การศึกษาโครงสร้างเยื่อบุท่อนำไข่ของสุกรสาวทดแทนที่ถูกคัดทิ้งจากปัญหาไม่เป็นสัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ไพศาล เทียนไทย* และเกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-2189699 โทรสาร 02-2189657 E-mail: paisan.t@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลักษณะเยื่อบุท่อนำไข่สุกรสาวทดแทนที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากไม่เป็นสัดจำนวน 12 ตัว เปรียบเทียบกับท่อนำไข่ของแม่สุกรปกติจำนวน 6 ตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทำการเก็บอวัยวะสืบพันธุ์หลังจากสุกรสาวถูกส่งไปโรงฆ่าสัตว์และเก็บรังไข่เพื่อตรวจระยะการเจริญของฟอลลิเคิล ตัดท่อนำไข่ออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนรอยต่อปีกมดลูกกับท่อนำไข่ อิสมัส และแอมพูลล่า นำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการทดลองพบว่ารังไข่สุกรสาวจำนวนร้อยละ 50 อยู่ในสภาพของรังไข่ไม่ทำงาน สุกรสาวที่เหลือพบรังไข่อยู่ในระยะฟอลลิคูล่าร้อยละ 25 และระยะลูเทียลร้อยละ 25 เยื่อบุแอมพูลล่าของแม่สุกรปกติระยะฟอลลิคูล่าประกอบด้วยเซลล์ที่มีซีเลียจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป โดยซีเลียยื่นขึ้นไปสูงกว่าเซลล์คัดหลั่งและโบกพัดอย่างเป็นอิสระ ในแม่สุกรปกติที่มีรังไข่ระยะลูเทียลพบว่าเยื่อบุแอมพูลล่ามีเซลล์คัดหลั่งลักษณะกลมนูนและมีไมโครวิลไลสั้นๆ ปกคลุมกระจายอยู่จำนวนมาก ขณะที่เยื่อบุรอยต่อปีกมดลูกกับท่อนำไข่และอิสมัสของแม่สุกรพบเซลล์ทั้งสองชนิดเช่นกัน แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุไม่เด่นชัดในทั้งสองระยะ เมื่อศึกษาเยื่อบุแอมพูลล่าสุกรสาวที่ไม่เป็นสัดในระยะฟอลลิคูล่า พบการกระจายของเซลล์ที่มีซีเลียมีสัดส่วนน้อยกว่าปกติ ซีเลียที่พบในเยื่อบุแอมพูลล่าของสุกรสาวมีโครงสร้างที่ผิดปกติ นอกจากนี้ ยังพบลักษณะผิดปกติต่างๆ ในเยื่อบุรอยต่อปีกมดลูกกับท่อนำไข่และอิสมัสของสุกรสาวที่ไม่เป็นสัดทั้งระยะฟอลลิคูล่า ระยะลูเทียล และรังไข่ไม่ทำงาน นั่นคือ ซีเลียที่ยึดติดกันเป็นกลุ่มแบนราบติดกับผิวเยื่อบุ การไม่พบไมโครวิลไลปกคลุมบนผิวเซลล์คัดหลั่ง และการปรากฏของเศษชิ้นส่วนที่ไม่อาจระบุได้บนเยื่อบุ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นการปรากฏของโครงสร้างที่ผิดปกติซึ่งพบได้ในเยื่อบุท่อนำไข่สุกรสาวที่ไม่เป็นสัดเมื่อเปรียบเทียบกับแม่สุกรปกติ ความผิดปกติดังกล่าวอาจเป็นผลต่อเนื่องที่เกิดขึ้นจากการทำงานของรังไข่ที่ไม่สมบูรณ์หรือสาเหตุอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อหน้าที่ตามปกติของท่อนำไข่สุกรสาว

คำสำคัญ: การไม่เป็นสัด กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ท่อนำไข่ สุกรสาว

บทนำ

การเลี้ยงสุกรในระบบฟาร์มธุรกิจในปัจจุบันนี้พบว่า ประมาณร้อยละ 50 ของแม่สุกรในฝูงสุกรพ่อแม่พันธุ์จะถูกคัดทิ้งและทดแทนด้วยสุกรสาวในแต่ละปี (Boyle *et al.*, 1998; Rodriguez-Zas *et al.*, 2003) ซึ่งสุกรสาวทดแทนจำนวนมากถูกคัดทิ้งก่อนเริ่มใช้งานและบางส่วนถูกคัดทิ้งหลังผสม ในต่างประเทศมีการสำรวจข้อมูลทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับอวัยวะสืบพันธุ์ของสุกรที่ถูกคัดทิ้งโดยเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่า ปัญหาส่วนใหญ่ของการคัดทิ้งสุกรคือความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ซึ่งพบมากกว่าปัญหาในระบบอื่นๆ (Einarsson and Gustafsson, 1970; Ehnvall *et al.*, 1981; Dalin *et al.*, 1997; Heinonen *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการสำรวจสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ในประเทศไทย (Kunavongkrit *et al.*, 1986) ความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่ประกอบด้วย การไม่เป็นสัด การผสมไม่ติด การไม่ตั้งท้องและการแท้งลูก ซึ่งการไม่เป็นสัดเป็นปัญหาที่สำคัญมากในการคัดทิ้งสุกรสาวในประเทศแถบยุโรป (Einarsson *et al.*, 1974; Ehnvall *et al.*, 1981) ถึงแม้ว่า ยังไม่มีรายงานที่แน่นอนเกี่ยวกับสัดส่วนของปัญหาการไม่เป็นสัดในสุกรสาวทดแทนซึ่งเลี้ยงในประเทศไทย แต่ปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพภูมิอากาศร้อนชื้น โรคจากเชื้อไวรัส เชื้อราและแบคทีเรีย รวมทั้งอาหารและการจัดการฟาร์มที่ไม่เหมาะสม ส่งผลกระทบต่อการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ การเป็นสัดและประสิทธิภาพในการผสมพันธุ์ของสุกรสาว (เผด็จและคณะ, 2544; เผด็จ, 2546) ผลการศึกษาต่อเนื่องของนักวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปหาสาเหตุที่เกิดขึ้นกับรังไข่และมดลูก ซึ่งความผิดปกติของรังไข่ที่ทำให้สุกรสาวไม่เป็นสัดมีอยู่หลายชนิด เช่น รังไข่ทำงานปกติแต่สุกรไม่เป็นสัดเนื่องจากระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนผิดปกติ รังไข่ไม่ทำงาน (inactive ovary) การค้างของคอร์ปัสลูเทียมที่รังไข่ การเกิดถุงน้ำที่คอร์ปัสลูเทียม (Chung *et al.*, 2002) ส่วนสาเหตุความผิดปกติในมดลูกที่พบได้คือ มดลูกอักเสบ ถ้ามีอาการรุนแรงจะสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ในกรณีที่มีอาการไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการจะไม่สามารถสังเกตเห็น หรือพบการตายของตัวอ่อนซึ่งมีผลต่อการไม่เป็นสัดและเกิดขึ้นได้ในสุกรสาว (Lambert *et al.*, 1991) พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นดังกล่าวส่วนใหญ่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ จำเป็นต้องตรวจสอบทางจุลกายวิภาคและวิธีอื่นๆ ในระดับเซลล์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยในปัจจุบันไม่ได้มุ่งเน้นเกี่ยวกับท่อนำไข่ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่มีปรากฏการณ์ต่างๆ เกิดขึ้นมากมายระหว่างการปฏิสนธิ (Hunter, 1988; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2001) ดังนั้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในส่วนต่างๆ ของท่อนำไข่สามารถอธิบายถึงสาเหตุของความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ของสุกรสาวที่ถูกคัดทิ้งได้

