การแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ในท่อนำไข่และปีกมดลูกของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล

นายพงษ์พิสุทธิ์ จิวะเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE PROTEIN EXPRESSION OF FAS AND FASL IN THE SWAMP BUFFALO OVIDUCTS AND UTERINE HORNS AT THE FOLLICULAR AND LUTEAL PHASES

Mr. Pongpisut Chivacharern

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Veterinary Anatomy

Department of Anatomy
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ในท่อนำไข่และปีกมดลูกของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล
โดย	นายพงษ์พิสุทธิ์ จิวะเจริญ
สาขาวิชา	กายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ไพศาล เทียนไทย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. วีระพงศ์ โกยกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ไพศาล เทียนไทย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กัมพล แก้วเกษ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พงษ์พิสุทธิ์ จิวะเจริญ: การแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ในท่อนำไข่และปีกมดลูกของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล. (THE PROTEIN EXPRESSION OF FAS AND FASL IN THE SWAMP BUFFALO OVIDUCTS AND UTERINE HORNS AT THE FOLLICULAR AND LUTEAL PHASES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.น.สพ.ดร. ไพศาล เทียนไทย, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.น.สพ.ดร. เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์, 59 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตำแหน่งในการแสดงออก และการกระจายตัวของโปรตีน Fas และ FasL ภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ของกระบือปลักไทย โดยศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด เก็บตัวอย่างระบบสืบพันธุ์เพศเมียกระบือปลักไทยจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น นำมาแบ่งแยกตามระยะของวงรอบการเป็นสัดโดยจำแนกจากลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่ จากนั้นนำอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มาตัดแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ประกอบด้วย ปีกมดลูก UTJ อิสธ์มัส แอมพูลลา และอินฟันดิบูลัม แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง กลุ่มละ 5 ตัว นำตัวอย่างปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ นำไปผ่านกระบวนการย้อมด้วยสี H&E เพื่อศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ทั่วไป จากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีสำหรับการตรวจหาโปรตีน Fas/FasL และเทคนิค TUNEL assay สำหรับการเสื่อมตายของเซลล์ แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ผลการศึกษาพบว่า การเสื่อมตายของเซลล์ปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนในปีกมดลูกกระบือปลักระยะลูเตียลช่วงกลางมากกว่าระยะฟอลลิคูลาร์ ในขณะที่การเสื่อมตายของเซลล์ภายในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ เกิดขึ้นน้อยมาก การปรากฏของโปรตีน Fas ที่เกิดขึ้นภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลาง ยกเว้นในท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัมที่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับการปรากฏของโปรตีน FasL พบว่า การปรากฏของ FasL ภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสในระยะฟอลลิคูลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูตียลช่วงกลาง การแสดงออกของ FasL ภายใน UTJ และอิสธ์มัส อาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของ immune privilege ผ่านทางระบบการทำงานของ Fas-FasL ซึ่งอาจเป็นกลไกที่สำคัญส่วนหนึ่งในการทำหน้าที่ของกระบวนการกักเก็บเซลล์อสุจิภายในท่อนำไข่ของกระบือปลัก

ภาควิชา: .....กายวิภาคศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา: .....กายวิภาคศาสตร์ประยุกต์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

.....ทางสัตวแพทย์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ปีการศึกษา: .....2553.....

517 55639 31 : MAJOR APPLIED VETERINARY ANATOMY

KEYWORDS: FAS/ FASL/ OVIDUCT/ UTERUS/ APOPTOSIS/ SWAMP BUFFALO

PONGPISUT CHIVACHARERN: THE PROTEIN EXPRESSION OF FAS AND FASL IN THE SWAMP BUFFALO OVIDUCTS AND UTERINE HORNS AT THE FOLLICULAR AND LUTEAL PHASES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PAISAN TEINTHAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KRIENGYOT SAJJARENGPONG, 59 pp.

The aim of this study was to investigate the localization and distribution of Fas and FasL proteins in the uterine horns and oviducts of Thai swamp buffalo comparing between the follicular and luteal phases of estrous cycle. Female reproductive tracts of Thai swamp buffaloes were collected from local slaughterhouse and stages of estrous cycle were classified by macro-anatomical observations of both ovaries into two groups, i.e., follicular (n=5) and luteal (n=5) groups. All reproductive tracts were separated into uterine horn, UTJ, isthmus, ampulla and infundibulum, stained with H&E for histological study. Tissue samples were then examined by immunohistochemical technique for the localization of Fas/FasL proteins and TUNEL assay for apoptosis. A light microscope was used for evaluating the general histological examination, Fas/FasL immunohistochemistry and TUNEL assay. The results showed that apoptosis in uterine horn in follicular phase appeared more ubiquitous than in mid-luteal phase whereas it was rarely found in all segments of swamp buffalo oviduct at both phases. No significantly differences in the expression of Fas protein in uterine horns and oviducts except in the infundibulum ($P<0.05$). For the FasL protein expression, only UTJ and isthmus during follicular phase was higher than in mid-luteal phase ($P<0.05$). It is possible that the different FasL expression in the oviduct, especially in the UTJ and isthmus, between estrous phases might involve in the immune privilege via Fas-FasL mechanism and might be the important part to preserve spermatozoa in the sperm reservoir functions in Thai swamp buffalo.

Department: Anatomy.....Student's Signature: .....

Field of Study: Applied veterinary anatomy.....Advisor's Signature: .....

Academic Year: 2010.....Co-advisor's Signature: .....

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้ามุ่งหวังว่าจะสามารถเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจรวมถึงบุคคลทั่วไปที่ต้องการศึกษาค้นหาความรู้ใหม่ๆเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยผลงานชิ้นนี้จะถือกำเนิดขึ้นไม่ได้เลยหากปราศจากบุคคลเหล่านี้ ซึ่งคอยมอบความรู้ ความมุ่งมั่น และกำลังใจตลอดระยะเวลาในการศึกษาครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ

รศ.น.สพ.ดร. ไพศาล เทียนไทย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ที่เป็นต้นแบบและถ่ายทอดความเป็นนักวิจัยที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า คอยให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดจนประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ทั้งด้านวิชาการและการใช้ชีวิต รวมถึงมีบทบาทสำคัญในการผลักดันการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

รศ.น.สพ.ดร. เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ที่มอบความกรุณา คอยดูแลให้ความเอาใจใส่ในรายละเอียดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งนี้และองค์ความรู้ที่จะนำไปต่อยอดการศึกษาการวิจัยในอนาคต

รศ.น.สพ.ดร. วีระพงศ์ โกยกุล ผู้ที่ช่วยมอบวิสัยทัศน์และชี้แนะแนวทางใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัย อันเป็นบ่อเกิดแห่งการศึกษาค้นคว้าและการค้นหาความรู้ใหม่ๆ ให้แก่ตัวข้าพเจ้าในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

รศ.น.สพ.ดร. กัมพล แก้วเกษ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับความรู้ทางด้านระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ตลอดจนการตรวจสอบและให้คำแนะนำในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ครบถ้วน

รศ.น.สพ.ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ คอยแนะแนวทางพร้อมทั้งชี้แนะมุมมองต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้เคยมองข้ามไปซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำการวิจัยในครั้งนี้

สพ.ญ. สกาวพร ประจันตะเสน ผู้ให้ความช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คุณศิลป์ชัย เพียรชอบ และ คุณวิฑูรย์ มะบุตร สำหรับกระบวนการเตรียมและการย้อมสีชิ้นเนื้อ

คุณจันทิมา อินทรปัญญา สำหรับการเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ที่จำเป็นในห้องวิจัย

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2552 (ครั้งที่ 3) ร่วมกับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2552 จากบัณฑิตวิทยาลัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท้ายสุดนี้ขอรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และครูบาอาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ที่ทำให้ข้าพเจ้ามีตัวตน และคอยมอบองค์ความรู้ตลอดจนแรงบันดาลใจต่างๆ อันเป็นที่มาของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1
    ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
    วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4
    สมมติฐานของการวิจัย..... 4
    ขอบเขตของการวิจัย..... 4
    ข้อจำกัดของการวิจัย..... 5
    คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 5
    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5
    วิธีดำเนินการวิจัย..... 5
    ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... 6

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7
    ลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของมดลูกกระบือ..... 7
    ลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของท่อนำไข่กระบือ..... 8
    การเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของกระบือ..... 10
    การเดินทางของเซลล์อสุจิภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย..... 11
    กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิ..... 13
    การทำงานของ immune privilege organ..... 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระบบ Fas และ FasL..... 17
การเสื่อมตายของเซลล์..... 20

3. วิธีดำเนินการวิจัย.....23
การเก็บตัวอย่างปีกมดลูกและท่อนำไข่..... 23
กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ..... 23
เทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมี..... 24
เทคนิคการตรวจหาภาวะการเสื่อมตายของเซลล์..... 25
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 25

4. ผลการวิจัย..... 26
ลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่กระบือปลักไทย..... 26
การแสดงออกของโปรตีน Fas ในปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก.....27
การแสดงออกของโปรตีน FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก.....30
ลักษณะการปรากฏของการเสื่อมตายของเซลล์โดยเทคนิค TUNEL assay..... 33

5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....36

รายการอ้างอิง..... 45
ภาคผนวก..... 58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ระดับความเข้ม (intensity) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas ที่ปรากฏในชั้นเยื่อบุของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆในระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลางของกระบือปลักไทย.....29
2. ระดับความเข้ม (intensity) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL ที่ปรากฏในชั้นเยื่อบุของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ในระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลางของกระบือปลักไทย.....32
3. จำนวนของเซลล์ที่เสื่อมตายซึ่งติดสีบวกด้วยวิธี TUNEL assay ที่ปรากฏภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง.....33

