อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาแบบแผนของกลัยโคคอนจูเกทของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัขด้วย lectin ชนิดต่างๆ พบว่าในแต่ละส่วนของรังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัขมีการติด lectin แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ทั้งนี้แสดงให้เห็นการกระจายของกลุ่มกลัยโคคอนจูเกท ที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของ รังไข่ ท่อนำไข่ และมดลูกของสุนัขมีหน้าที่แตกต่างกันในระบบสืบพันธุ์ และมีองค์ประกอบของ สารคัดหลั่ง (secretion) ที่สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวแตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้เลือก lectin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันไปสำหรับเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวในแต่ละบริเวณ เนื่องจากการใช้ lectin มีความเข้มข้นมากเกินไปนั้นมีผลทำให้ย้อมติด background มากขึ้นจึงอาจส่งผลให้ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเซลล์ได้ และอาจทำให้การแปลผลการทดลองผิดพลาดได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ lectin ที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถแยกแยะความแตกต่างของเซลล์ได้ดีที่สุด และนอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาเนื้อเยื่อของสุนัขเพศเมียที่อยู่ในช่วง proliferative phase ของรอบเดือน ซึ่งเซลล์ในขณะนั้นอาจมีการสร้างและหลั่งสารที่มีองค์ประกอบเป็นกลัยโคคอนจูเกทกลุ่มต่างๆ แตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด จึงอาจส่งผลให้พบความแตกต่างในการติด lectin ของเซลล์แต่ละชนิดได้

1. <u>แบบแผนกลัยโคคอนจูเกทของรังไข่</u>

ผลการศึกษาแบบแผนของกลัยโคคอนจูเกทใน germinal epithelium และส่วนต่างๆ ของรังไข่ สุนัข พบว่า lectin ทั้ง 6 ชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ DBA ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอน จูเกทกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-galNAc), MPA ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-gal และ α-D-galNAc), PNA ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกท กลุ่ม galactosyl (ชนิด β-D-gal(1$\rightarrow$3)D-galNAc), PSA ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม manosyl (ชนิด α-D-man และ α-D-glu), UEA-I ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม fucosyl (ชนิด α-L-fuc) และ WGA ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม glucosyl (ชนิด β-D-glcNAc) ซึ่ง lectin ทั้ง 6 ชนิดนี้ให้ผลบวกต่อเซลล์ในบริเวณ germinal epithelium แม้ว่าความเข้มในการติด lectin แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป แสดงให้เห็นว่าภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์บริเวณ germinal epithelium มีองค์ประกอบเป็นสารจำพวก glycoprotein ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่มต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว

ข้างต้น และสามารถตรวจสอบได้โดยการใช้ lectin เป็นตัวจับ (Goldstein *et al.*, 1980) โดยกลัยโคคอนจูเกทแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์บุ germinal epithelium นั้นอาจมีปริมาณแตกต่างกันไปจึงทำให้ความเข้มในการติด lectin แต่ละชนิดแตกต่างกัน หรือความแตกต่างของความเข้มข้นของ lectin แต่ละชนิดที่เลือกใช้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความเข้มในการติด lectin แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าบริเวณ zona pellucida ของ ovarian follicle มีความเฉพาะเจาะจงต่อกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-gal) และ glucosyl นอกจากนั้นยังพบความ แตกต่างในตำแหน่งการติด MPA และ WGA ของ zona pellucida อีกด้วย กล่าวคือ พบ MPA บริเวณขอบนอกของ zona pellucida และพบ WGA บริเวณขอบด้านในของ zona pellucida ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Aviles *et al.* (1994) ซึ่งทำการศึกษา glycoprotein ภายในบริเวณ zona pellucida ของหนูและเมื่อพิจารณาถึงบทบาทหน้าที่ของ zona pellucida ซึ่งมีบทบาทในปฏิกิริยา acrosomic reaction และการป้องกันเอ็มบริโอ (embryo) ขณะที่มีการเคลื่อนตัวไปตามท่อทางเดินของเซลล์สืบพันธุ์นั้น (Aviles *et al.*, 1994) บทบาทดังกล่าวมาแล้วนี้ อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติจำเพาะของ zona pellucida ในแต่ละบริเวณทำให้พบตำแหน่งการติด lectin ของ zona pellucida แตกต่างกันได้ นอกจากนั้นยังพบว่า zona pellucida ของ primary ovarian follicle เท่านั้นที่ติด MPA ซึ่งบ่งชี้ถึงกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-gal) อาจอธิบายได้ว่า ovarian follicle ในระยะแรกๆ มีกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-gal) เป็นองค์ประกอบเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของ oocyte ซึ่งสัมพันธ์กับการย้อมด้วยเทคนิค PAS พบว่าบริเวณ zona pellucida ของ ovarian follicle ให้ผลบวกต่อการย้อมติดสีชมพูแดงชัดเจน ในขณะที่ follicular cells ในบริเวณที่ติดกับ follicular antrum และ zona pellucida ให้ผลบวกต่อ UEA-I ซึ่งตรงกันข้ามกับ DBA รูปแบบของกลัยโคคอนจูเกทที่แตกต่างกันในแต่ละส่วนของ zona pellucida นี้อาจสัมพันธ์กับหน้าที่ในการสร้าง zona pellucida ของ follicular cells หรืออาจสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ด้านที่ติดกับ zona pellucida และ follicular cells ทางด้านนอกของ ovarian follicle มีความแตกต่างกัน กล่าวคือเซลล์ด้านที่ติดกับ zona pellucida อาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทหน้าที่ในการสร้าง fluid ต่างๆ มากกว่า follicular cells ทางด้านนอกของ ovarian follicle

นอกจากนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ luminal surface ของ interstitial gland พบ MPA และ WGA สีน้ำตาลเข้มชัดเจน ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีน้ำตาลกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-galNAc และ α-D-gal) และ glucosyl เป็นองค์ประกอบ ลักษณะดังกล่าวนี้อาจเป็นไปได้ว่า โดยธรรมชาติของบริเวณ luminal surface ของเซลล์บุ interstitial gland มีน้ำตาลกลุ่มดังกล่าวเป็นองค์ประกอบ

หรือ อาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่หลั่งสารประเภท glycoprotein นอกจากนี้ พบว่า ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์บุ interstitial gland ให้ผลบวกต่อ DBA และ UEA-I ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีน้ำตาลในกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-galNAc) และ fucosyl เป็นองค์ประกอบ

