

ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ความเข้มข้นของโปรตีนรวม และ ปริมาณ IGFBP-4 ในของเหลวภายในฟอลลิเคิลโค ในวันที่ 5 ของคลื่นฟอลลิเคิลแรก

Relation among mitotic activity, total protein concentrations, and amount of bovine follicular fluid IGFBP-4 on day 5 of the first follicular wave

อารีย์ ไกรสุรีย์,¹ ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์^{1,2*}, สมจิตร กัญชาพรหม³ และทศพล มุลมณี¹

Aree Kraisoorn¹, Chainarong Navanukraw^{1,2*}, Somchit Guntaprom³, and Tossapol Moonmanee¹

บทคัดย่อ: เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นของโปรตีนรวม และปริมาณของ IGFBP-4 จากของเหลวภายในฟอลลิเคิลโคในวันที่ 5 ของคลื่นฟอลลิเคิลแรก โคเนื้อลูกผสมพื้นเมืองไทยจำนวน 8 ตัวถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PGF_{2α} สังเคราะห์ และเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ในวันที่ 5 ภายหลังการเป็นสัด แบ่งขนาดฟอลลิเคิลเป็น 3 กลุ่มคือฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-6 มม.; n= 13), ขนาดกลาง (7-10 มม.; n= 8) และขนาดใหญ่ (>10 มม.; n= 8) เจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิลและเก็บรักษาไว้ที่ -20 C° เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay และปริมาณ IGFBP-4 โดยวิธี Western blotting analysis สำหรับกิจกรรมการแบ่งเซลล์กรานูโลซาและเซลล์ทีกา วิเคราะห์โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรีและคำนวณค่าดัชนีการแบ่งเซลล์ พบว่า ดัชนีการแบ่งเซลล์ในฟอลลิเคิลขนาดเล็กมีมากกว่าขนาดใหญ่ (P<0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลาง (P> 0.05) และความเข้มข้นของโปรตีนรวมจากของเหลวภายในฟอลลิเคิลขนาดเล็กมีปริมาณมากกว่า ขนาดกลางและขนาดใหญ่ (P<0.05) พบว่าฟอลลิเคิลขนาดเล็กมีปริมาณของ IGFBP-4 ความหนาแน่นน้อยกว่า ฟอลลิเคิลขนาดกลางและขนาดใหญ่ (P<0.05) สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์และ ความเข้มข้นของโปรตีนรวมที่มีมากในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก แต่ปริมาณของ IGFBP-4 มีระดับต่ำ เมื่อเทียบกับขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่แสดงออกถึงการพัฒนาของฟอลลิเคิลที่จะกลายเป็น dominant follicle ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: กิจกรรมการแบ่งเซลล์, โปรตีนรวม, ของเหลวภายในฟอลลิเคิล, โค, IGFBP-4

Abstract: The aim of the study was to investigate the relation among mitotic activity, total protein concentrations, and amount of bovine follicular fluid IGFBP-4 on day 5 of the first follicular wave. Eight mature Thai native crossbred beef cows received two injections (11 days apart) of a PGF_{2α} analogue (25 mg of Estrumate®) to synchronize estrus and ovaries were