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1. ลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่กระบือปลักไทย..... 26
2. แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ที่ปรากฏใน granulosa cells ภายในฟอลลิเคิลของรังไข่หนู.....27
3. แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ในปีกมดลูกและท่อนำไข่.....28
4. ระดับความเข้มในการติดสีบวกของโปรตีน Fas เมื่อเปรียบเทียบในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะเดียวกัน.....29
5. แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ที่ปรากฏใน granulosa cells ภายในฟอลลิเคิลของรังไข่หนู.....30
6. แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่.....31
7. ระดับความเข้มในการติดสีบวกของโปรตีน FasL เมื่อเปรียบเทียบในปีกมดลูกและท่อนำไข่..... 32
8. แสดงการติดสีบวกของสภาพการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay ที่ปรากฏในมะเร็งต่อมน้ำเหลือง.....34
9. แสดงการติดสีบวกของสภาพการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay ในปีกมดลูกและท่อนำไข่.....35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AIJ	ampullary-isthmic junction
BCIP-NBT	bromochloroindolyl phosphate-nitroblue tetrazolium
BSPs	bovine plasma proteins
COL-IV	type IV collagen
DISC	death-inducing signaling complex
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas ligand
FLICE	Fas-linked interleukin-1ß-concerting enzyme like protease
GAGs	glycosaminoglycans
gld	generalized lymphoproliferative desease
HA	hyaluronic acid/ hyaluronan
hCG	human chorionic gonadotropin
IGF-1	insulin like growth factor
IL	interleukin
LH	luteinizing hormone
lpr	lymphoproliferation
NK	natural killer
PDGF	platelet-derived growth factor
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF-ß	transforming growth factor-ß
TNF	tumor necrosis factor
UTJ	uterotubal junction
VEGF	vascular endothelial growth factor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบือมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bubalus bubalis* กระบือที่พบเห็นในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ กระบือแม่น้ำและกระบือปลัก จำนวนกระบือทั่วโลกโดยส่วนใหญ่จะเป็นกระบือแม่น้ำจำนวน 97 เปอร์เซ็นต์และกระบือปลักจำนวน 3 เปอร์เซ็นต์ กระบือปลักมีลักษณะที่เหมาะสมกับการเทียมเกวียนและไถนา ทำให้เป็นที่นิยมในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเพื่อใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตร (Nanda and Nakao, 2003) ปัจจุบัน สภาพการเลี้ยงกระบือในประเทศไทยส่วนใหญ่ จะเป็นกลุ่มของเกษตรกรรายย่อยเพื่อใช้แรงงานในการเกษตรเท่านั้น ส่วนการเลี้ยงกระบือเพื่อนำมาใช้ทางการค้าโดยตรงพบว่ามีน้อยมาก ในช่วงเวลาที่ผ่านมาพบว่าจำนวนกระบือมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2532 มีจำนวนกระบือในประเทศไทยทั้งหมด 4.61 ล้านตัว (กลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์, 2543) แต่ในปัจจุบัน กลับพบว่าจำนวนประชากรกระบือเหลือไม่ถึงครึ่ง ปัจจัยที่ทำให้มีผู้เลี้ยงกระบือลดน้อยลงเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น ผู้เลี้ยงกระบือในประเทศส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อยซึ่งเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติ ทำให้ขาดการวางแผนการเลี้ยงกระบือแบบยั่งยืนในระยะยาว ทำให้ผู้ผลิตมีจำนวนน้อยลงตามไปด้วย ปัญหาการนำกระบือเข้าโรงฆ่าสัตว์ทั้งที่ยังมีลูกอ่อนติดท้องอยู่ และการนำกระบือไปฆ่าเพื่อการบริโภคมากกว่าการผลิต (กลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์, 2543) ถึงแม้ว่าจะมีการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดี ซึ่งสามารถผลิตเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ มีน้ำเชื้อคุณภาพดี และนำการผสมเทียมมาช่วยในการแก้ปัญหานี้ แต่ว่าผลของการผสมเทียมที่เกิดขึ้นต่อกระบือในประเทศไทยยังคงมีอัตราการผสมติดที่ต่ำมาก (Koonjaenak et al., 2007) ปัญหาส่วนใหญ่ที่พบในการผสมเทียมกระบือคือ การตรวจสัด เนื่องจากกระบือมักไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เห็นอย่างชัดเจนเหมือนในโค ปัญหาอีกประการหนึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของตัวกระบือทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Drost, 2007) อย่างไรก็ดี สาเหตุที่สำคัญที่สุดคือ การขาดความรู้ขั้นพื้นฐานของระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียของกระบือ ที่อาจมีความแตกต่างกันอย่างมาก ในแต่ละระยะของวงรอบการเป็นสัด ในประเทศไทย รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของกระบือโดยเฉพาะกระบือเพศเมียเกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงได้มุ่งเน้นไปที่ความสัมพันธ์ในการทำงานในอวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือเพศเมีย ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะของวงรอบของการเป็นสัดในกระบือปลัก

เป็นที่ทราบกันดีว่า ภายในทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ จากภายนอกไม่ให้เข้าไปถึงช่องว่างภายในของระบบสืบพันธุ์ได้ ทั้งที่มีกลไกดังกล่าวนี้ แต่พบว่าตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิตสามารถเดินทางผ่านท่อนำไข่เพื่อมาฝังตัวบริเวณปีกมดลูกได้ และที่สำคัญคือ เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ซึ่งมีโปรตีนแปลกปลอมบรรจุอยู่สามารถเดินทางเข้าไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ที่อยู่ภายในท่อนำไข่ได้เช่นกัน โดยทั่วไป การเดินทางของเซลล์อสุจิเพื่อไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์แบ่งออกได้ 3 ระยะ คือ ระยะแรก เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่ได้ต้องอาศัยการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบในชั้น myometrium ของปีกมดลูก เพื่อให้เซลล์อสุจิสามารถเดินทางไปยังบริเวณที่มีการปฏิสนธิเป็นระยะที่เรียกว่า “rapid phase” จากนั้น เมื่อเซลล์อสุจิเดินทางเข้าสู่บริเวณรอยต่อระหว่างปีกมดลูกกับท่อนำไข่ที่เรียกว่า uterotubal junction (UTJ) ก็จะเข้าสู่ระยะที่ 2 ซึ่งมีกลไกในการกักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) เกิดขึ้น เพื่อรักษาการมีชีวิตอยู่รอดและควบคุมปริมาณเซลล์อสุจิให้มีปริมาณที่เหมาะสมก่อนที่จะเดินทางไปบริเวณ ampullary-isthmic junction (AIJ) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ ซึ่งเป็นระยะที่3 หรือระยะสุดท้ายในการเดินทางของเซลล์อสุจิ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) กระบวนการทั้งหมดดังกล่าวนี้ จะเกิดขึ้นได้สมบูรณ์ เฉพาะในกรณีที่เซลล์อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ท่ามกลางระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ที่อยู่ภายในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย จึงได้มีการตั้งสมมติฐานขึ้นมาว่า ภายในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย อาจมีกลไกบางอย่างที่สามารถควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้ ตัวอย่างเช่น ระบบการป้องกันตัวเองระดับเซลล์ในการหลั่งสาร TH-2 type immune response ที่มีผลต่อกระบวนการป้องกันการทำลายเซลล์อสุจิและตัวอ่อน (Hunt et al., 1997; Kauma et al., 1999) ช่วยให้เซลล์อสุจิและตัวอ่อนมีชีวิตอยู่รอดได้ และทำให้อวัยวะดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติพิเศษที่เรียกว่า “immune privileged organ” เช่นเดียวกับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในอวัยวะอื่น เช่น ดวงตา (Stuart et al., 1997) เป็นต้น เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการค้นพบกลไกการทำงานที่เรียกว่า ระบบ Fas-FasL (Fas-FasL system) ซึ่งนำมาใช้อธิบายกลไกการทำงานของ immune privilege organ ได้เป็นอย่างดี (Bergqvist et al., 2005a) โดย Fas จัดอยู่ในกลุ่มของ type I membrane protein ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ tumor necrosis factor (TNF) และเป็นตัวรับที่จำเพาะเจาะจงกับ Fas Ligand หรือ FasL (Nagata, 1997) เมื่อ FasL เข้ามาจับกับ Fas ที่เยื่อหุ้มของเซลล์นั้นๆ จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ (apoptosis) ได้ (Quirk et al., 1998) ซึ่ง Fas เป็นตัวรับที่สามารถพบได้ในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันทั่วไป ดังนั้นหาก FasL สามารถเข้าไปจับกับ Fas ที่อยู่บนเซลล์เม็ดเลือดขาว จะทำให้เกิดการเสื่อมตายของของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ระบบ Fas-FasL จึงเป็นกลไกชนิดหนึ่งในการควบคุม T-lymphocytes หรือ T-cells ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่

พบตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้น บทบาทของระบบ Fas-FasL ที่สำคัญในกระบวนการตายของ T-lymphocytes เพื่อยอมให้เซลล์แปลกปลอมอื่นๆ เข้ามาได้ (Ferguson et al., 2002) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การทำงานของระบบ Fas-FasL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์นั้น สามารถพบได้ตามอวัยวะต่างๆ ของระบบสืบพันธุ์ เช่น ในรังไข่ ระบบ Fas-FasL ทำให้โอโอไซต์เกิดการฝ่อตัว (Hu et al., 2001) และในอัณฑะ ทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ spermatogonia (Francavilla et al., 2000)