ท่อนำไข่สุกรแต่ละส่วนมีหน้าที่แตกต่างกันไป เช่น แอมพูลล่ามีหน้าที่ลำเลียงโอโอไซต์ให้ถึงบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ อิสมัสเป็นท่อแคบๆ และพบชั้นกล้ามเนื้อเรียบหนามาก ทำหน้าที่นำตัวอสุจิเข้ามาเพื่อปฏิสนธิและนำโอโอไซต์ที่ได้รับการปฏิสนธิเคลื่อนที่เข้าสู่ปีกมดลูกเพื่อฝังตัว รอยต่ออิสมัสกับแอมพูลล่า (ampullary-isthmic junction, AIJ) เป็นตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิ (Dukelow and Riegle, 1974) และส่วนรอยต่อปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (utero-tubal junction, UTJ) ทำหน้าที่เก็บรักษาตัวอสุจิให้มีชีวิตรอดและรักษาประสิทธิภาพของตัวอสุจิให้พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ (Tienthai *et al.*, 2004) มีรายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุท่อนำไข่สุกรสาวทดแทนที่มีปัญหาไม่เป็นสัดโดยวิธีทาง

เนื้อเยื่อวิทยา พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติในเยื่อบุท่อนำไข่ทุกส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับแม่สุกรปกติ (Tienthai *et al.*, 2006) การศึกษาท่อนำไข่โคสาวที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากระบบสืบพันธุ์บกพร่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบความผิดปกติเกิดขึ้นกับโครงสร้างของเยื่อบุ เช่น ไมโครวิลไล ซีเลีย รวมทั้งลักษณะที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุ (Bage *et al.*, 2002) ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบโครงสร้างเยื่อบุท่อนำไข่ส่วนรอยต่อปีกมดลูกกับท่อนำไข่ อิสมัสและแอมพูลล่าในสุกรสาวทดแทนที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากปัญหาการไม่เป็นสัด เปรียบเทียบกับท่อนำไข่ของแม่สุกรที่มีวงรอบการเป็นสัดปกติโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ข้อมูลดังกล่าวช่วยยืนยันผลการศึกษาที่ผ่านมาถึงความผิดปกติของเยื่อบุท่อนำไข่ในสุกรสาวที่ไม่เป็นสัด

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างท่อนำไข่สุกร

สุกรสาวทดแทนพันธุ์ผสมแลนด์เลซกับยอร์คเชียร์ซึ่งถูกคัดทิ้งเนื่องจากปัญหาไม่เป็นสัดจำนวน 12 ตัว จากฟาร์มสุกรในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกจำนวน 8 ฟาร์ม ถูกส่งไปยังโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น เก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียจากโรงฆ่าสัตว์แล้วขนส่งโดยเก็บในกล่องใส่น้ำแข็งอุณหภูมิประมาณ 4°C เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ ตัดแยกท่อนำไข่และรังไข่ทั้งสองข้าง สังเกตรังไข่ของสุกรสาวแต่ละตัวเพื่อจำแนกลักษณะของรังไข่ตามการศึกษาของ Knox (2005) แบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ รังไข่ระยะฟอลลิคูล่า พบฟอลลิเคิลจำนวนมากมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับหรือมากกว่า 5 มม. รังไข่ระยะลูเทียล พบคอร์ปัสลูเทียมอย่างชัดเจนบนรังไข่ และรังไข่ที่มีลักษณะก่อนการเจริญพันธุ์หรือรังไข่ไม่ทำงาน (inactive ovary) พบฟอลลิเคิลจำนวนมากที่มีเส้นผ่าศูนย์ กลางน้อยกว่า 5 มม. และไม่พบคอร์ปัสลูเทียม นำท่อนำไข่มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือรอยต่อของท่อนำไข่กับปีกมดลูก (uterotubal junction, UTJ) อิสมัสและแอมพูลล่า แต่ละส่วนยาวประมาณ 1 ซม. สำหรับท่อนำไข่ปกติจะเก็บจากแม่สุกรสุขภาพดีที่มีลำดับครอกที่ 1-2 แบ่งเป็นระยะฟอลลิคูล่าจำนวน 3 ตัว และระยะลูเทียล 3 ตัว