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

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

² ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

The Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University 40002

³ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์ กาลสินธุ์ 46000

Rajamangala University of Technology Isan Kalasin Campus, Thailand 46000

*Corresponding author E-mail address: chanav@kku.ac.th

collected from a slaughterhouse on day 5 of the subsequent estrous cycle. Follicles were classified in to three group: small (diameter 3-6 mm; n= 13), medium (diameter 7-10 mm; n= 8), and large size (diameter >10 mm; n= 8). Follicular fluid was gently aspirated and stored at -20°C until determination of total protein by Bradford assay and the amount of IGFBP-4 by Western blot analysis. Mitotic activity of granulosa and theca cells was evaluated by immunohistochemistry and the labeling index was calculated as the number of PCNA labeled nuclei expressed as percentage of total nuclei. The labeling index (%) of granulosa and theca cells were significantly greatest ($P<0.05$) in small follicles compared to the large follicles, but were not different ($P<0.05$) when compared to the medium follicles ($P>0.05$). The total protein concentrations in follicular fluids of small follicles were significantly greater than that of medium and large follicles. The amount of IGFBP-4 in small follicles were significantly less ($P<0.05$) than that of medium and large follicles. These results explain to the relation among mitotic activity and total protein concentrations were greatest in small follicles, but the amount of IGFBP-4 in small follicle less than that of medium and large follicles. Demonstrate the development of the follicles to become the dominant follicle in the future.

Keywords: Mitotic activity, Total protein, Follicular fluid, Bovine, IGFBP-4

บทนำ

การพัฒนาและการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลจนสมบูรณ์ต้องอาศัยปัจจัยที่ช่วยในการมีชีวิตรอด (survival factors) ที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) กิจกรรมการแบ่งเซลล์ (mitotic activity) เป็นสิ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ฟอลลิเคิล โดยพบว่ากิจกรรมการแบ่งเซลล์จะมีบทบาทในการรักษาสภาพความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล (Redmer et al., 1991) ซึ่งของเหลวที่มีอยู่ภายในฟอลลิเคิล (follicular fluid) ที่ผลิตจากเซลล์กรานูโลซา (granulosa cell) และเซลล์ทีกา (theca cell) ที่อยู่ในรังไข่ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดการพัฒนาอย่างสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล (Wise, 1987) กลไกการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลจนถึงก่อนการตกไข่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในรังไข่ โดยฟอลลิเคิลที่ผ่านกระบวนการคัดเลือก (selection) หรือ dominant follicle จะมีอัตราการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของ estradiol รวมทั้งอัตราส่วนระหว่าง estradiol: progesterone ในสัดส่วนที่สูงและปริมาณของ IGFBP-4 มีระดับที่ต่ำเมื่อเทียบกับ subordinate follicle (Mihm et al. 2000) วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นของโปรตีนรวมและปริมาณของ IGFBP-4 จากของเหลวภายในฟอลลิเคิลโคในวันที่ 5 ของคลีนฟอลลิเคิลแรก

วิธีการศึกษา

ใช้โคเนื้อลูกผสมพื้นเมืองไทยเพศเมียจำนวน 8 ตัว (อายุประมาณ 5 ปีและน้ำหนักตัวเฉลี่ย 461 ± 13.8 กิโลกรัม) เหนี่ยวนาการเป็นสัดด้วยฟลอสดาเกลนดินทูแอลฟา (prostaglandin $_{\alpha}$; PGF $_{2\alpha}$) สังเคราะห์ (25 มก. Estrumate[®]) 2 เข็ม (ห่างจากเข็มแรก 11 วัน) ตรวจสัดวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) สังเกตพฤติกรรมจากการยืนนิ่งให้โคตัวอื่นทับ อวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกใสไหลจากช่องคลอด เมื่อโคแสดงอาการเป็นสัดนับไปอีก 5 วัน นำเข้าสู่โรงฆ่าสัตว์ เก็บรังไข่ทั้งสองข้าง วัดขนาดฟอลลิเคิลในรังไข่ทั้งสองข้างโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (Vernier calipers) จำแนกตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-6 มม.) ฟอลลิเคิลขนาดกลาง (7-10 มม.) และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (>10 มม.) ทำการเจาะดูด

ของเหลวภายในฟอลลิเคิล ด้วยไซริงค์ขนาด 1 มล. และเก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (C°)