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด พบ lymphocytes, neutrophils และ macrophages ในชั้นเยื่อบุของมดลูกสุกรมากที่สุดในระยะโปรเอสตรัสและระยะเอสตรัส (Kaeoket et al., 2002) การเคลื่อนที่ขึ้นมาของเซลล์ดังกล่าวนี้ สอดคล้องกับการทำงานของมดลูกในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในระหว่างการผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นกระบวนการอักเสบ (inflammatory response) ที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของ seminal plasma ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของเซลล์อสุจิ (Bischof et al., 1995; Troedsson et al., 1998) ในขณะเดียวกัน การศึกษาการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในท่อนำไข่สุกร ซึ่งพบค่อนข้างสูงในส่วนอินฟันดิบูลัมเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ โดยเฉพาะในระยะโปรเอสตรัสและระยะเอสตรัส (Jiwakanon et al., 2005) เช่นเดียวกับที่พบในมดลูก แต่ที่สำคัญคือ ภายในท่อนำไข่หลังจากที่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นในช่วงก่อนการตกไข่ มีการกระจายตัวของ neutrophils มากที่สุดที่บริเวณท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัมเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ และการปรากฏของเซลล์อสุจิไม่ได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดกลไกการ phagocytosis (Jiwakanon et al., 2006) สอดคล้องกับ Rodriguez-Martinez และคณะ (1990) ที่ไม่พบ neutrophils ในบริเวณ UTJ และส่วนอิสธ์มัสภายหลังการผสมพันธุ์ เหตุการณ์นี้ต่างจากมดลูกที่พบ neutrophils ทันทีที่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ภายในบริเวณ UTJ และอิสธ์มัสเป็นบริเวณที่เซลล์อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ โดยการควบคุมของกลไกที่มีส่วนช่วยส่งเสริมความอยู่รอดของเซลล์อสุจิ รายงานการวิจัยที่ผ่านมาเร็วๆ นี้ พบว่า กลไกของระบบ Fas-FasL ในท่อนำไข่ของโคมีส่วนเกี่ยวข้องในการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิและตัวอ่อนในระยะแรก (Bergqvist et al., 2005a) ซึ่งการทำงานของระบบ Fas-FasL ในท่อนำไข่ของโค อาจมีประสิทธิภาพในการทำงานรูปแบบเดียวกันกับการกำจัด T-lymphocytes และ NK cells ที่พบในอวัยวะที่เป็น “immune privilege organ” ดังนั้น ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ที่เกี่ยวกับการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL รวมทั้งการตรวจสอบหาสภาพการเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในบริเวณท่อนำไข่และปีกมดลูกของกระบือ จึงมีส่วนที่ช่วยอธิบายถึงสาเหตุที่เซลล์อสุจิมีชีวิตอยู่รอดได้ภายหลังจากการผสมพันธุ์ และช่วยยืนยันว่า ระบบ Fas-FasL มีส่วนร่วมในการทำงานของบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิในกระบือปลัก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการปรากฏและการกระจายตัวของโปรตีน Fas และ FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ โดยเฉพาะส่วนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ ในกระบือปลักระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด
2. เพื่อศึกษาการเสื่อมตายของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ในการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL กับภาวะการเสื่อมตายของเซลล์ที่พบในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ในแต่ละระยะของวงรอบการเป็นสัดซึ่งเป็นการเข้าใจถึงหลักการทำงานของระบบ Fas-FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ รวมทั้งเพิ่มความรู้เกี่ยวกับกลไกกักเก็บเซลล์อสุจิในท่อนำไข่กระบือปลัก

สมมติฐานของการวิจัย

ภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสซึ่งเป็นบริเวณที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิเกิดขึ้นน่าจะมีการแสดงออกของโปรตีน FasL มากกว่าภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ เพื่อช่วยในส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายในระยะฟอลลิคูล่าร์ซึ่งเป็นช่วงที่กำลังจะมีการตกไข่เกิดขึ้น การแสดงออกโปรตีนFasL น่าจะมีความแตกต่างจากในระยะลูเตียล

ขอบเขตของการวิจัย

การแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ในท่อนำไข่ของกระบือปลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณส่วนท้ายของอิสธ์มัสและ UTJ อาจมีส่วนช่วยในการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์อสุจิภายในท่อนำไข่ก่อนที่จะเดินทางไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์อสุจิมารอสะสมกัน ก่อนจะเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิเมื่อมีการตกไข่ การปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL รวมถึง ภาวะการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นภายในบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ อาจจะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเตียลช่วงกลาง ซึ่งเป็นระยะหลังจากที่เกิดการฝ่อตัวของโอโอไซต์ และอาจมีความแตกต่างจากท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ ด้วย นอกจากนี้ การปรากฏของโปรตีนดังกล่าว อาจจะมีความแตกต่างจากบริเวณปีกมดลูกซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์อสุจิส่วนใหญ่ถูกกำจัดออกไป และมีสภาพแวดล้อมที่เซลล์อสุจิไม่สามารถที่จะมีชีวิตอยู่รอดได้

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากงบประมาณในการวิจัยมีจำนวนจำกัด ทำให้วิธีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้มีเพียงกระบวนการทางอิมมูนโนฮิสโตเคมี และ TUNEL assay เท่านั้น ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนและการตรวจหาการเสื่อมตายในขั้นพื้นฐาน ทั้งที่การตรวจสอบโดยใช้วิธีอื่นๆ เช่น western blotting และ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) จะทำให้ได้ผลการวิจัยมีข้อมูลสนับสนุนที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

บริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) และส่วนท้ายของอิสธ์มัส ซึ่งมีหน้าที่ช่วยทำให้เซลล์อสุจิมีชีวิตอยู่รอดได้นานมากขึ้น พร้อมทั้งรักษาประสิทธิภาพของเซลล์อสุจิให้อยู่ในสภาพที่พร้อมสำหรับการเข้าปฏิสนธิกับโอโอไซต์ได้เป็นอย่างดี เมื่อเซลล์อสุจิได้รับการปลดปล่อยจากตำแหน่งดังกล่าว และเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ภายในท่อนำไข่ส่วนรอยต่อของอิสธ์มัสกับแอมพูลลา (ampullary-isthmic junction, AIJ)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ที่มีความสัมพันธ์ต่อกลไกการทำงานของบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิของกระบือปลัก
2. ได้ทราบถึงลักษณะการเสื่อมตายที่อาจปรากฏภายในภายในปีกมดลูก และท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด
3. ความรู้เพิ่มเติมที่เกี่ยวกับการทำงานของกลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิ สามารถนำไปใช้ต่อยอดในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีทางด้านระบบสืบพันธุ์ของกระบือปลักไทยได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียจากโรงฆ่าสัตว์ คัดเลือกประชากรกระบือปลักให้ได้ตามระยะที่ต้องการของวงรอบการเป็นสัด โดยจำแนกจากลักษณะทางกายวิภาคที่ปรากฏบนรังไข่ทั้งสองข้าง เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและนำเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ในการเตรียมชิ้นเนื้อ เพื่อให้ชิ้นเนื้ออยู่ในสภาพ

พร้อมที่จะศึกษาทางจุลกายวิภาค โดยใช้เทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหาโปรตีน Fas และ FasL รวมทั้งตรวจหาภาวะการเสื่อมตายของเซลล์โดยใช้วิธี TUNEL assay ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ศึกษาและนำเสนอผลงานในส่วนแรกคือ การศึกษาทางอิมมูนโนฮิสโตเคมีในการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL จากนั้น ศึกษาภาวะการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay วิเคราะห์ สรุปผลการวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัยทั้งหมด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของมดลูกกระบือ

มดลูกเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่หลักในการรับตัวอ่อนมาฝังตัวและเลี้ยงดูตัวอ่อน ในช่วงที่มีการเจริญพัฒนาตลอดจนกระทั่งคลอดออกมา และเป็นทางผ่านของเซลล์อสุจิหลังการผสมพันธุ์ (Dziuk, 1985) ในการทำหน้าที่สำหรับการเลี้ยงตัวอ่อน มดลูกจะผลิตสารคัดหลั่งจากต่อมของมดลูก (uterine gland) ที่กระจายอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ในขณะที่สภาพของมดลูกหลังการผสมพันธุ์ จะพบว่ามดลูกมีการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบในการขับออกของเซลล์อสุจิที่เป็นส่วนเกิน ทั้งยังบีบตัวช่วยเหลือเซลล์อสุจิบางส่วนในการเดินทางผ่านไปจนถึงท่อนำไข่ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ (Vandemark and Hays, 1952) ทั้งนี้ ลักษณะการบีบตัวของมดลูกจะมีความแตกต่างกันในแต่ละระยะของวงรอบการเป็นสัด (Hawk, 1983) มดลูกของกระบือประกอบด้วย ปากมดลูก (uterine cervix) ตัวมดลูก (uterine body) และปีกมดลูก (uterine horn) มดลูกของกระบือมีลักษณะเป็นแบบ bicornuate คล้ายกับมดลูกของโค โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยคือ ภายในมดลูกของกระบือจะมีมัดกล้ามเนื้อเรียบหนาแน่นมากกว่า แต่จะมีขนาดสั้นกว่ามดลูกโค (Drost, 2007) นอกจากนี้ ปากมดลูกของกระบือค่อนข้างแคบและซับซ้อนกว่ามดลูกโค (Dopson and Kamonpatana, 1986)

ผนังของมดลูก แบ่งออกเป็น 3 ชั้นตามลักษณะทางจุลกายวิภาค ได้แก่ endometrium, myometrium และ perimetrium โดยชั้น endometrium เป็นชั้นที่อยู่ด้านในสุดของมดลูก ถัดมาเป็นชั้น myometrium เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่มีความหนามากที่สุดประกอบขึ้นด้วยมัดของกล้ามเนื้อเรียบและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจำนวนมาก และชั้นสุดท้ายคือ perimetrium ซึ่งเชื่อมต่อกับผนังเยื่อบุช่องท้อง (Niederer et al., 2009) ชั้น endometrium ประกอบด้วย mucous membrane ซึ่งเป็นเยื่อบุชนิด simple columnar ปกคลุมอยู่บนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นใต้เยื่อบุ (subepithelial connective tissue) ชั้นเยื่อบุ simple columnar ประกอบด้วยเซลล์ที่มีซีเลียปกคลุม (ciliated cell) และเซลล์ที่ไม่มีซีเลียปกคลุมหรือเซลล์คัดหลั่ง (secretory cell) อย่างไรก็ดี เยื่อบุมดลูกอาจเปลี่ยนแปลงได้หลายแบบ ตั้งแต่ simple cuboidal หรือ pseudostratified columnar ก็ได้ เนื่องจากเยื่อบุและความหนาของผนังมดลูก รวมถึงระบบหมุนเวียนเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับระดับฮอร์โมนที่ผลิตมาจากรังไข่ช่วงที่อยู่ในวงรอบการเป็นสัดหรือช่วงที่มีการตั้งท้อง (Frandson, 2006) ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุของendometrium ยังแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