2. <u>แบบแผนกลัยโคคอนจูเกทของท่อนำไข่</u>

ผลการศึกษาแบบแผนของกลัยโคคอนจูเกทในเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้น และส่วนปลาย พบว่าไม่มีความแตกต่างในการติด lectin ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวทั้ง 2 ชนิด คือเซลล์บุผิวชนิดที่มี cilia (ciliated cell) และชนิดที่ไม่มี cilia (non-ciliated cell) แต่มีความแตกต่างของการติด lectin ระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้นและส่วนปลาย กล่าวคือ ในเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้นไม่มีกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม galactosyl (ยกเว้นชนิด α-D-galNAc) และ fucosyl และพบว่าภายในบริเวณ glandular epithelium ของท่อนำไข่ส่วนต้นให้ผลบวกต่อ lectin เกือบทุกชนิดยกเว้น MPA สำหรับเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนปลายนั้นมีกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม galactosyl (ชนิด α-D-gal), manosyl, fucosyl และ glucosyl และพบกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม galactosyl (ยกเว้นชนิด α-D-galNAc), fucosyl และ glucosyl ภายในบริเวณ glandular epithelium ของท่อนำไข่ส่วนปลายด้วย และเป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณ apical cytoplasm ของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้น และบริเวณ glandular epithelium ให้ผลบวกชัดเจนต่อ WGA แสดงว่าที่บริเวณนี้มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้อาจจะสันนิษฐานได้ว่าสารประเภทกลัยโคโปรตีนที่เซลล์บุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้นและเซลล์บุต่อม ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์นั้นมีน้ำตาลในกลุ่ม glucosyl เป็นองค์ประกอบ และการที่ ciliated cell ซึ่งไม่มีหน้าที่ในการสร้าง secretion แต่สามารถพบกลัยโคคอนจูเกทชนิดต่างๆ ได้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์นั้น อาจเป็นไปได้ว่า เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวชนิด ciliated cell นี้สามารถดูดซึมสารประเภท glycoprotein จากภายนอกเซลล์มาเก็บไว้ภายในเซลล์ (Abdalla, 1988) เพื่อช่วยในการรักษาโครงสร้างของเซลล์ไว้ นอกจากนั้น การที่เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวท่อนำไข่ส่วนต้นและส่วนปลายมีความแตกต่างในการติด lectin นั้น อาจเป็นไปได้ว่า เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวในแต่ละบริเวณของท่อนำไข่ทำหน้าที่ในการสร้าง glycoprotein (Abe, 1996) และ ionic (David *et al.*, 1969) ที่มีองค์ประกอบเป็นกลุ่มของกลัยโคคอนจูเกทต่างชนิดกัน ซึ่ง glycoprotein และ ionic ที่สร้างจากเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่นี้อาจจะมีบทบาทในการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวเอง หรืออาจมีบทบาทในการรักษาโครงสร้างของเซลล์ไว้ (Gheri *et al.*, 2001) นอกจากนั้น secretion ที่สร้างจากเซลล์ของเนื้อเยื่อบุผิวท่อนำไข่นี้ยังมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายและการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่และตัวอสุจิ การปฏิสนธิ

(Kapur and Johnsoon, 1988) การเคลื่อนย้ายของเอ็มบริโอจากท่อนำไข่ไปยังมดลูก และการเจริญเติบโตในช่วงแรกของเอ็มบริโอ (Leese, 1988) และในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าความเข้มของการติด lectin ในเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ส่วนต้นและส่วนปลายมีความแตกต่างกันด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของกลัยโคคอนจูเกทแต่ละชนิดนั้นมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ท่อนำไข่ของสุนัขที่นำมาทำการศึกษาอยู่ในช่วง proliferative phase ของรอบเดือน จึงอาจทำให้เซลล์มีการสร้างสารจำพวก glycoprotein มากขึ้นจึงอาจทำให้สามารถสังเกตพบกลัยโคคอนจูเกทชนิดต่างๆ แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณของท่อนำไข่ และ Abe (1996) รายงานว่า ในแต่ละบริเวณของท่อนำไข่มีความเฉพาะเจาะจงในการสร้างสารจำพวก glycoprotein และท่อนำไข่ในแต่ละบริเวณมีบทบาทในระบบสืบพันธุ์แตกต่างกัน (Abe, 1994, Abe and Oikawa, 1991) จึงอาจทำให้มีความแตกต่างกันในการติด lectin ในเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ได้

ผลการย้อมเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่สุนัขด้วยเทคนิค Periodic Acid Schiff (PAS) และ Alcian Blue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับที่อ้างอิงตาม Luna (1986) ดังนี้

<u>PAS</u>	
- glycogen & mucin	ติดสีชมพูถึงแดง
- nuclei	ติดสีฟ้า
<u>AB-PAS</u>	
- polysaccharide & mucosubstance	ติดสีแดงหรือม่วงแดงเข้ม
- hyaluonic acid	ติดสีน้ำเงิน

ผลการย้อมด้วยเทคนิคดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว และเซลล์บุต่อมของท่อนำไข่สุนัขทั้งส่วนต้นและส่วนปลาย มีปริมาณของ glycogen และ polysaccharide กระจายอยู่ทั่วไปภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์และบริเวณผิวเซลล์ และสัมพันธ์กับการย้อมด้วย lectin ซึ่งบ่งชี้ว่าภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิวของท่อนำไข่และเซลล์บุต่อมมีองค์ประกอบเป็นกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่มต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