การเตรียมตัวอย่างท่อนำไข่สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ที่ตัดแบ่งได้มาคงสภาพครั้งแรกทันที (pre-fix) ด้วย 2.5% glutaraldehyde ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 4°C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่างมาล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที ก่อนจะคงสภาพซ้ำ (post-fix) ด้วย 1% osmium tetroxide (Merk, Darmstadt, Germany) ในสารละลาย 0.1 M PBS นาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้งก่อนนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้น 35%, 50%, 70%, 95% และ100% ตามลำดับ ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) หลังจากนั้นติดตัวอย่างลงบนแท่นด้วยยาทาเล็บชนิดใสและฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองก่อนนำตัวอย่างศึกษาด้วยกล้อง SEM (JSM-5800 LV, JEOL, Tokyo, Japan) ที่ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 3,000-3,500 เท่า

ผลการทดลอง

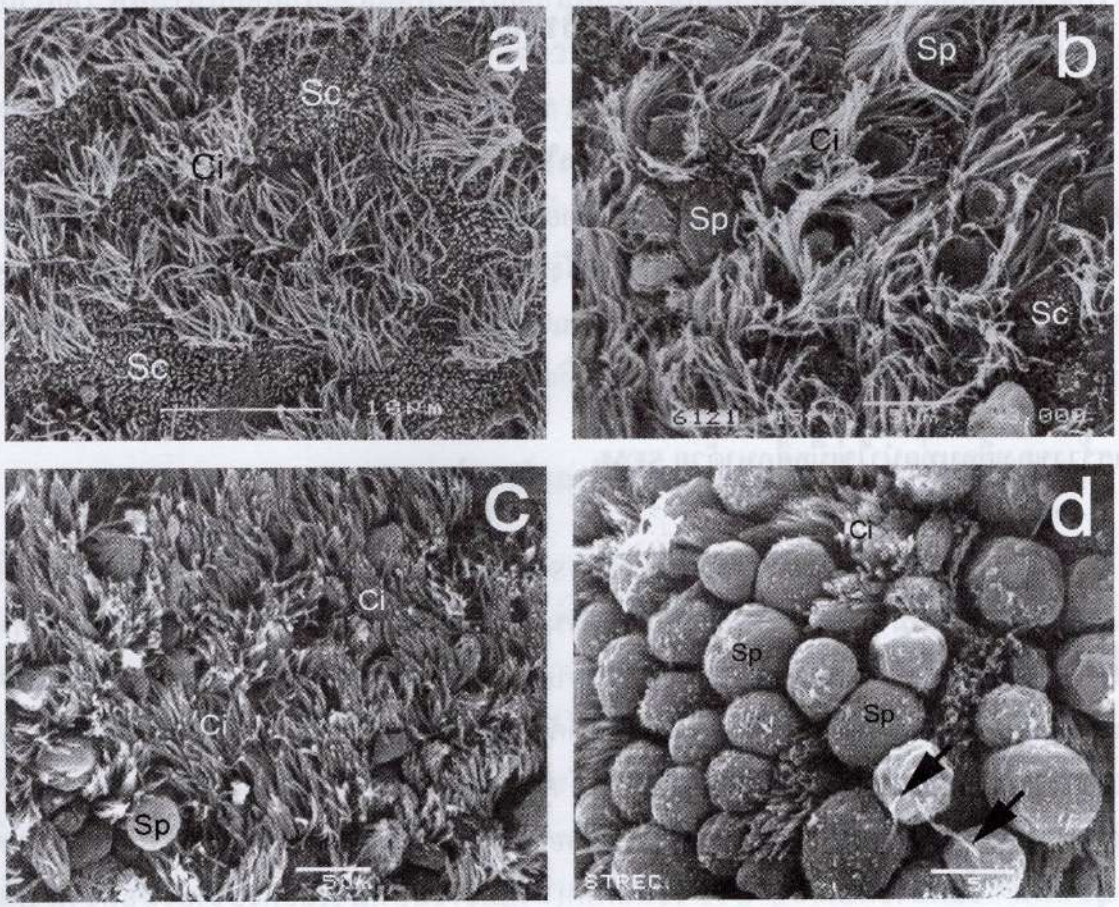
ประวัติและลักษณะของรังไข่สุกรสาว

สุกรสาวทดแทนจำนวน 12 ตัว ถูกคัดทิ้งในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม 2548 ได้ผ่านการทำวัคซีนป้องกันโรคต่างๆ คือ โรคปากและเท้าเปื่อย อหิวาต์สุกร ออเจสซ์กี้ และพาร์โวไวรัส สุกรสาวทั้งหมดถูกคัดทิ้งเนื่องจากไม่เป็นสัด สังเกตพบรังไข่สุกรสาวที่มีปัญหาไม่เป็นสัดส่วนใหญ่ (50%) มีลักษณะเหมือนกับรังไข่สุกรก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์หรือรังไข่ไม่ทำงาน รองลงมาคือรังไข่ในระยะฟอลลิคูล่า (25%) และระยะลูเทียล (25%)