ตามโครงสร้างและหน้าที่การทำงานได้แก่ functional zone และ basal zone โดย functional zone ประกอบด้วย หลอดเลือด เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เต็มไปด้วย fibroblasts และเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ อยู่มากมาย ส่วนชั้น basal zone เป็นชั้นที่อยู่ทางด้านล่างของชั้น functional zone ทำหน้าที่ในการขึ้นมาทดแทนชั้น functional zone ที่สูญเสียไป (Brown, 1987) ชั้นถัดมาเป็น myometrium เป็นชั้นที่มีระบบหมุนเวียนเลือดและเส้นประสาทมากมาย ประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่จัดเรียงตัวสองชั้นคือ กล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวตามยาวภายนอก (outer longitudinal) และกล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวเป็นวงอยู่ภายใน (inner circular) (Niederer et al., 2009) ชั้นสุดท้ายคือชั้น perimetrium ซึ่งเป็นชั้นที่ปกคลุมมดลูกทั้งหมด เมื่อเซลล์อสุจิปฏิสนธิกับโอโอไซต์แล้ว ตัวอ่อนระยะแรกจะเคลื่อนที่ผ่านมายังปีกมดลูกและมีการฝังตัวเกิดขึ้น ปีกมดลูกเป็นส่วนที่ยืดยาวออกมาจากตัวมดลูกและยึดติดกับรังไข่โดย proper ligament of the ovary (Frandson, 2006) โดยปีกมดลูกกระบือจะสั้น มีความยาวประมาณ 35-45 เซนติเมตร (ไพศาล, 2007) และมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นทางผ่านของเซลล์อสุจิ หลังจากที่เซลล์อสุจิเดินทางมาจากตำแหน่งที่มีการหลั่งน้ำเชื้อ เพื่อเข้าไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ที่อยู่ภายในท่อนำไข่ (Hafez, 1993)

ลักษณะทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของท่อนำไข่กระบือ

ท่อนำไข่ของกระบือเป็นท่อขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของลำตัว มีความยาวประมาณ 20-28 เซนติเมตร (ไพศาล, 2007) แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ อินฟันดิบูลัมเป็นท่อนำไข่ส่วนต้นที่เชื่อมต่อกับรังไข่ ขอบของอินฟันดิบูลัมมีลักษณะคล้ายนิ้วมือที่เรียกว่า fimbriae ทำหน้าที่ในการโบกพัดโอโอไซต์ให้เข้าสู่ท่อนำไข่ในช่วงที่มีการตกไข่ ส่วนถัดมาเรียกว่า แอมพูลลาเป็นท่อนำไข่ส่วนกลางก่อนที่จะต่อไปยังท่อนำไข่ส่วนท้ายคือ อิสธ์มัส บริเวณรอยต่อของทั้งสองส่วนนี้เรียกว่า ampullary-isthmic junction (AIJ) ส่วนนี้ในโคและกระบือเป็นบริเวณที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (Bergqvist et al., 2005) เมื่อเซลล์อสุจิเคลื่อนที่เข้ามาใกล้โอโอไซต์ที่ AIJ จะมีการเปลี่ยนแปลงของ plasma membrane ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการคาปาซิเตชั่นของเซลล์อสุจิ (sperm capacitation) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิด้วย (Rodriguez-Martinez et al., 2005) ส่วนสุดท้ายที่เรียกว่าอิสธ์มัสจะต่อกับปีกมดลูก โดยรอยต่อนี้เรียกว่า uterotubal junction (UTJ) โดยโครงสร้างของ UTJ ทำหน้าที่ในการปกป้องไม่ให้สิ่งแปลกปลอมและเซลล์เม็ดเลือดขาวจากมดลูกรุกล้ำเข้ามาภายในท่อนำไข่ และควบคุมปริมาณเซลล์อสุจิที่จะเดินทางไปปฏิสนธิ (Suarez, 2008) โดยอาศัยกลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิที่เกิดขึ้นบริเวณรอยต่อนี้และส่วนท้ายของอิสธ์มัส (caudal isthmus) (Suarez, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า

เซลล์เยื่อบุภายในอินฟันดิบูลัมและแอมพูลลา เป็นเซลล์ที่มีซีเลียมากเป็นพิเศษในระยะก่อนการตกไข่หรือระยะฟอลลิคูลาร์ เพื่อทำหน้าที่ในการรับและโบกพัดโอโอไซต์ที่ตกลงมา ก่อนจะส่งต่อไปยังบริเวณ AIJ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิขึ้น (Hunter, 1998) แตกต่างกับระยะลูเตียลซึ่งเป็นระยะภายหลังการตกไข่ จำนวนของเซลล์ที่มีซีเลียจะลดจำนวนลงอย่างมาก (Abe et al., 1993) เพื่อปรับเยื่อบุให้เหมาะสมกับการทำงาน

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่ แบ่งออกเป็นชั้น endosalpinx, myosalpinx และ mesosalpinx โดย endosalpinx ประกอบด้วย 2 ส่วนคือชั้นเยื่อบุท่อนำไข่ (oviductal epithelium หรือ non-gland mucosa) และชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุ (subepithelial connective tissue layer หรือ propia-submucosa) ซึ่งเต็มไปด้วย lymphocytes, plasma cells, mast cells และ eosinophils รวมทั้งเส้นใยจำนวนมาก ชั้นถัดมาคือ myosalpinx เป็นชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่จัดเรียงตัวสองชั้นได้แก่กล้ามเนื้อตามแนวยาวซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ชั้นนอก และกล้ามเนื้อแนวขวางจัดเรียงตัวอยู่ด้านใน และชั้น mesosalpinx ต่อเนื่องไปกับเยื่อบุช่องท้อง (Rodriguez-Martinez, 2007) ในโคและกระบือ ชั้น endosalpinx จะยื่นเข้าไปในช่องว่างเป็น primary folds, secondary folds และ tertiary folds (Priedkalns, 1987) เยื่อบุของท่อนำไข่จะเป็นแบบ simple columnar หรือแบบ pseudostratified epithelium ประกอบด้วยเซลล์ 2 ลักษณะคือเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์คัดหลั่งซึ่งปกคลุมด้วยไมโครวิลไล เซลล์เยื่อบุจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นแตกต่างกันตลอดวงรอบการเป็นสัด ตัวอย่างเช่น ท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัมและแอมพูลลาในระยะฟอลลิคูลาร์ จะพบว่าเซลล์ชนิดที่มีซีเลียจะมีสัดส่วนมากกว่าระยะลูเทียลอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่ในระยะลูเตียลจำนวนเซลล์คัดหลั่งจะเพิ่มมากขึ้น (Abe et al., 1999) พบว่า ท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัสและ UTJ ปริมาณเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตสารคัดหลั่งกลับไม่มีความแตกต่างมากนัก เมื่อเปรียบเทียบในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล ซึ่งเป็นผลมาจากการปรับโครงสร้างหน้าที่ให้เหมาะสมกับการทำงานในแต่ละช่วงของวงรอบการเป็นสัด (Tienthai et al., 2009) ท่อนำไข่ทำหน้าที่หลักในการขนส่งเซลล์อสุจิเพื่อเข้าไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ และเคลื่อนย้ายตัวอ่อนในระยะที่กำลังพัฒนามาฝังตัวยังบริเวณปีกมดลูก สำหรับเซลล์คัดหลั่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนและไกลโคโปรตีน เพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้มีความพร้อมในกระบวนการปฏิสนธิ (Abe et al., 1993) จึงได้มีการผลิตของเหลว (oviductal fluid) เพื่อปรับสภาพท่อนำไข่ให้มีความเหมาะสมกับสภาพของเซลล์อสุจิและโอโอไซต์ (Tienthai et al., 2000) นอกจากนี้ ยังมีกลไกที่ช่วยเพิ่มโอกาสที่จะทำให้การปฏิสนธิสำเร็จมากขึ้น คือ กลไกในการกักเก็บเซลล์อสุจิเพื่อควบคุมปริมาณเซลล์อสุจิก่อนที่จะเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อนำไข่ (Suarez, 2002)

การเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของกระบือ

กระบือปลักเพศเมีย จะเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และแสดงอาการเป็นสัดครั้งแรกเมื่ออายุได้ประมาณ 21-24 เดือน โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยในการตั้งท้องครั้งแรกอยู่ที่ 250-275 กิโลกรัม (Hafez, 1993) กระบือปลักที่ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอหรืออยู่ในสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตรวมถึงการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ช้ากว่าปกติ (Dopson and Kamonpatana, 1986) เมื่อเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ กระบือปลักจะแสดงอาการเป็นสัดซึ่งกินระยะเวลาประมาณ 19.9 ชั่วโมง (เฉลี่ยแล้วประมาณ 15.5-24.3 ชั่วโมง) ลักษณะที่สามารถสังเกตเห็นได้จากภายนอก คือ ปากช่องคลอดจะมีลักษณะบวมแดงและมีเมือกไหลออกมา (Kanai and Shimizu, 1983) วงรอบการเป็นสัดของกระบือจะอยู่ในช่วง 21 วัน หรืออาจแปรผันอยู่ในช่วง 18-24 วัน (Drost, 2007) วงรอบการเป็นสัดของกระบือปลักแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ในระยะแรกกระบือเพศเมียจะมีอาการกระสับกระส่ายไม่อยู่กับที่และไม่ยอมให้กระบือเพศผู้ขึ้นทับเพื่อผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นระยะที่เรียกว่าโปรเอสตรัส (proestrus) จากนั้นก็จะเข้าสู่ระยะที่ 2 เรียกว่าระยะเอสตรัส (estrus) อวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือเพศเมียจะเปียกชุ่มและยอมให้กระบือเพศผู้ขึ้นผสมพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดระยะนี้ก็จะเข้าสู่ระยะเม็ทเอสตรัส (metestrus) และระยะไดเอสตรัส (diestrus) ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายที่มีช่วงเวลาที่ค่อนข้างยาว