วิเคราะห์กิจกรรมการแบ่งเซลล์ฟอลลิเคิล โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (Immunohistochemistry) โดยใช้ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) เป็นตัวชี้วัดถึงการเกิดกิจกรรมการแบ่งเซลล์ ตัดเนื้อเยื่อจริงไปเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1-2 มม. เข้ากระบวนการรักษาสภาพเนื้อเยื่อ (Fixed ovarian tissue) และฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (paraffin embedding) ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome จากนั้นตรวจหา PCNA ตามวิธีการของ Grazul-Bilska et al. (2007) โดยนำเนื้อเยื่อมาจัดเอาพาราฟินออก (deparaffinization) และจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อใน 3% xylene นาน 3 นาทีและดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ (rehydration) โดยใช้เอทานอลที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และบ่มด้วย 3% hydrogen peroxide นาน 5 นาที ทำความสะอาดเนื้อเยื่อโดยใช้ phosphate buffered solution (PBS) นำสไลด์เนื้อเยื่อบ่มกับ normal horse serum นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 C° และบ่มด้วย monoclonal mouse PCNA antibody (MAB no. 2586, Cell Signaling Technology, CA, USA) ด้วยอัตราส่วนการเจือจาง 1:100 นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 C° ทำการบ่มต่อด้วย second antibody (1:100, antimouse antibody-IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 C° และตรวจหาการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ diaminobenzadine (DAB kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) นาน 5 นาที กลุ่มควบคุม (control) จะไม่บ่มกับ monoclonal mouse antibody แต่บ่มด้วย PBS แทน คำนวณหาดัชนีการแบ่งเซลล์ (labeling index, LI) จากจำนวนเซลล์ที่นิวเคลียสปรากฏการจับของ PCNA ต่อจำนวนเซลล์ โดยใช้โปรแกรม image analysis system (VIDAS version 2.5; Roche Image analysis system, Los Altos, CA, USA) ตามวิธีการของ Grazul-Bilska et al. (2007)

วัดความเข้มข้นของโปรตีนรวมจากของเหลวในฟอลลิเคิล โดยวิธีการ Bradford assay ดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ชุด Bio-Rad Protein

assay (Bio-Rad Laboratory, CA) เจือจางสารละลายดี Bio-Rad Protein assay ด้วยน้ำกลั่น (1:4) และเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin; BSA) ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อทำกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ของเหลวจากฟอลลิเคิล โดยทำการบ่มของเหลวจากฟอลลิเคิลร่วมกับ สารละลายดี Bio-Rad Protein assay นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร วิเคราะห์ผลจากการเทียบค่ากับกราฟมาตรฐาน

วิเคราะห์ปริมาณของ IGFBP-4 โดยวิธี Western Blotting analysis ดัดแปลงตามวิธีของ Wang et al. (2006) โดยใช้โปรตีนจากของเหลวในฟอลลิเคิลที่มีความเข้มข้น 120 µg/µl ผ่านกระบวนการแยกโปรตีนโดยใช้ 10 % sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) หลังจากนั้นย้ายลง nitrocellulose membrane และบ่มกับ 5% (w/v) nonfat milk ใน TBST (5 mM Tris และ 0.9% NaCl at pH 7.5, 0.1% Tween-20) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ทำการล้างเมมเบรน (nitrocellulose membrane) 3 รอบกับ Tris buffer saline ที่มี 0.1% (v/v) Tween-20 (นานรอบละ 10 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นเมมเบรนบ่มใน anti-IGFBP-4 antibody (1:500, goat antihuman polyclonal antibody; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) ร่วมกับ TBST ที่มี 3% bovine serum albumin (BSA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำการล้างเมมเบรน 3 รอบด้วย TBST (นานรอบละ 10 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง และบ่มกับ secondary antibody (donkey antigoat IgG conjugated with horseradish peroxidase; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) ที่ถูกเจือจางใน TBST ที่มี 3% BSA (1:1,500) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำการล้างเมมเบรน 3 รอบด้วย TBST (นานรอบละ 10 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจหาแถบแบนโดยใช้ DAB substrate kit (Vector laboratories, Burlingame, CA) และอ่านค่า