โครงสร้างของเยื่อบุท่อนำไข่เมื่อศึกษาด้วย SEM

ท่อนำไข่สุกรปกติ

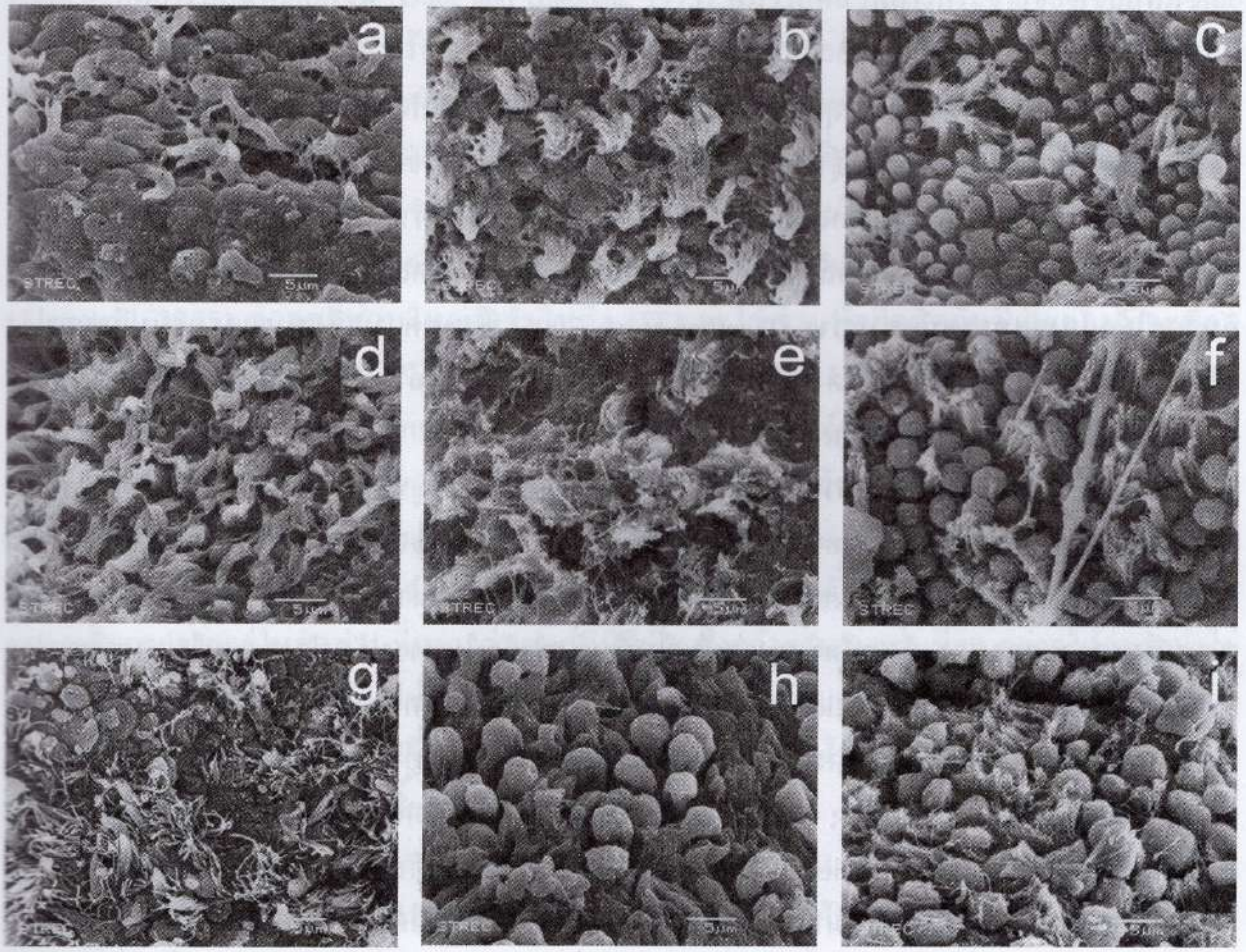
"เยื่อบุ UTJ" ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่ง (Sc) และเซลล์ชนิดที่มีซีเลีย (Ci) (รูปที่ 1a) สัดส่วนของเซลล์ทั้งสองชนิดมีจำนวนใกล้เคียงกัน พบการเปลี่ยนแปลงของซีเลียและรูปร่างของเซลล์คัดหลั่งเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบระยะฟอลลิคูล่ากับระยะลูเทียล บริเวณผิวส่วนบนของเซลล์คัดหลั่งในระยะฟอลลิคูล่าค่อนข้างนูนเล็กน้อย ขณะที่เซลล์คัดหลั่งระยะลูเทียลจะแบนราบ พบไมโครวิลไลสั้นๆ ปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของเซลล์คัดหลั่ง ขนาบด้วยเซลล์ที่มีซีเลียซึ่งสังเกตเห็นและแยกออกจากเซลล์คัดหลั่งได้อย่างชัดเจน ซีเลียที่พบมีขนาดยาวมากโบกพัดอย่างเป็นอิสระและเป็นระเบียบ "เยื่อบุอิสมัส" จะคล้ายกับเยื่อบุ UTJ เซลล์คัดหลั่งและเซลล์ที่มีซีเลียกระจายในอัตราส่วนเท่าๆ กันทั่วทั้งเยื่อบุ ในระยะฟอลลิคูล่า (รูปที่ 1b) ผิวส่วนบนของเซลล์คัดหลั่งค่อนข้างนูนเล็กน้อยจนถึงกลมนูนมากขึ้นเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า bulbous apical process (Sp) แต่ไม่ยื่นสูงมากกว่าความยาวของซีเลียที่ขนาบอยู่ข้างๆ และพบไมโครวิลไลปกคลุมเล็กน้อยหรือไม่พบไมโครวิลไล เซลล์คัดหลั่งในระยะลูเทียลมีลักษณะคล้ายกับระยะฟอลลิคูล่า แต่แบนราบและไม่ค่อยพบ bulbous apical process ส่วนเซลล์ที่มีซีเลียของทั้งสองระยะมีลักษณะและรูปแบบไม่แตกต่างกัน "เยื่อบุแอมพูลล่า" ประกอบด้วยเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์คัดหลั่งเช่นกัน แต่สัดส่วนของเซลล์ที่มีซีเลียระยะฟอลลิคูล่า (รูปที่ 1c) หนาแน่นมากกว่าเซลล์คัดหลั่งซึ่งกลมนูนและบางเซลล์มีลักษณะเป็น bulbous apical process ซึ่งมีผิวด้านบนเรียบกลม พบไมโครวิลไลปกคลุมบ้างแต่ไม่มากและยื่นขึ้นไปไม่สูงมากกว่าความยาวของซีเลียที่อยู่ข้างเคียง ขณะที่สัดส่วนการพบ bulbous apical process ของเซลล์คัดหลั่งในระยะลูเทียลมีมากกว่าเซลล์ที่มีซีเลียอย่างชัดเจน (รูปที่ 1d) ซึ่งเซลล์คัดหลั่งยื่นขึ้นมาสูงกว่าซีเลียมาก จนบดบังซีเลียเกือบหมด ยังพบไมโครวิลไลปกคลุมอยู่เล็กน้อยและพบซีเลียเดี่ยว (solitary cilium) ปรากฏอยู่บริเวณผิวตรงกลางด้านบนของเซลล์คัดหลั่ง