กระบือปลักจะเริ่มตกไข่ (ovulation) หลังจากแสดงอาการเป็นสัดแล้วประมาณ 30 ชั่วโมง (เฉลี่ยประมาณ 18-45 ชั่วโมง) (Drost, 2007) ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) ที่กระตุ้นให้รังไข่มีการเจริญของฟอลลิเคิลและทำให้เกิดการตกไข่เกิดขึ้น (Camous et al., 1985) วันแรกที่กระบือปลักเริ่มแสดงเข้าสู่ระยะเอสตรัส (day 0) ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดซึ่งอยู่ในระดับที่ต่ำมากประมาณ 0.13-0.27 ng/ml (Dopson and Kamonpatana, 1986) และอยู่ในระดับคงที่ไม่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งกระบือเข้าสู่ระยะเอสตรัสได้ประมาณ 5 วัน (day 5) ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆและเพิ่มจนถึงระดับสูงสุดเมื่อผ่านไป 10 วัน (day 10) โดยระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะอยู่ในช่วง 1.5-2.6 ng/ml จากนั้นจึงค่อยๆลดลงในช่วง 5 วันก่อนที่จะเข้าสู่ช่วงเอสตรัสอีกครั้งหนึ่ง สำหรับฮอร์โมน LH เมื่อเข้าสู่ช่วงระยะลูเตียลช่วงกลาง (mid-luteal phase) ก็จะค่อยๆ ลดลงและเริ่มมีระดับสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะฟอลลิคูลาร์ (Kanai and Shimizu, 1984) เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการตกไข่ครั้งต่อไป ถ้าไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น มดลูกจะหลั่งฮอร์โมนพลอสตาแกลนดินเอฟทูอัลฟา (prostaglandin F2alpha, PGF2α) ออกมาเพื่อทำให้คอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ฝ่อลง (Rensis and Lopez-Gatius, 2007) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของวงรอบการเป็นสัด

รังไข่ของกระบือปลักมีลักษณะคล้ายรูปไข่และขนาดค่อนข้างเล็ก มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 3.0x2.5x1.5 เซนติเมตร น้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 2.9-6.1 กรัม (Drost, 2007) โดยสภาพปกติที่กระบือยังไม่เข้าสู่วัยการเจริญพันธุ์ ผิวของรังไข่จะค่อนข้างเรียบ แต่เมื่อเข้าสู่วงรอบการเป็นสัด ผิวของรังไข่จะมีลักษณะขรุขระที่เกิดจากการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ รวมทั้งถ้ามีการตกไข่เกิดขึ้นก็จะมีการเจริญของคอร์ปัสลูเทียมยื่นนูนขึ้นมาด้วย (ไพศาล, 2007) ขนาดของฟอลลิเคิลที่พร้อมสำหรับการตกไข่จะมีขนาดประมาณ 10 มิลลิเมตร หลังจากที่มีการตกไข่แล้ว ฟอลลิเคิลที่ผ่านการตกไข่จะมีหลอดเลือดมาเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น พร้อมเปลี่ยนแปลงกลายเป็นคอร์ปัสฮีโมราจีกัม (corpus haemorrhagicum) และเจริญเป็นคอร์ปัสลูเทียมในที่สุด เพื่อผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยขนาดของคอร์ปัสลูเทียมในกระบือมีขนาดประมาณ 10-15 มิลลิเมตร (Drost, 2007) ลักษณะของคอร์ปัสลูเทียมในกระบือปลักมีสีเทา ขณะที่ในโคจะมีสีเหลือง และมีหลอดเลือดแดงมาเลี้ยงบริเวณรอบๆ เมื่อคอร์ปัสลูเทียมฝ่อตัวลงหลอดเลือดก็จะค่อยๆ หายไปในที่สุด (Dopson and Kamonpatana, 1986)

การเดินทางของเซลล์อสุจิภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

การเดินทางของเซลล์อสุจิ (sperm transportation) เริ่มตั้งแต่บริเวณที่เกิดการหลั่งน้ำเชื้อภายในช่องคลอดหรือปากมดลูก จนถึงบริเวณท่อนำไข่ส่วนรอยต่อระหว่างอิสธ์มัสกับแอมพูลลา (AIJ) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้นทั้งในสุกรและกระบือ ปัญหาจากการผสมไม่ติดในสัตว์เศรษฐกิจ โดยส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการมีจำนวนเซลล์อสุจิรอดชีวิตไม่มากพอที่จะเดินทางไปจนถึงท่อนำไข่ (Hawk, 1983) มดลูกเป็นอวัยวะที่สามารถติดต่อกับภายนอกร่างกายได้ จึงเป็นบริเวณที่อาจได้รับการติดเชื้อได้ง่าย ดังนั้นภายในมดลูกจึงต้องมีระบบป้องกันตัวเองเพื่อปกป้องการบุกรุกจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก เช่น ค่าความเป็นกรดและเบส (pH) ระบบภูมิคุ้มกันภายใน รวมถึงจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (Suarez and Pacey, 2006) ในโคและกระบือ เซลล์อสุจิจะมีปริมาณค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นแต่จะมีความเข้มข้นสูง เมื่อมีการผสมพันธุ์ เซลล์อสุจิที่หลั่งออกมาจะผ่านเข้าสู่ปากมดลูกซึ่งเต็มไปด้วยเมือกข้นเหนียวมากมาย ทำหน้าที่คัดเลือกเซลล์อสุจิที่อ่อนแอหรืออาจมีลักษณะผิดปกติไม่ให้ผ่านเข้าไปภายในได้ (Mortimer et al., 1982) จากการศึกษาในมนุษย์พบว่า เมือกข้นเหนียวที่ปากมดลูก จะทำหน้าที่ในการป้องกันอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียได้ดีที่สุด เพราะเป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นประโยชน์คอยดักจับสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกอาศัยอยู่มากที่สุด (Yudin et al., 1989) หลังจากนั้น เซลล์อสุจิต้องเดินทางผ่านเข้าสู่มดลูกซึ่งมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นบริเวณที่พร้อมทำลายสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก รวมถึงเซลล์อสุจิด้วย (Suarez and Pacey, 2006) สอดคล้องกับการศึกษาในเยื่อบุโพรง

มดลูกของสุกร โดยพบว่าในระยะโปรเอสตรัสและเอสตรัส ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่จะมีการผสมพันธุ์ จะมีการปรากฏของ lymphocytes, neutrophils และ macrophages มากขึ้น (Kaeoket et al., 2002) และแน่นอนว่าการเพิ่มขึ้นดังกล่าวนี้อาจเป็นการตอบสนองของร่างกาย เพื่อเตรียมกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่กำลังเข้ามาในระหว่างที่มีการผสมพันธุ์ ผนังมดลูกจะมีการบีบรัดเพื่อช่วยให้เซลล์อสุจิสามารถเดินทางได้เร็วขึ้น (Vandemark and Hays, 1952) เพื่อให้มีโอกาสหลบรอดจากการโดนทำลายจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าเซลล์อสุจิของโคจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที ในการที่จะเดินทางจากปากมดลูกไปจนถึงส่วนปลายของท่อนำไข่ (Vandemark and Moeller, 1951) จากการศึกษาในโคและแกะ พบว่า ชั้น myometrium ในระยะเอสตรัส จะมีการบีบตัวมากกว่าในระยะอื่นๆ ของวงรอบการเป็นสัด (Hawk, 1983) ซึ่งเป็นการปรับสภาพการทำงานภายในร่างกายให้เหมาะสมต่อการทำงานในแต่ละช่วงของวงรอบการเป็นสัด ระหว่างที่เซลล์อสุจิเดินทางภายในระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย แน่นอนว่า เซลล์อสุจิส่วนใหญ่จะถูกกำจัดโดยการเก็บกินของเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในมดลูก (Suarez, 2008) และเซลล์อสุจิที่สามารถรอดพ้นจากการถูกทำลาย ก็จะเคลื่อนที่ต่อไปยังท่อนำไข่โดยการบีบตัวในชั้น myometrium ของมดลูก ซึ่งเป็นช่วงแรกของการเดินทางของเซลล์อสุจิที่เรียกว่า rapid phase (Hafez, 1993) ก่อนเข้าสู่ท่อนำไข่ เซลล์อสุจิจำนวนมากจะมารวมกันอยู่ที่บริเวณ UTJ และมีการยึดจับกันระหว่างเซลล์อสุจิและเซลล์เยื่อบุของ UTJ และส่วนท้ายของอิสธ์มัสเกิดเป็นบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) ขึ้นมา (Suarez, 2002; Rodriguez-Martinez et al., 2005) ซึ่งเป็นช่วงที่สองของการเดินทางของเซลล์อสุจิ จากการศึกษาพบว่ามีหลายปัจจัยที่ช่วยทำให้กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิสามารถเกิดขึ้นได้ เช่น สารคัดหลั่งที่ถูกหลั่งออกมาภายในบริเวณที่เกิดการกักเก็บเซลล์อสุจิ และภายใน UTJ นี้จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์อสุจิในปริมาณน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับภายในมดลูกและช่องคลอด (Hafez, 1993) การศึกษาในโค ภายหลังจากที่น้ำเชื้อถูกหลั่งออกมา เซลล์อสุจิจะถูกเคลือบด้วยโปรตีนกลุ่ม bovine plasma proteins (BSPs) ที่หลั่งออกมาจากต่อมลูกหมากและเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ seminal plasma ทั้งหมด (Manjunath and Sairam, 1987) โปรตีนกลุ่ม BPSs โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PDC-109 ทำหน้าที่สำคัญในการช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดจับของเซลล์อสุจิกับผนังเยื่อบุภายในท่อนำไข่ในช่วงที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิ (Gwathmey et al., 2006) ก่อนที่เซลล์อสุจิจะเข้าสู่การเดินทางช่วงสุดท้าย ซึ่งเซลล์อสุจิที่ถูกกักเก็บไว้จะมีการเคลื่อนที่อย่างช้าๆ ออกจากที่บริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิไปยังบริเวณที่มีการปฏิสนธิ (Suarez and Pacey, 2006) หลังจากที่เซลล์อสุจิเคลื่อนที่ออกมา จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับเซลล์ดังกล่าวนี้ 2 ประการ เพื่อเตรียมพร้อมที่จะปฏิสนธิกับโอโอไซต์คือ การเกิดคาปาซิเตชัน (Rodriguez-martinez, 2007) และการเคลื่อนที่แบบ hyperactivation (Suarez, 2002) การคาปาซิเตชันเป็น