ความทึบของแต่ละแถบจากเครื่อง densitometer เพื่อวิเคราะห์ผล

ข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติจากการจำแนกฟอลลิเคิลเป็น 3 กลุ่มตามขนาด ผลของดัชนีการแบ่ง เซลล์กรานูโลซาและเซลล์ที่ภายในฟอลลิเคิล ความเข้มข้นของโปรตีนรวมจากของเหลวภายในฟอลลิเคิล และปริมาณของ IGFBP-4 ถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้ PROC ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (SAS, 2001)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ฟอลลิเคิลที่ถูกจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-6 มม.) จำนวน 13 ฟอลลิเคิล ฟอลลิเคิลขนาดกลาง (7-10 มม.) จำนวน 8 ฟอลลิเคิล และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (>10 มม.) จำนวน 8 ฟอลลิเคิล ในกิจกรรมการแบ่งเซลล์ฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองเมื่อไม่คำนึงถึงปัจจัยความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิล โดยพิจารณาจากดัชนีการแบ่งเซลล์ พบว่า เซลล์กรานูโลซาและเซลล์ที่ภายในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (34.0 ± 3.5 และ 29.2 ± 2.3) มากกว่าฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (22.1 ± 2.9 และ 19.4 ± 3.3) ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับฟอลลิเคิล ขนาดกลาง (31.7 ± 3.9 และ 26.4 ± 3.0) ($P > 0.05$) กิจกรรมการแบ่งเซลล์ของฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นจึงแสดงถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในฟอลลิเคิลที่มีทั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (hyperplasia) และการเพิ่มขนาด (hypertrophy) และจากการปรากฏของ dominant follicle ในคลื่นฟอลลิเคิลแรก จะมีความสามารถในการผลิต estradiol ที่สูงในวันที่ 5 และ 8 ของวงจรการเป็นสัด (Mihm et al., 2002) นอกจากนี้ Navanukraw และ Guntaprom (2006) รายงานว่าในวันที่ 2 และ 3 ของคลื่นฟอลลิเคิลแรก ฟอลลิเคิลที่มีความเข้มข้นของเอสโตรเจนต่ำ (estrogen-inactive) มี

อัตราการแบ่งเซลล์ของ เซลล์กรานูโลซาและเซลล์ที่ต่ำกว่ามาก เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลที่มีความเข้มข้นของเอสโตรเจนสูง (estrogen-active follicles) (6.93 , 17.63 กับ 33.96 , 37.89% ตามลำดับ; $P < 0.05$)

สำหรับความเข้มข้นของโปรตีนรวมจากของเหลวภายในฟอลลิเคิลที่ได้ พบว่าในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ($89.8 \pm 1.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) มีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนรวมสูงที่สุด ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลาง ($64.6 \pm 2.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) และขนาดใหญ่ ($51.8 \pm 5.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบระหว่างฟอลลิเคิลขนาดกลางและขนาดใหญ่ ($P > 0.05$) ซึ่งผลการศึกษานี้ให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดจากของเหลวภายในฟอลลิเคิลมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของฟอลลิเคิล นอกจากนี้แล้วการลดลงของปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะพบเมื่อฟอลลิเคิลมีขนาดเพิ่มขึ้น ซึ่งพบในโคเนื้อ (Wise, 1987) และแพะ (Nandi et al., 2007)