รูปที่ 1 ภาพจากกล้อง SEM แสดงเยื่อบุท่อนำไข่ของสุกรปกติส่วน UTJ (a), อิสมัส (b) และแอมพูลล่า (c) ในระยะฟอลลิคูล่า สังเกตเยื่อบุแอมพูลล่าระยะลูเทียล (d) มีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับระยะฟอลลิคูล่าและเซลล์คัดหลั่งบางเซลล์พบ solitary cilium (ลูกศรชี้); Ci = เซลล์ชนิดที่มีซีเลีย, Sc = เซลล์คัดหลั่ง, Sp = เซลล์คัดหลั่งที่มีลักษณะ bulbous apical process

ท่อนำไข่สุกรสาวทดแทนที่ไม่เป็นสัด

"เยื่อบุ UTJ" ของสุกรสาวที่มีรังไข่ระยะฟอลลิคูล่า (รูปที่ 2a) และลูเทียล (รูปที่ 2b) ประกอบด้วยเซลล์คัดหลั่งและเซลล์ที่มีซีเลีย รวมถึงสัดส่วนของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีจำนวนใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับ UTJ ของแม่สุกรปกติ ส่วนเยื่อบุ UTJ ของสุกรสาวที่มีรังไข่ไม่ทำงาน (รูปที่ 2c) พบเซลล์คัดหลั่งที่มีลักษณะกลมนูนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เยื่อบุ UTJ ของสุกรสาวทั้ง 3 กลุ่มพบความผิดปกติเกิดขึ้น นั่นคือการพบสารคล้ายเมือกเคลือบอยู่ที่โครงสร้างซีเลีย ทำให้ซีเลียส่วนใหญ่จับตัวรวมกันเป็นกลุ่มแบนราบติดกับเยื่อบุและไม่มีการโบกพัด ขณะที่ผิวด้านบนของเซลล์คัดหลั่งค่อนข้างราบเรียบและไม่พบไมโครวิลไลสั้นๆ ปกคลุม



รูปที่ 2 ภาพจากกล้อง SEM แสดงเยื่อบุท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของสุกรสาวที่ไม่เป็นสัด; UTJ ของสุกรสาว ระยะฟอลลิคูล่า (a) ระยะลูเทียล (b) และ UTJ ที่พบรังไข่ไม่ทำงาน (c); อิสมัสระยะฟอลลิคูล่า (d) ระยะลูเทียล (e) และอิสมัสที่พบรังไข่ไม่ทำงาน (f); แอมพูลล่าระยะฟอลลิคูล่า (g) ระยะ ลูเทียล (h) และแอมพูลล่าที่พบรังไข่ไม่ทำงาน (i)

"เยื่อบุอิสมัส" สุกรสาวระยะฟอลลิคูล่า (รูปที่ 2d) และลูเทียล (รูปที่ 2e) มีลักษณะคล้ายกับเยื่อบุ UTJ แต่พบปริมาณของซีเลียมากกว่า ขณะที่เยื่อบุอิสมัสสุกรสาวที่พบรังไข่ไม่ทำงานมีสัดส่วนของเซลล์คัดหลั่งที่มีผิวกลมนูนมากกว่าเซลล์ที่มีซีเลีย โครงสร้างที่ผิดปกติสามารถพบได้ในเยื่อบุอิสมัสของสุกร ทั้ง 3 กลุ่ม โดยระยะฟอลลิคูล่าและลูเทียล พบซีเลียรวมตัวกันเป็นกลุ่มๆ แบนราบติดพื้นผิว ทำให้สังเกตเซลล์คัดหลั่งไม่เด่นชัดและผิวเซลล์คัดหลั่งไม่ค่อยพบไมโครวิลไลปกคลุม สุกรที่มีรังไข่ไม่ทำงานจะพบเศษชิ้นส่วนที่ไม่อาจระบุได้ปกคลุมอยู่บนผิวเยื่อบุ "เยื่อบุแอมพูลล่า" ของสุกรสาวระยะฟอลลิคูล่าพบสัดส่วนที่ผิดปกติของเซลล์ที่มีซีเลียกับเซลล์คัดหลั่ง ขณะที่แอมพูลล่าระยะลูเทียลพบ bulbous apical process ของเซลล์คัดหลั่งมีขนาดเล็ก ไม่กลมตึงและซีเลียมีสารคล้ายเมือกปกคลุม ส่วนสุกรสาวที่มีรังไข่ไม่ทำงานพบ bulbous apical process เช่นเดียวกับระยะลูเทียล รวมทั้งพบซีเลียเดี่ยวบนผิวของเซลล์เหล่านี้บางเซลล์ อย่างไรก็ตาม ยังคงพบความผิดปกติเกิดขึ้นที่ซีเลียคือสภาพของความไม่เป็นระเบียบและซีเลียที่แบนราบไม่ตั้งชันขึ้น

วิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่า สุกรสาวทดแทนที่มีปัญหาไม่เป็นสัดส่วนใหญ่มีสภาพรังไข่คล้ายกับรังไข่ของสุกรก่อนการเจริญพันธุ์หรือรังไข่ไม่ทำงาน และท่อนำไข่ส่วนต่างๆ คือ UTJ อิสมัส และแอมพูลล่าของสุกรสาวทั้งระยะฟอลลิคูล่า ระยะลูเทียล และรังไข่ไม่ทำงาน มีโครงสร้างที่ผิดปกติเกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุเมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง SEM เป็นการยืนยันผลการทดลองที่ผ่านมาในสุกรสาวกลุ่มเดียวกันโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Tienthai *et al.*, 2006) ซึ่งพบความเสียหายและการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติเกิดขึ้นกับเซลล์เยื่อบุแสดงให้เห็นถึงความบกพร่อง ในการทำหน้าที่อย่างสมบูรณ์ของท่อนำไข่สุกรสาวที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากไม่เป็นสัด