3. <u>แบบแผนกลัยโคคอนจูเกทของมดลูก</u>

จากผลการศึกษาแบบแผนของกลัยโคคอนจูเกทในเซลล์บุผนัง endometrium พบว่าให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย DBA, MPA และ WGA ซึ่งแสดงว่าภายในเซลล์บุผนัง endometrium มีกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม galactosyl (ยกเว้นชนิด β-D-gal(1$\rightarrow$3)D-gal-NAc) และ glucosyl

เป็นองค์ประกอบ และเป็นที่น่าสังเกตว่าเฉพาะบริเวณ apical cytoplasm ของเซลล์บุผนัง endometrium เท่านั้นที่ให้ผลบวกต่อ WGA ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้อาจเนื่องมาจากธรรมชาติของเซลล์ที่จะพบกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม glucosyl ได้ในบริเวณผิวเซลล์ สำหรับ uterine gland นั้น พบว่า เซลล์บุ uterine gland ให้ผลบวกต่อ DBA, MPA และ PNA ซึ่งสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจนในบริเวณ luminal surface ของต่อม จากการที่เซลล์บุของ uterine gland ให้ผลบวกต่อ lectin กลุ่มดังกล่าวบ่งชี้ว่าภายในบริเวณ luminal surfaceของเซลล์บุ uterine gland มีองค์ประกอบเป็นกลัยโคคอนจูเกทในกลุ่ม galactosyl และสามารถพบกลัยโคคอนจูเกทกลุ่ม manosyl ได้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์บุต่อมอีกด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าวอาจสัมพันธ์กับหน้าที่ในการสร้างสารคัดหลั่งของเซลล์ต่อมซึ่งสารคัดหลั่งที่สร้างขึ้นนี้อาจมีบทบาทในการซ่อมแซมเซลล์บุผนัง endometrium ที่มีการหลุดลอกออกไปในแต่ละรอบเดือน (Peel and Bulmer, 1996) เช่นเดียวกับเซลล์บุผนัง endometrium ที่อาจมีบทบาทในการสร้างสารจำพวก glycoprotein เพื่อช่วยในการซ่อมแซมเซลล์บุผนัง endometrium ที่มีการหลุดลอกออกไปในแต่ละรอบเดือน (Peel, 1989) และอาจเป็นไปได้ว่าสารจำพวก glycoprotein ที่พบในเซลล์บุผนัง endometrium นี้ อาจเป็นชนิดเดียวกับที่พบได้ใน cell membrane ของเซลล์โดยทั่วไป (Jones *et al.*, 1993) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์บริเวณผนัง endometrium มีการสร้างและหลั่งสารจำพวก glycoprotein ออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อประโยชน์ในการป้องกันโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ (Peel and Bulmer, 1996) ซึ่งสัมพันธ์กับการย้อมด้วยเทคนิค PAS และ AB-PAS บ่งชี้ถึงการมี glycoprotein เป็นองค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ และที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์บุต่อมอีกด้วย

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ มดลูกของสุนัขที่นำมาทำการศึกษาอยู่ในช่วง proliferative phase จึงอาจส่งผลให้เซลล์บุผนัง endometrium และเซลล์บุ uterine gland มี activity มากขึ้น มีการหลั่งสารจำพวก glycoprotein ออกนอกเซลล์มากขึ้น และอาจเกี่ยวข้องกับบทบาทในการซ่อมแซมเซลล์ที่มีการหลุดลอกออกไปในแต่ละเดือน (Peel and Bulmer, 1996)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ เลือกศึกษาเฉพาะเซลล์ที่อยู่ในช่วง proliferative phase ซึ่งอาจมีผลทำให้เซลล์ต่างๆ มี activity ที่แตกต่างกันจึงทำให้พบกลัยโคคอนจูเกทชนิดต่างๆ ภายในเซลล์แตกต่างกันด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรจะทำการศึกษาในช่วงอื่นๆ ของรอบเดือนและควบคุมระยะเวลาในการ incubate เนื้อเยื่อให้มากขึ้น