เมื่อทำการศึกษาถึงปริมาณของ IGFBP-4 ในของเหลวจากฟอลลิเคิล โดยวิธี Western Blotting analysis พบว่าปริมาณของ IGFBP-4 มีปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งพบปริมาณของ IGFBP-4 ในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (683.55 หน่วย; arbitrary densitometer units) มีปริมาณของ IGFBP-4 น้อยที่สุด ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลาง (5375.97 หน่วย; arbitrary densitometer units) และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (3156.48 หน่วย; arbitrary densitometer units) ดังแสดงใน Figure 1 โดยการเพิ่มขึ้นของ IGF มีบทบาทในการคัดเลือก dominant follicle ความสามารถในการทำหน้าที่ทางชีววิทยา (bioavailability) ของ IGFs มีความสัมพันธ์กับ IGFBPs การลดลงระดับของ IGFBPs ในของเหลวภายในฟอลลิเคิลทำให้ IGFs เป็นอิสระมากขึ้น ส่งผลต่อการพัฒนาของฟอลลิเคิลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งรูปแบบของ IGFs ที่สามารถทำงานได้ต้องอยู่ในรูปแบบที่อิสระ (free IGFs) และไม่จับกับ IGFBPs โดย IGFBPs เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่นำพา IGFs ไปยัง

ตัวรับ (receptor) ที่อวัยวะเป้าหมายในฟอลลิเคิลบนรังไข่ (Fortune et al., 2001) ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นของโปรตีนรวม และปริมาณของ IGFBP-4 จากของเหลวภายในฟอลลิเคิลโค ซึ่งให้เห็นว่าความแตกต่างในด้านขนาดของฟอลลิเคิลเพียงอย่างเดียว อาจไม่สามารถใช้ทำนายถึงฟอลลิเคิลที่มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็น dominance follicle ได้ ผลเนื่องมาจากปริมาณของ IGFBP-4 ที่ปรากฏในระดับที่สูงของฟอลลิเคิลขนาดกลางและฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดเล็ก

ในวันที่ 5 ของคลิ่นฟอลลิเคิลแรกภายหลังการคัดเลือก (after selection of dominant follicle) จะปรากฏฟอลลิเคิลในขนาดที่แตกต่างกัน บ่งบอกถึงความสามารถในการพัฒนาของฟอลลิเคิลที่มีความต่างด้วยเช่นกัน ปริมาณของ IGFBP-4 ที่ปรากฏ (Figure 1) ในระดับความเข้มข้นที่สูงในฟอลลิเคิลขนาดกลางและฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดเล็ก อาจไม่มีความสามารถในการที่จะพัฒนาไปเป็น dominant follicle ได้ โดยฟอลลิเคิลที่จะพัฒนาไปเป็น dominant follicle จะต้องมีความเข้มข้นของ estradiol และอัตราส่วนระหว่าง estradiol: progesterone ในสัดส่วนที่สูงและปริมาณของ IGFBP-4 มีระดับที่ต่ำ เมื่อเทียบกับ subordinate follicle (Mihm et al. 2000)

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการแบ่งเซลล์และความเข้มข้นของโปรตีนรวมที่มีมากในฟอลลิเคิลขนาดเล็ก บ่งบอกถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์กรานูโลซาและเซลล์ที่ภายในฟอลลิเคิล รวมถึงความเข้มข้นของโปรตีนรวมภายในฟอลลิเคิลที่ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต จะมีความจำเพาะในแต่ละระยะการพัฒนากลิ่นฟอลลิเคิล ซึ่งปริมาณของ IGFBP-4 มีระดับต่ำ เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาดกลางและฟอลลิเคิลขนาดใหญ่

บ่งบอกถึงการพัฒนาของฟอลลิเคิลที่จะกลายเป็น dominant follicle ได้ในอนาคต ปริมาณของโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันมีผลต่อการควบคุมการพัฒนา กิจกรรมการแบ่งเซลล์และความสมบูรณ์ของ dominant follicle ที่จะเกิดขึ้นภายหลังการคัดเลือก ซึ่งมีผลต่อการสืบเชื้อสายถึงปัจจัยอื่นๆ จากของเหลวภายในฟอลลิเคิลที่จะถูกนำไปใช้เป็นข้อบ่งชี้ที่มีประโยชน์ถึงการพัฒนาและการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลที่สามารถพัฒนาไปจนถึงกระบวนการตกไข่ได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bradford, M. M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Fortune, J. E., G. M. Rivera, A. C. O. Evans, and A. M. Turzillo. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65: 648-654.
- Grazul-Bilska, A. T., C. Navanukraw, M. L. Johnson, K. A. Vonnahme, S. P. Ford, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2007. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J. Anim. Sci.* 85: 1914-1922.
- Mihm, M., E. J. Austin T. E. M. Good, J. L. H. Ireland, P. G. Knight, J. F. Roche, and J. J. Ireland. 2000. Identification of potential