การไม่เป็นสัดในสุกรสาวหรือในแม่สุกร เป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งในกลุ่มของสุกรที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากมีความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ซึ่งยากในการตรวจสอบทางคลินิก และไม่สามารถสังเกตได้จากการดูลักษณะภายนอก ดังนั้นการเก็บข้อมูลจากโรงฆ่าสัตว์จึงเป็นประโยชน์ที่จะทำให้ทราบถึงสภาวะของสุกร ที่ถูกคัดทิ้งเหล่านั้นซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการปรับปรุงระบบในการเลี้ยงสุกรแบบฟาร์มธุรกิจ (Almond and Richards, 1992) รายงานการสำรวจทางมหกายวิภาคของรังไข่สุกรสาวที่ถูกคัดทิ้งเนื่องจากไม่เป็นสัดในต่างประเทศ พบว่ารังไข่ของสุกรสาวอยู่ในสภาพไม่ทำงานประมาณร้อยละ 30-50 (Heinonen *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2002) ใกล้เคียงกับการสำรวจลักษณะรังไข่สุกรสาวที่ไม่เป็นสัดในการศึกษานี้ Tienthai และคณะ (2006) พบว่าระดับเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในสุกรสาวไม่เป็นสัดที่มีรังไข่ไม่ทำงานอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ระบุได้ว่าภาวะการเป็นสัดช้า (delayed puberty) อาจเป็นสาเหตุในการคัดทิ้งสุกรสาวทดแทนที่ไม่แสดงอาการเป็นสัด (Einarsson *et al.*, 1974) ซึ่งภาวะนี้ส่งผลกระทบต่อเนื่องในการเตรียมพร้อม การพัฒนาและการทำหน้าที่ของเซลล์ต่างๆ ในอวัยวะสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมีย อย่างไรก็ดี การศึกษานี้ยังพบสุกรสาวที่มีรังไข่ปกติระยะฟอลลิคูล่าและลูเทียลแต่ไม่แสดงการเป็นสัด เป็นไปได้ว่าการติดเชื้อโรคและความผิดปกติที่มดลูกหรือการตายของตัวอ่อนระยะแรก (Lambert *et al.*, 1991) รวมทั้งสาเหตุอื่นๆ เช่น อายุ พันธุ์ ความใกล้ชิดพ่อสุกร อาหาร และการจัดการด้านอื่นๆ ที่ไม่ถูกต้อง ทำให้สุกรสาวกลุ่มนี้ไม่แสดงอาการเป็นสัด (อรรณพ, 2537) ดังนั้นการสำรวจสาเหตุการไม่เป็นสัดในสุกรสาวที่แท้จริง ต้องสำรวจจากกลุ่มสุกรสาวที่ถูกคัดทิ้งจำนวนมากที่มาจากฟาร์มต่างๆ ทั่วประเทศ

โครงสร้างของท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของสุกรปกติเมื่อใช้กล้อง SEM ตรวจสอบ พบว่าลักษณะของเยื่อบุประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือ เซลล์ชนิดที่มีซีเลียและเซลล์ที่ทำหน้าที่คัดหลั่ง โดยสัดส่วนและการปรากฏของเซลล์สองชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามวงรอบของการเป็นสัด สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนในอินฟันดิบูลัมและแอมพูลล่าซึ่งจำนวนเซลล์ที่มีซีเลียจะเพิ่มมากขึ้นในระยะฟอลลิคูล่า ขณะที่เซลล์คัดหลั่งซึ่งมีลักษณะ bulbous apical process มีจำนวนมากขึ้นในระยะลูเทียล ปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยใน UTJ และอิสมัส (Abe and Oikawa, 1992) สอดคล้องกับลักษณะเยื่อบุท่อนำไข่สุกรปกติในการศึกษาครั้งนี้ ท่อนำไข่สุกรแต่ละส่วนทำหน้าที่แตกต่างกันไป ในแอมพูลล่า พบว่า ซีเลียมีส่วนสำคัญมากโดยเฉพาะช่วงตกไข่ในการเก็บรับและช่วยโบกพัดให้โอโอไซต์เคลื่อนที่มาถึง

ตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (Odor and Blandau, 1973) พบว่าสัดส่วนการกระจายของเซลล์ที่มีซีเลียในแอมพูลล่าของสุกรเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 30 ในระยะลูเทียลไปเป็นร้อยละ 60 ในระยะฟอลลิคูล่าซึ่งเป็นระยะที่เอสโตรเจนเพิ่มสูงขึ้น ตรงกันข้ามกับอิสมัสและ UTJ สัดส่วนของเซลล์ที่มีซีเลียกับเซลล์คัดหลั่งใกล้เคียงกัน (Abe and Oikawa, 1992) ถึงแม้ว่ายังไม่มีการระบุหน้าที่อย่างแน่นอนเกี่ยวกับซีเลียที่พบในส่วนอิสมัสและ UTJ แต่มีรายงานว่าท่อนำไข่สุกรทั้งสองส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างที่กักเก็บตัวอสุจิ (sperm reservoir) ซึ่งทำหน้าที่รักษาชีวิตรอดและประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของตัวอสุจิในระยะก่อน การตกไข่ (Tienthai, 2005) ตัวอสุจิส่วนใหญ่ที่เข้าไปถึง UTJ จะใช้ส่วนหัวยึดติดกับซีเลียก่อนที่จะหลุดออกไปเพื่อปฏิสนธิ (Suarez *et al*., 1991) ดังนั้น ซีเลียในอิสมัสและ UTJ อาจมีกลไกที่สำคัญต่อตัวอสุจิซึ่งต้องศึกษาต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ ในรายงานต่างๆ ระบุว่าเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่มีกลไก ciliogenesis ในการเปลี่ยนแปลงความยาวของซีเลียโดยเฉพาะส่วนอินฟันดิบูลัมและแอมพูลล่า กลไกนี้มีความอ่อนไหวต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Nayak *et al*., 1976; Odor and Augustine, 1995) ในการศึกษานี้พบว่า แอมพูลล่าของสุกรสาวกลุ่มที่พบสภาพรังไข่ไม่ทำงาน มีเซลล์คัดหลั่งขนาดเล็กกระจายอยู่ในสัดส่วนที่มากกว่าเซลล์ที่มีซีเลีย ซึ่งคล้ายกับระยะลูเทียล กล่าวได้ว่าท่อนำไข่ของสุกรสาวที่ไม่เป็นสัดซึ่งมีรังไข่ไม่ทำงานไม่มีการเตรียมพร้อมกับการทำหน้าที่ตามปกติ นอกจากนี้ลักษณะปกติของซีเลียควรตั้งชันขึ้น แยกกันได้อย่างอิสระเพื่อการโบกพัดที่มีประสิทธิภาพ ลักษณะดังกล่าวพบได้ในท่อนำไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ (Stalheim *et al*., 1975) รวมทั้งแม่สุกรปกติ สำหรับเซลล์คัดหลั่งใน UTJ และอิสมัสซึ่งไม่ค่อยพบการเปลี่ยนแปลงจากระยะฟอลลิคูล่าไปเป็นระยะลูเทียล มีหน้าที่ในการสร้างสารต่างๆ ในกระบวนการสร้างที่กักเก็บตัวอสุจิเช่นกัน และยังมีการหลั่งสารที่จำเป็นต่อการเกิดกระบวนการคาปาซิเตชั่นของตัวอสุจิ (Tienthai, 2004) ขณะที่เซลล์ดังกล่าวซึ่งเปลี่ยนแปลงอย่างมากในเยื่อบุแอมพูลล่าระยะลูเทียล มีหน้าที่หลั่งสารเพื่อดูแลรักษาโอโอไซต์ในระยะเวลาหนึ่งก่อนเกิดการปฏิสนธิ (Rodriguez-Martinez *et al*., 2001) ดังนั้น ความผิดปกติที่เกิดขึ้นทั้งเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์คัดหลั่งล้วนส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของท่อนำไข่สุกรอย่างแน่นอน

