฟอลลิเคิลและ CL บนรังไข่และช่วยเพิ่มระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ภายหลังการผสมเทียมได้

Tossapol Moonmanee. 2013. **Controlling Ovarian Follicular and Corpus Luteum Functions in Ruminants**. Doctor of Philosophy Thesis in Animal Science, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Chainarong Navanukraw,
Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai,
Assoc. Prof. Dr. Kanokwan Jarukamjorn

ABSTRACT

The aims of the dissertation were to 1) characterize vascularization, expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index and evaluate the relationships among these variables in antral follicles of the first follicular wave, 2) to determine the effects of FSH treatment and withdrawal on follicular growth, mitotic activity, oocyte quality, and development of embryo, and 3) evaluate the effects of GnRH replacement with hCG in TAI protocol on ovulation and conception rates, accessory CL, and subsequent plasma P4 concentrations. Three experiments were conducted in ruminants to meet the objectives of the dissertation as follows.

Experiment 1: To quantify vascularity of antral follicles in *Bos indicus* using Factor VIII immunohistochemistry in order to investigate the relationship between follicular size, health status and vascularity and to determine the relationships among vasculature, mitotic activity, and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) of antral follicles in *Bos indicus*.

Experiment 1.1: Ovaries were obtained from crossbred beef cows (n=8) on day 6 of the estrous cycle. The ovaries were perfused and used for immunofluorescence detection of Factor VIII (a marker of endothelial cells). Follicles were classified by size (small, medium, and large) and by morphology as healthy and atretic follicle. Quantitative analysis was determined by the aid of image analysis. Factor VIII binding was localized exclusively in the thecal layer and stroma of the antral follicles, but was not found in the granulosa layer. Capillary area density (CAD) and capillary number density (CND) were greater ($P<0.05$) in the small and medium follicles compared to the large follicle. The average CAD, CND, and APC

of the healthy follicles were greater (P<0.05) than that of the atretic follicles. There was no interaction between follicular health and size on vascularity of antral follicle. These results demonstrated that immunofluorescence detection of Factor VIII can be used as a reliable marker of endothelium to quantify vascularity (CAD, CND, and APC) of antral follicles in *Bos indicus*.

Experiment 1.2: Ovaries were obtained from ten crossbred beef cows on day 6 of the estrous cycle. Ovaries were fixed, paraffin-embedded and used for immunofluorescence detection of Factor VIII. Immunostaining of eNOS and PCNA were performed using specific monoclonal antibodies. Follicles were classified by size (small, medium, and large) and by morphology as healthy and atretic follicles (n=82). The expression of Factor VIII and eNOS were detected greater (P<0.05) in the blood vessels of the theca layers of the healthy follicles than those in atretic follicles. The labeling indices (LIs) in granulosa and theca cells were greater (P<0.05) in the healthy small and medium follicles compared with the healthy large follicles. Vasculature (CAD and CND) was positively correlated with eNOS expression and the LIs of granulosa and theca cells but was negatively correlated with the healthy follicle size. Thus, these data highlight the importance of vasculature, cell proliferation, and eNOS expression of growing and atretic follicles in the first follicular wave.

Experiment 2: To determine the effects of FSH treatment and withdrawal on follicular growth, mitotic activity, oocyte quality, and development of embryo in goat, forty goats were assigned to control (day 17), control (day 20), 1 d FSH + 2 d W, 2 d FSH + 1 d W, and 3 d FSH groups. Laparotomy was performed on day 17 or day 20 to evaluate the number of follicles and oocytes were aspirated to determine the oocyte quality. Only healthy oocytes were used for in vitro maturation. Matured healthy oocytes were fertilized in vitro by frozen semen. Embryos were cultured in culture medium for 5 days of culture. Then, embryo samples (morula and blastocyst) were freezed and stored at -196 ºC. Frozen embryo samples were randomly extracted for total cellular RNA. RNA samples were used for cDNA synthesis using a reverse transcription. A relative abundance mRNA of Bcl-2 and Cx43 was determined by a quantitative RT-PCR. The results demonstrated that the mean number of total follicles was greatest (P<0.05) in goats receiving 3 d FSH and was significantly greater than

that of other groups. The number of healthy oocytes was greater ($P<0.05$) in the 3 d FSH treated goats than in other groups. The number of cleaved oocytes, morula, and blastocyst embryos was greater ($P<0.05$) in the 3 d FSH and the 2 d FSH + 1 d W groups compared to other groups. The relative abundance of Bcl-2 and Cx43 transcripts were greater ($P<0.05$) in embryos of the 3 d FSH than in embryos of the other groups. Therefore, the stimulations of donor goat with 3 d FSH and 2 d FSH + 1 d W treatments are an efficient regime to high healthy oocytes able to produce high quality embryos.

Experiment 3: To evaluate the effects of GnRH replacement with hCG in TAI protocol on ovulation and conception rates, accessory CL, and subsequent plasma P4 concentrations in dairy cows, Holstein-Friesian cows (n=36) were assigned to modified Ovsynch (GPH; group 1), Ovsynch+hCG (group 2), and Ovsynch+GnRH (group 3) treatments. Synchronized ovulation and conception rates to TAI were not differed among treatment groups. Sizes and numbers of CL on day 8 and day 12 were not different among all treatments. On day 12 after TAI the P4 concentrations were highly greater ($P<0.05$) in the Ovsynch+hCG treatment compared with the Ovsynch+GnRH treatment but was not different when compared with the GPH treatment. From the findings, it can be concluded that administration of GnRH replacement with hCG in TAI protocol has potential to induce the formation of an accessory CL and to increase P4 concentration after TAI.

Taken together, these data obtained from this dissertation enable a better informed use of vasculature (CAD, CND, and APC), eNOS expression, and mitotic activity as an indicator of follicular growth and development. Each component of the antral follicle contributes to the microenvironment essential for successful oocyte differentiation and subsequent fertilization. Administration of 3 d FSH and 2 d FSH + 1 d W treatments are able to induce multi-follicular growth and to produce high quality of oocyte. Thus, the selection of oocytes for IVP of high quality might increase the outcomes of assisted reproductive technology (ART). Administration of GnRH replacement with hCG in TAI protocol has potential to control both ovarian follicular and CL functions and to increase P4 concentration after TAI.