กลไกที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงภายในเยื่อหุ้มของเซลล์อสุจิ (plasma membrane) นั่นคือการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบโปรตีนและคลอเรสเตอรอล เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการที่จะเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ก่อนเข้าปฏิสนธิ (De Jonge, 2005) ในระหว่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาดังกล่าว เซลล์อสุจิจะมีการเคลื่อนที่แบบ hyperactivation ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่ชนิดที่มีแบบแผน และเพิ่มความสามารถในการสลัดตัวเองให้หลุดออกจากเยื่อบุภายในท่อนำไข่ ตลอดจนมีความสามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างที่มีความซับซ้อนภายในท่อนำไข่จนถึง zona pellucida ของโอโอไซต์เพื่อเข้าไปปฏิสนธิได้ในที่สุด (Ho and Suarez, 2001)

กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิ

ท่อนำไข่มีบทบาทสำคัญต่อความสำเร็จในการเข้าปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ไม่ว่าจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ โดยใช้สารจำพวกกลูโคส แลคเตส และโพแทสเซียมที่หลั่งออกมาในท่อนำไข่ (Menezo and Guerin, 1997) หรือเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการปฏิสนธิดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่การที่เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่มีจำนวนมากต่อการหลั่งน้ำเชื้อหนึ่งครั้ง ไม่สามารถจะยืนยันได้ว่าการปฏิสนธิจะสำเร็จเสมอไป เนื่องจากภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียเมื่อเริ่มมีการผสมพันธุ์ เซลล์อสุจิต้องเดินทางผ่านช่องคลอดไปยังมดลูกที่เต็มไปด้วยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจำนวนมาก ซึ่งมีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก (Phichitrasilp et al., 2009) ในโค เซลล์อสุจิจำนวนหลายล้านตัวเมื่อเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ท้ายที่สุดจะมีเซลล์อสุจิเพียงไม่กี่พันตัวเท่านั้น ที่สามารถเข้าไปถึงท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัสได้ (Suarez et al., 1997) เนื่องจากเซลล์อสุจิเหล่านี้โดยส่วนใหญ่จะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการศึกษาพบว่า seminal plasma ที่เคลือบอยู่บนเซลล์อสุจิ นอกจากจะมีผลต่อการเคลื่อนไหวและความอยู่รอดของเซลล์อสุจิแล้ว ยังเป็นปัจจัยกระตุ้นที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันภายในมดลูกทำงานเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก (Robertson, 2005) สิ่งนี้จึงเป็นปัจจัยหนึ่งในหลายๆ ปัจจัยที่ทำให้เซลล์อสุจิส่วนใหญ่ถูกทำลายภายในมดลูก ดังนั้น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่อยู่ภายในมดลูกจึงมีส่วนในการทำหน้าที่สำคัญเพื่อลดจำนวนเซลล์อสุจิลง เพื่อให้มีจำนวนเซลล์อสุจิในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงแรกก่อนที่จะเดินทางเข้าสู่ท่อนำไข่ (Schuberth et al., 2008) จากนั้น สภาพภายในท่อนำไข่จะทำหน้าที่คัดเลือกเซลล์อสุจิที่ยังมีประสิทธิภาพดีเพียงพอสำหรับการปฏิสนธิ รวมทั้งยังทำหน้าที่ควบคุมเวลาในการปลดปล่อยให้เซลล์อสุจิสามารถผ่านเข้าไปยังบริเวณที่มีการปฏิสนธิได้ จึงจำเป็นต้องมีกลไกหลายชนิดทำหน้าที่ในการควบคุมการเดินทางของเซลล์อสุจิไปยังท่อนำไข่ (Suarez, 2008)

โดยทั่วไป กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิ เป็นกระบวนการภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มความสามารถในการการยึดจับระหว่างเซลล์อสุจิ และเซลล์เยื่อบุภายในท่อนำไข่ ทำให้กลายเป็นบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการรอดชีวิตของเซลล์อสุจิก่อนที่จะเดินทางไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (Suarez, 2002) กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิในท่อนำไข่สามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น หนู (Suarez, 1987) สุกร (Hunter, 1981; Rodriguez-Martinez et al., 2005) โค (Gwathmey et al., 2006) และม้า (Thomas et al., 1994) กลไกดังกล่าวนี้เกิดขึ้นอย่างเด่นชัดที่บริเวณ UTJ และส่วนท้ายของอิสธ์มัส (Suarez, 2002; Rodriguez-Martinez et al., 2005) ในการที่จะสร้างบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิขึ้นใน UTJ และอิสธ์มัสนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องอาศัยองค์ประกอบภายในร่างกายหลายปัจจัยให้เข้ามามีส่วนร่วม ไม่ว่าจะเป็นการยับยั้งการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิในช่วงก่อนที่จะมีการตกไข่เกิดขึ้น โดยอาศัยโครงสร้างที่ซับซ้อนของ mucosal fold ภายในท่อนำไข่ (Hunter et al., 1991) การขัดขวางไม่ให้เซลล์อสุจิสามารถเดินทางผ่านไปยังท่อนำไข่ส่วนบนได้ง่ายโดยอาศัยเมือกข้นเหนียว (mucus) ที่เคลือบอยู่บนเซลล์เยื่อบุ (Suarez et al., 1991) ซึ่งเมือกข้นเหนียวเหล่านี้ นอกจากจะลดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิแล้ว ยังเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะระหว่างเซลล์อสุจิกับบริเวณส่วนบนของเซลล์เยื่อบุผิวอีกด้วย (Suarez, 2002; 2008) นอกจากนี้ ในช่วงก่อนการตกไข่ ช่องว่างภายในท่อนำไข่จะแคบมาก เนื่องมาจากเซลล์เยื่อบุผิวมีความหนาตัวมากขึ้นจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Hafez, 1993) ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะระหว่างเซลล์อสุจิกับบริเวณส่วนบนของเซลล์เยื่อบุผิวให้มากยิ่งขึ้น รายงานการวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการค้นพบว่าสารจำพวก glycosaminoglycans (GAGs) บางชนิด มีส่วนช่วยคงสภาพการเคลื่อนที่และความมีชีวิตอยู่รอด รวมถึงเหนี่ยวนำการเกิดคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิ (Parrish et al., 1989; Tienthai et al., 2000; Bergqvist et al., 2005b) จากการศึกษาภายในท่อนำไข่ของโคได้ ยังมีการค้นพบ CD44 ซึ่งเป็นตัวรับของ hyaluronan (HA) โดย hyaluronan เป็นสารในกลุ่มของ GAGs ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต อยู่ภายในท่อนำไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ ส่วนท้ายของอิสธ์มัสซึ่งเป็นบริเวณที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิ ซึ่งพบการปรากฏของ CD44 มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนอื่น (Bergqvist et al., 2005b) ดังนั้น GAGs อาจเป็นหนึ่งในหลายๆ ปัจจัยในการช่วยในกลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิให้สามารถทำงานได้ดียิ่งขึ้น

เป็นที่ทราบดีว่า เซลล์อสุจิจะถูกกักเก็บภายใน UTJ และส่วนท้ายของอิสธ์มัสในช่วงระยะหนึ่งก่อนที่จะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาที่ใกล้จะมีการตกไข่เกิดขึ้น (Hunter, 2005) ซึ่งการปลดปล่อยเซลล์อสุจิออกจากบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิจะเกิดขึ้น โดยเซลล์อสุจิจะค่อยๆ หลุดออกจากผนังเยื่อบุของท่อนำไข่ แต่ไม่ใช่เซลล์อสุจิทั้งหมดที่สามารถหลุดออกมาได้ (Suarez, 2002)

ดังนั้น เซลล์อสุจิของโคและสุกรจำนวนหลายล้านตัวเมื่อเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ท้ายที่สุดจะมีเซลล์อสุจิเพียงไม่กี่พันตัวที่สามารถเข้าไปถึงท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัสได้ (Hunter, 1981; Suarez et al., 1997; Rodriguez-Martinez et al., 2005) กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิ จึงเป็นกลไกในการควบคุมเซลล์อสุจิให้มีปริมาณที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพดีเพียงพอ รวมทั้ง มีความพร้อมสำหรับกลไกการคาปาซิเตชันและการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมก่อนเข้าปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยเซลล์อสุจิส่วนใหญ่จะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย และกักเก็บเซลล์อสุจิส่วนที่เหลือเอาไว้จนใกล้ถึงช่วงเวลาก่อนมีการตกไข่ (Suarez, 2008) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า กลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิภายในส่วน UTJ และอิสธ์มัส ทำหน้าที่สำคัญ 3 ประการคือ ช่วยป้องกันการเกิด polyspermic fertilization โดยการปล่อยให้เซลล์อสุจิจำนวนเพียงเล็กน้อยสามารถผ่านเข้าไปยังท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาได้ในเวลาที่เหมาะสม ช่วยรักษาความสมบูรณ์และประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิให้คงอยู่จนถึงช่วงเวลาที่มีการตกไข่เกิดขึ้น และประการสุดท้าย เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาของเซลล์อสุจิโดยเฉพาะการคาปาซิเตชัน และการเคลื่อนไหวที่เรียกว่า hyperactivation เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์อสุจิจะอยู่ในสภาพที่เหมาะสมที่สุดเมื่อมีการตกไข่ (Suarez, 2002) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่า กลไกกักเก็บเซลล์อสุจิจะเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น นอกจากปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว เซลล์อสุจิจำเป็นต้องมีชีวิตอยู่รอดได้ท่ามกลางเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่มากมายภายในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย การศึกษาที่ผ่านมาได้ค้นพบการทำงานภายในท่อนำไข่โค ที่คาดว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็น immune privilege organ ซึ่งอาจเกี่ยวกับการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์อสุจิภายในบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิโดยตรง (Bergqvist et al., 2005a)