เมื่อพิจารณาลักษณะของซีเลียในแอมพูลล่า อิสมัส และ UTJ ของสุกรสาวที่ไม่เป็นสัดในการศึกษานี้ พบว่าซีเลียยึดติดกันด้วยสารคล้ายเมือกและแบนราบ ความผิดปกติดังกล่าวส่งผลกระทบต่อการโบกพัด และการทำหน้าที่อื่นๆ ของซีเลีย ถึงแม้ว่าในแอมพูลล่าสุกรสาวบางตัว จะพบซีเลียที่ค่อนข้างปกติแต่สัดส่วนการกระจายของเซลล์เหล่านี้ในระยะฟอลลิคูล่ามีปริมาณน้อยกว่าปกติ ซึ่งเป็นความผิดปกติอีกประการหนึ่งในการทำหน้าที่ของซีเลียให้สมบูรณ์เช่นกัน ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการวิจัยในท่อนำไข่โคสาวที่มีความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ด้วยกล้อง SEM ระบุถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์เยื่อบุ ซึ่งรวมถึงซีเลียด้วย (Bage *et al*., 2002) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความผิดปกติต่อเนื่องของท่อนำไข่ซึ่งเกิดจากไม่มีการหลั่งหรือการหลั่งของฮอร์โมนเพศเมียไม่สมบูรณ์ (ovarian steroid deficiency) ในท่อนำไข่กระต่าย ระบุถึงผลกระทบที่ทำให้การเจริญพัฒนาเซลล์เยื่อบุแอมพูลล่าผิดปกติซึ่งปรากฏอย่างชัดเจนกับเซลล์ที่มีซีเลีย (Starczewski *et al*., 2003) อย่างไรก็ดี การวิจัยครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในทางที่ผิดปกติอย่างเด่นชัดที่เซลล์คัดหลั่งในท่อนำไข่สุกรสาวทุกกลุ่ม ตามปกติแล้วการเปลี่ยนแปลงเสียหายของเซลล์คัดหลั่งของท่อนำไข่

โดยส่วนใหญ่จะเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่รุนแรงชนิดต่างๆ ซึ่งเมื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM สังเกตเห็นผิวด้านบนของเซลล์คัดหลั่งทั้งชนิดที่ไม่ยื่นนูนและชนิด bulbous apical process ขรุขระหรือหลุดออกเป็นหลุมตื้นและอาจพบเศษชิ้นส่วนต่างๆ แม้กระทั่งเชื้อแบคทีเรียบนผิวเยื่อบุ (Baczynska *et al.*, 2007) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์คัดหลั่งในท่อนำไข่สุกรสาวทดแทนที่เกิดขึ้นนั่นคือ bulbous apical process ที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก หรือสภาพการไม่ค่อยพบไมโครวิลไลปกคลุมอาจเกิดขึ้นมาจากความไม่สมบูรณ์ของฮอร์โมน ซึ่งความผิดปกติของเซลล์คัดหลั่งต้องใช้วิธีการอื่นๆ เช่น การย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อศึกษาการปรากฏหรือปริมาณของสารชนิดต่างๆ ที่คัดหลั่งออกมา รวมทั้งการแสดงออกของฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนซึ่งจะต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2548 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ คุณบังอร วัฒนาอำไพ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เอกสารอ้างอิง

เผด็จ ธรรมรักษ์. 2546. การตรวจสัด: กุญแจสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมพันธุ์ในสุกร. *เวชชสารสัตวแพทย์*. 33(3): 35-42.

เผด็จ ธรรมรักษ์ วิชัย ทันตศุภารักษ์ มงคล เตชะกำพุ และอรรณพ คุณาวงษ์กฤต. 2544. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของสุกรสาว และหลักการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมพันธุ์สุกรสาวทดแทน. *เวชชสารสัตวแพทย์*. 31(4): 13-22.

อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. 2537. ปัญหาที่เกิดจากความผิดปกติทางสรีรวิทยาของการสืบพันธุ์. ใน: วิทยาการสืบพันธุ์สุกร. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 273-275.

Abe, H. and Oikawa, T. 1992. Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phase. Anat. Rec. 233: 399-408.

Almond, G.W. and Richards, R.G. 1992. Evaluating porcine reproductive failure by the use of slaughterchecks. Comp. Contin. Educ. 14: 542-547.

Bage, R., Masironi, B., Sahlin, L. and Rodriguez-Martinez, H. 2002. Deviant peri-oestrual hormone patterns affect the epithelium of the uterine tube in repeat-breeder heifers. Reprod. Fertil. Dev. 14: 461-469.

Boyle, L., Leonard, F.C., Lynch, B. and Brophy, P. 1998. Sow culling patterns and sow welfare. *Irish Vet. J.* 51: 506-512.