- factors involved in selection of dominant follicle in heifers. *Biol. Reprod.* 63: 811-819.
- Mihm, M., M. A. Crowe, P. G. Knight, and E. J. Austin. 2002. Follicle wave growth in cattle. *Reprod Dom Anim.* 37: 191-200.
- Nandi, S., V. G. Kumar, B. M. Manjunatha, and P. S. P. Gupta. 2007. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Develop. Growth Differ.* 49: 61-66.
- Navanukraw, C., and S. Guntaprom. 2006. Mitotic activity of bovine preovulatory follicles on day 2 or day 3 of the first follicular wave. *J. Science, Technology and Humanities.* 4: 25-30.
- Redmer, D. A., J. D. Kirsch, and L. P. Reynolds. 1991. Production of mitogenic factors by cell types of bovine large estrogen-active and estrogen-inactive follicles. *J. Anim. Sci.* 69: 237-245.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS System (Release 8.2), Cary, NC.
- Wang, T., C. Chang, H. Wu, Y. Chiu, C. Chen, and H. Wang. 2006. Insulin-like growth factor -II (IGF-II), IGF- binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fer Steri.* 86 (5): 1392-1401.
- Wise, T. 1987. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: Albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 64: 1153-1169.

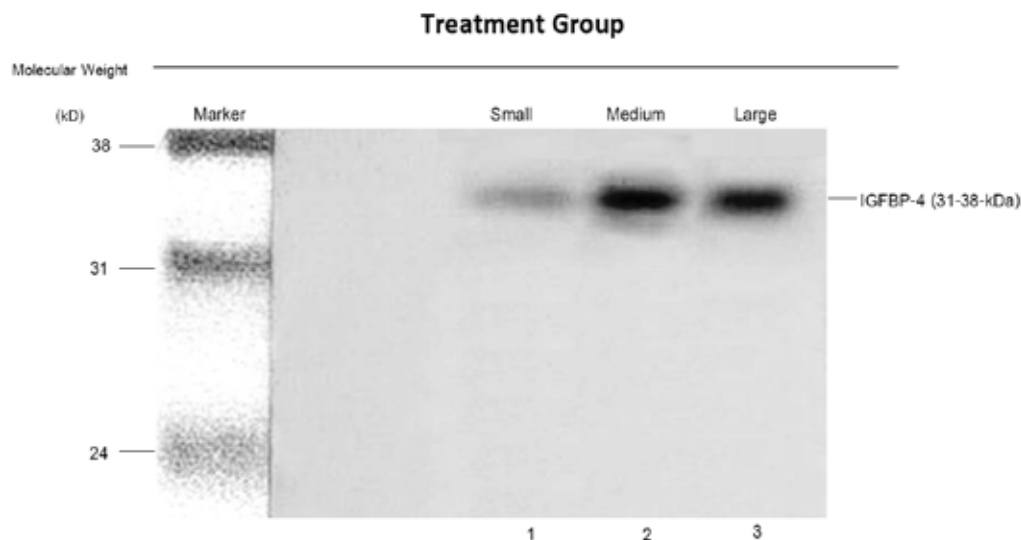


Figure 1. Western blot analysis of follicular fluid in each size. Lane 1= small follicle (3-6 mm), Lane 2 = medium follicle (7-10 mm) and Lane 3 = large follicle (>10 mm)