การทำงานของ immune privilege organ

ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่หลักในการทำลายสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย เพื่อปกป้องตัวเองไม่ให้ได้รับอันตรายโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบขึ้น แต่บางครั้ง กลไกในการทำลายสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่รอบๆ ทำให้เกิดความเสียหายขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่าอวัยวะโดยส่วนใหญ่ภายในร่างกายมีความสามารถที่จะทนต่อการอักเสบที่เกิดขึ้น แต่ในบางอวัยวะ ตัวอย่างเช่น นัยน์ตาและอัณฑะ ไม่สามารถที่จะทนต่อกระบวนการอักเสบเหล่านี้ (Nagata, 1997) ดังนั้น อวัยวะที่มีความไวต่อการถูกทำลายได้ง่ายดังกล่าว จึงต้องอาศัยกลไกที่เรียกว่า immune privilege ช่วยป้องกันไม่ให้ได้รับผลกระทบจากการอักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย (Green and Ferguson, 2001) กล่าวได้ว่ากลไก immune privilege เป็นกลไกภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่

ปกป้องเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีความไวรับต่อการถูกทำลาย โดยระบบภูมิคุ้มกันของตัวเองไม่ให้ถูกทำลายเสียหาย โดยกลไกนี้ทำให้เซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันสูญเสียคุณสมบัติในการทำงานไม่ให้เซลล์ดังกล่าวไปทำอันตรายต่อเซลล์ที่อยู่รอบๆ ได้ (Arck et al., 2008) อวัยวะที่พบกลไกในการทำงานของ immune privilege ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต พบได้ที่ นัยน์ตา (Ghosh et al., 2008) รก (Hunt et al., 1997; Kauma et al., 1999) สมอง (Carson et al., 2006) รูขุมขน (hair follicle) (Ito et al., 2008) และ อัณฑะ (Filippini et al., 2001) เป็นต้น

การทำงานของกลไก immune privilege ปรากฏในหลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็น การใช้ข้อได้เปรียบด้านลักษณะทางกายวิภาค เพื่อป้องกันการบุกรุกของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Arck et al., 2008) การทำงานในลักษณะนี้เป็นที่รู้จักกันดีภายในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีกลไกการปกป้องตัวเองจากผลกระทบของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยอาศัย blood brain barrier ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นจากผนังเซลล์เยื่อบุของหลอดเลือดฝอยภายในสมอง ทำหน้าที่พิเศษในการป้องกันไม่ให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเดินทางผ่านกระแสเลือดเข้ามายังบริเวณนี้ได้ (Carson et al., 2006) หรือภายในนัยน์ตาที่พบกลไก blood-ocular barrier เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาเช่นเดียวกัน (Green and Ferguson, 2001) นอกจากกลไก blood brain barrier แล้ว ยังพบว่ากลไกการยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) เพื่อยับยั้งการแสดงออกของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) และ insulin like growth factor (IGF-1) ซึ่งพบได้ภายในรูขุมขน (Paus et al., 2003) รวมทั้ง การอาศัยเมือกข้นเหนียวคล้ายเจลที่ปรากฏพบภายในลำไส้ ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายถูกทำลาย (Sonnenburg et al., 2004) และสุดท้ายคือการกำจัดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเหนี่ยวนำเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ ตัวอย่างเช่น การควบคุมปริมาณของ T-cells โดยอาศัยการทำงานของระบบ Fas-FasL (Lenardo et al., 1999) ในบางอวัยวะ พบว่า การทำงานของ immune privilege ที่จะมีประสิทธิภาพสมบูรณ์ได้ จำเป็นต้องอาศัยกลไกหลายๆ อย่างร่วมกันในการทำหน้าที่ดังกล่าว ดังเช่น ที่ปรากฏภายในนัยน์ตา (Stein-Streilein, 2008) ซึ่งอาศัยการทำงานของกลไกยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันในการลดปริมาณของ TH1-cells (Taylor, 2007) การใช้ blood-ocular barrier เพื่อป้องกันการรุกล้ำเข้ามาของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และการแสดงออกของโปรตีน FasL เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการตายของ T-cells ที่อาจเข้ามาทำความเสียหายบริเวณกระจกตา (Stuart et al., 1997) เป็นต้น จึงอาจกล่าวได้ว่าการทำงานของ immune privilege เป็นกลไกหลักในการปกป้องเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สำคัญภายในร่างกาย ไม่ให้ได้รับผลกระทบจากการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายโดยอาศัยวิธีต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมา และเมื่อไม่นานมานี้ ได้มี

การพบว่าการทำงานของโปรตีน Fas และ FasL มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานแบบ immune privilege ซึ่งสามารถพบได้ภายในท่อนำไข่ (Bergqvist et al., 2005a)

ระบบ Fas และ FasL

Fas (APO-1/CD95) จัดเป็น protein receptor membrane type I อยู่ในกลุ่มของ tumour necrosis factor (TNF) โครงสร้างของ Fas ประกอบไปด้วย cysteine จำนวน 3 แขน และมีจำนวนของ intracellular death domain อยู่ประมาณ 80 หมู่กรดอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนสื่อกลางในการส่งสัญญาณให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ (O'connell, 2001) Fas เป็นโปรตีนตัวรับบนผิวหน้าของเซลล์ที่สามารถพบได้ในเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น ในรก มีการแสดงออกของ Fas บริเวณ decidual cells (Kauma et al., 1999) และ ในอัณฑะ พบการแสดงออกของ Fas บริเวณเซลล์ spermatogonia (Lee et al., 1997) เป็นต้น สำหรับ Fas Ligand (FasL) จัดเป็น protein receptor membrane type II อยู่ในกลุ่มของ TNF และมีกรดอะมิโน 150 ตัวเป็นองค์ประกอบ (Nagata, 1999) ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน Fas สามารถพบได้ในหลายๆ อวัยวะทั่วร่างกาย แต่กลับพบว่าโปรตีน FasL จะแสดงออกในบริเวณที่จำกัดมากกว่า โดยการแสดงออกของโปรตีน FasL พบได้ที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและในอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege (O'connell, 2001) รวมถึงอวัยวะที่ไม่ได้มีการทำงานแบบ immune privilege แต่ไม่มีความไวรับต่อการถูกทำลาย เช่น หลอดอาหารและปอด ก็สามารถพบการแสดงออกของโปรตีน FasL ได้เช่นกัน (Xerri et al., 1997)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบการแสดงออกของ FasL ในเซลล์ต่างๆ เช่น splenocytes, thymocytes (Suda et al., 1993) natural killer (NK) cells (Montel et al., 1995) และ cytotoxic T-cells (Lynch et al., 1995) พบว่าโปรตีน FasL จะเก็บไว้ใน cytotoxic granules และ secretory lysosomes ใน cytotoxic T-cells และ NK cells โดยจะมีการปลดปล่อยออกมาเมื่อได้รับการกระตุ้น (Blott et al., 2001) แต่บางครั้งในสภาวะที่ T-cells ได้รับความเสียหาย เช่น จากรังสีอัลตร้าไวโอเล็ตหรือรังสีแกมม่า จะมีการกระตุ้นโปรตีน FasL ให้มีการแสดงออกมากขึ้นเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Kasibhatla et al., 1998) นอกจากนี้ในอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege การแสดงออกของ FasL มีส่วนในการทำหน้าที่สำคัญเพื่อช่วยให้เซลล์บริเวณรอบๆ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ โดยทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยเข้าไปจับกับ Fas (Green and Ferguson, 2001) จากการศึกษาพบว่า ถ้า Fas ได้รับการกระตุ้นจาก FasL จะทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Fas ได้ (Nagata, 1999) กลไกการทำงานของ Fas จะเริ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก FasL โดยโปรตีน

จำนวนมากจะมารวมตัวกันที่บริเวณ death domain ใน Fas เพื่อสร้างสัญญาณในการเหนี่ยวนำให้การเสื่อมตายของเซลล์หรือ death-inducing signaling complex (DISC) ขึ้นมา (Medema, 1997) ภายใน DISC จะมี Fas-associated death domain protein (FADD) สร้างสะพานเชื่อมระหว่าง Fas ที่ได้รับการกระตุ้นแล้วกับ enzyme pro-caspase-8 เข้าด้วยกัน FADD จะเป็นตัวกลางในการรวบรวม enzyme pro-caspase-8 ไปยัง Fas ที่ได้รับการกระตุ้นแล้ว ทำให้ enzyme pro-caspase-8 กลายเป็น enzyme caspase-8 ที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงานหรือที่เรียกกันว่า Fas-linked interleukin-1ß (IL-1ß)-concerting enzyme like protease (FLICE) (Chinnaiyan et al., 1995) enzyme caspase ที่เกิดกระบวนการ proteolysis กับโปรตีนที่มีความจำเพาะเจาะจงจะเป็นจุดศูนย์กลางที่ทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ขึ้น (Martin and Green, 1995) การทำงานของระบบ Fas-FasL สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ขึ้นมาโดยการจับกันระหว่างโปรตีน FasL กับ Fas ที่อยู่บนผิวของเซลล์นั้นๆ (Nagata, 1997) ซึ่ง Fas เป็นตัวรับที่สามารถพบได้ตามเซลล์ทั่วๆ ไปในร่างกายและในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นหาก FasL สามารถเข้าไปจับกับ Fas ที่อยู่บนบริเวณผิวหน้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ จะทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นได้ (Ferguson et al., 2002) ภายใน Fas การรับสัญญาณจาก FasL เพื่อก่อให้เกิดการตายของเซลล์ใน Fas ถูกควบคุมโดยโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมให้รูปแบบการตายของเซลล์อยู่ในภาวะที่สมดุล (Itoh et al., 1993) โดยการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 จะพบในบริเวณที่มีการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของระบบ Fas-FasL (Sugiura et al., 1999)