Baczynska, A., Funch, P., Fedder, J., Knudson, H.J., Birkelund, S. and Christiansen, G. 2007. Morphology of human fallopian tubes after infection with Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis-in vitro organ culture study. Hum. Reprod. 22: 968-979.

Chung, W.B., Cheng, W.F., Wu, L.S. and Yang, P.C. 2002. The use of plasma progesterone profiles to predict the reproductive status of anestrous gilts and sows. Theriogenology. 58: 1165-1170.

Dalin, A.M., Gidlund, K. and Eliasson-Selling, L. 1997. Post-mortem examination of genital organs from sows with reproductive disturbances in a sow-pool. Acta. Vet. Scand. 38: 253-262.

Dukelow, W.R. and Riegle, G.D. 1974. Transport of gametes and survival of the ovum as functions of the oviduct. In: The Oviduct and Its Functions. Edited by A.D. Johnson and C.W. Foley. Academic Press, New York, USA. pp. 193-208.

Ehnvall, R., Blomqvist, A., Enarsson, S. and Karlberg, K. 1981. Cullling of gilts with special reference to reproductive failure. Nord. Vet. Med. 33: 167-171.

Einarsson. S. and Gustafsson, B. 1970. Developmental abnormalities of female sexual organs in swine. Acta. Vet. Scand. 11: 427-442.

Einarsson, S., Linde, C. and Settergren, I. 1974. Studies of the genital organs of gilts culled for anestrus. Theriogenology 2: 109-113.

Heinonen, M., Leppavuori, A. and Pyorala, S. 1998. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. Anim. Reprod. Sci. 52: 235-244.

Hunter, R.H. 1988. Transport of gametes, selection of spermatozoa and gamete lifespan in the female tract. In: The Fallopian Tubes: Their roles and Fertility and Infertility. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 53-74.

Knox, R.V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. Domest. Anim. Endocrinol. 29: 385-397.

Kunavongkrit, A., Chantaraprateep, C., Prateep, P. and Poomsuwan, P. 1986. Ovarian activities and abnormalities in slaughtered gilts. Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona, Spain, p. 34.

Lambert, E., Williams, D.H., Lynch, P.B., Hanrahan, T.J., McGeady, T.A., Austin, F.H., Boland, M.P. and Roche, J.F. 1991. The extent and timing of prenatal loss in gilts. Theriogenology. 36: 655-665.

Nayak, R.K., Albert, E.N. and Kassira, W.N. 1976. Ultrastructural studies of prepubertal porcine uterin tube epithelium. *Am. J. Vet. Res.* 37(9): 1001-1010.

Odor, D.L. and Augustine, J.R. 1995. Morphological study of changes in the baboon ovidcutal epithelium during menstrual cycle. Micros. Res. Tech. 32: 13-28.

Odor, D.L. and Blandau, R.J. 1973. Egg transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental condition. Fertil. Steril. 24: 292-300.

Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H. and Johannisson, A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. Reproduction Supplement. 58: 129-145.

Rodriguez-Zas, S.L., Southey, B.R., Knox, R.V., Connor, J.F., Lowe, J.F. and Roskamp, B.J. 2003. Bioeconomic evaluation of sow longevity and profitability. *J. Anim. Sci.* 81: 2915-2922.

Stalheim, O.H., Gallagher, J.E. and Deyoe, B.L. 1975. Scanning electron microscopy of the bovine, equine, porcine and caprine uterin tube (oviduct). *Am. J. Vet. Res.* 36: 1069-1075.

Starczewski, A., Glabowski, W. and Laszczynska, M. 2003. The effect of ovarian steroid deficiency on regeneration of oviductal mucosa following reconstructive surgery. Reprod. Biol. 3(3): 197-214.

Suarez, S.S., Redfern, K., Raynor, P., Martin, F. and Phillips, D.M. 1991. Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: Possible role in formation of sperm reservoir. Biol. Reprod. 44: 998-1004.

Tienthai, P. 2005. Hyaluronan in the sow'oviduct: Its effect on boar sperm morphology and function. *Thai J. Vet. Med.* 35(1): 11-20.

Tienthai, P., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. Anim. Reprod. Sci. 80: 131-146.

Tienthai, P., Sajjarengpong, K. and Tummaruk, P. 2006. Morphological changes in the oviduct of culling replacement gilts. *Thai J. Vet. Med.* 36(4): 41-53.

The study of oviductal epithelium of replacement gilts culled due to anestrus by scanning electron microscope

Paisan Tienthai* and Kriengyot Sajjarengpong

Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

*Corresponding author Tel. 02-2189699 Fax. 02-2189657 E-mail: paisan.t@chula.ac.th

Abstract

The objective of this study was to investigate the oviductal epithelium of gilts culled due to anestrus (n = 12) compared to sow oviducts (n = 6) by scanning electron microscope (SEM). The genital organs were collected after sending the gilts to the slaughterhouse. Ovaries were collected to classify follicular development stages. The oviducts were cut out from the tubular organ and separated into uterotubal junction (UTJ), isthmus and ampulla. The samples were immersed in 2.5% glutaraldehyde and prepared for examining under SEM. The ovarian appearances of most anestrus gilts showed the inactive ovary (50%) and the others were at follicular (25%) and luteal (25%) phases. The sow ampulla at follicular phase dominated the great number of ciliated cells which their cilia extended above the secretory cells and freely movement. In the luteal phase, the sow ampulla mainly comprised the bulbous apical processes of secretory cells and found short microvilli on the surface. As well, the sow UTJ and isthmus contained with ciliated and secretory cells but little changes were observed on the epithelial surfaces of both segments. The gilt ampulla at follicular phase showed abnormal proportion of ciliated cell distribution and their cilia revealed atypical structure. In addition, the abnormal changes were also found in the gilt UTJ and isthmus of follicular, luteal and inactive ovary, i.e. the attached cilia that declined on the surface, the lacking of microvilli on the secretory cells and the appearance of debris on the epithelium. The results indicated that the deviant ultrastructural changes of epithelial surface can be found in anestrus gilt oviducts and differed from the normal sows. These abnormal epithelial characteristics may be caused by the inactive ovary or other factors that affect the proper oviductal function in gilts.

Keywords: anestrus, scanning electron microscope, oviduct, gilt