ในภาวะปกติ การทำงานของโปรตีน Fas และ FasL ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมปริมาณของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันไม่ให้มีปริมาณมากจนเกินระดับปกติ โดยทำให้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันมีการเสื่อมตายเกิดขึ้น (Green and Ferguson, 2001) แต่ในหนูชนิดที่เป็น lpr (lymphoproliferation) และชนิด gld (generalized lymphoproliferative desease) ซึ่งเป็นหนูที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยยีนภายในร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน Fas และ FasL ได้ตามลำดับ ผลจากการศึกษาภายในต่อมน้ำเหลืองและม้ามของหนูทั้ง 2 ชนิดพบว่า มีการสะสมของ T-cell มากเกินระดับปกติ (Nagata, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า การปลูกถ่ายกระจกตาในหนูชนิด gld จะมีการปฏิเสธจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย เนื่องจากในสภาพปกติ เซลล์เยื่อบุภายในกระจกตา จะทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยผ่านการแสดงออกของโปรตีน FasL ในการจับกับโปรตีน Fas ที่อยู่บนเซลล์เม็ดเลือดขาว แต่หนูชนิด gld ไม่สามารถที่จะสังเคราะห์โปรตีน FasL ได้จึงทำให้เนื้อเยื่อบริเวณกระจกตาได้รับความเสียหายจากการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน หลังจากที่มีการปลูกถ่ายกระจกตา (Stuart et al., 1997) จากการศึกษา

ดังกล่าวจึงช่วยสนับสนุนได้ว่า การทำงานของโปรตีน Fas และ FasL มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege organ

ตำแหน่งในการแสดงออกของโปรตีน FasL ภายในอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege สามารถพบได้ในหลายอวัยวะ เช่น บริเวณเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และบริเวณ endothelial cells ของกระจกตา (Stuart et al., 1997) ภายในเซลล์กล้ามเนื้อของมนุษย์ (Sugiura et al., 1999) ภายใน sertoli cells ของอัณฑะ (Lee et al., 1997) ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย พบการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้นที่ชั้น theca interna ภายในรังไข่ ทำให้การฝ่อสลายของฟอลลิเคิล (follicular regression) ล่าช้า (Isobe and Yoshimura, 1999) นอกจากนี้ ภายใน granulosa cells ก็พบการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของโปรตีน Fas และ FasL การเสื่อมตายของ granulosa cell มีผลยับยั้งการสร้างซีรั่มที่บริเวณดังกล่าว ทำให้โอโอไซต์อ่อนเกิดการฝ่อ ส่งผลให้โอโอไซต์ส่วนใหญ่ไม่เข้าสู่กระบวนการตกไข่ (Hu et al., 2001) นอกจากจะส่งผลดังกล่าวแล้ว ช่วงที่มีการพัฒนาของ cumulus cells ในโค พบว่าการทำงานของระบบ Fas-FasL และฮอร์โมน FSH เหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ที่ cumulus cells ได้เช่นกัน (Francisco et al., 2004) ในบางครั้งภายใต้การทดลองและควบคุมในห้องปฏิบัติการ การทำงานของระบบ Fas-FasL ในรังไข่ของมนุษย์ หนู และโค ค่อนข้างมีความไวสูงมากต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการเสื่อมตายของเซลล์ (Quirk et al., 1998) นอกจากนี้ ในช่วงที่มีการเจริญของตัวอ่อน การแสดงออกของ FasL มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการช่วยปกป้องตัวอ่อนในระยะฟีตัส จากการทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Hunt et al., 1997) จากการศึกษายังระบุอีกว่า บริเวณที่พบการกระจายตัวของโปรตีน FasL อย่างหนาแน่นคือ decidual cells ภายในมดลูกช่วงตั้งท้อง และจากการที่ trophoblast มีความสามารถที่เหนี่ยวนำ FasL เข้ามา เพื่อทำให้เกิดกระบวนการเสื่อมตายของเซลล์ได้อย่างอิสระ ชี้ให้เห็นว่า ระบบ Fas-FasL มีบทบาทสำคัญในการปกป้องตัวอ่อนจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของแม่สัตว์ได้ (Kauma et al., 1999) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น T-cells มีการแสดงออกของโปรตีน Fas-FasL เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการเสื่อมตายของเซลล์ภายในตัวมันเอง (Alderson et al., 1995) และทำให้ T-cells อื่นๆ เกิดการเสื่อมตายโดยกลไกดังกล่าวเพื่อควบคุมปริมาณเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (Lynch et al., 1995) ดังนั้นบทบาทของโปรตีน FasL ต่ออวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege คือ ทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในขณะที่มีการยินยอมให้เซลล์แปลกปลอมอื่นเข้ามาได้ ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งของการทำงานในระบบ Fas-FasL ที่เข้าไปมีบทบาทสำคัญใน immune privilege คือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในรูปแบบที่เซลล์บางเซลล์ได้รับการยกเว้นไม่ถูกทำลาย หรือถูก

โจมตีจากระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ โดยจำกัดการอักเสบที่จะเกิดขึ้นและยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อความอยู่รอดของแต่ละเซลล์ (O'connell, 2001)

การเสื่อมตายของเซลล์

การเสื่อมตายของเซลล์ (apoptosis) เป็นกลไกหนึ่งในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ทำงานควบคู่ไปกับการแบ่งตัวแบบไมโตสิส (mitosis) แต่ทำงานตรงกันข้ามกัน การเสื่อมตายของเซลล์ทำหน้าที่ในการควบคุมการเกิด cell deletion (Kerr et al., 1972) ทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ที่ไม่มีประโยชน์แล้วหรือเซลล์ที่ร่างกายไม่ต้องการ หรือเพื่อจัดรูปแบบของอวัยวะใหม่ (Haanen and Vermes, 1995) เช่น การเกิด metamorphosis ในแมลงชนิดต่างๆ (Clarke and Clarke, 1996) นอกจากนี้ ยังทำหน้าที่สำคัญหลายประการที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เช่น กำจัดเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ ควบคุม homeostasis ภายในร่างกาย (Oliveira and Gupta, 2008) เช่นในกรณีของ T-cells และ B-cells ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นใหม่ทุกวัน ทำให้มีปริมาณที่มากเกินความจำเป็นและไม่ได้ใช้งาน จึงต้องทำให้เซลล์เหล่านี้เกิดการเสื่อมตายขึ้น เพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกาย (Verbeke et al., 1999)

โดยปกติ การเสื่อมตายของเซลล์จะเกิดขึ้นในช่วงที่ร่างกายอยู่ในช่วงที่กำลังพัฒนาเพื่อควบคุมสมดุลของเซลล์ และควบคุมปริมาณเซลล์ในร่างกายให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (Susan, 2007) การทำงานที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเสื่อมตายของเซลล์ จะเริ่มจากการส่งสัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะไปยังเซลล์หรืออวัยวะเป้าหมาย เมื่อเซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายได้รับสัญญาณก็จะเริ่มทำให้เซลล์นั้นๆ เกิดการตายขึ้นและกำจัดเซลล์ที่ตายนั้นออกไป (Hacker, 2000) กลไกของการเสื่อมตายของเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ แบบ extrinsic หรือแบบ death receptor pathway และแบบ intrinsic หรือแบบ mitochondrial pathway (Susan, 2007) การเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นจาก death receptor pathway เกิดจากการส่งสัญญาณผ่านทาง death receptor โดยการส่งสัญญาณจะเริ่มต้นขึ้น เมื่อสมาชิกในกลุ่มของ tumor necrosis factor (TNF) เข้ามาจับกับ death receptor ที่อยู่บนผิวหน้าของเซลล์ (Nagata, 1999) การจับกันของตัวรับบนเซลล์เหล่านี้ ทำให้โปรตีนจำนวนมากภายในเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็น multi-protein death-inducing signaling complex (Marsden and Strasser, 2003) สารประกอบเชิงซ้อนนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์และกระตุ้นเอนไซม์ caspase 8 ให้เริ่มทำงาน จนทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ขึ้นในที่สุด (Salmena et al., 2003) สำหรับการเสื่อมตายของเซลล์แบบ mitochondrial pathway เริ่มจากการแทรกซึมของโปรตีน Bcl-2 ในกลุ่มของ proapoptotic เช่น Bax หรือ Bak (Rane and Klein, 2009) เข้ามาที่บริเวณ mitochondrial outer membrane

รวมถึงมีการปลดปล่อย cytochome C ที่อยู่ในชั้น mitochondrial intermembrane space ออกมา จากนั้น cytochome C จะไปกระตุ้น APAF-1 ให้ทำงานและรวบรวมเอ็นไซม์ caspase 9 จนเปลี่ยนเป็น apoptosome (Danial and Korsmeyer, 2004) เอ็นไซม์ caspase 9 มีหน้าที่ในการทำลายเอ็นไซม์ caspase 3 และเอ็นไซม์ caspase 7 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญต่อการสร้างผลผลิตทางชีวเคมีที่สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ ผลที่ตามมาคือเซลล์ไม่สามารถที่จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตได้ และเกิดการเสื่อมตายของเซลล์ขึ้นในที่สุด (Green, 2005)

จากการศึกษาที่ผ่านมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ในขณะที่เซลล์เกิดการตายจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง เซลล์จะมีการหดตัว ไซโตพลาสมมีความหนามากขึ้น และออร์แกเนลล์ต่างๆ มีการรวมตัวเข้าหากันแน่นมากขึ้น (Kerr et al., 1972) จากนั้น โครมาตินจะรวมตัวอัดแน่นเข้าด้วยกัน นิวเคลียสเริ่มแตกสลายออก แล้วเซลล์จะแตกออกกลายเป็นชิ้นเล็กๆ (Hotchkiss et al., 2009) เซลล์ที่เสื่อมตายเหล่านี้จะกลายเป็น apoptotic body และถูกทำลายด้วยเซลล์อื่นโดยผ่านกระบวนการย่อยโดยไลโซโซมตามปกติ (Hacker, 2000) ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 ทำหน้าที่ในการควบคุมการเสื่อมตายของเซลล์ภายในร่างกายให้อยู่สภาพที่เหมาะสม โปรตีนกลุ่มนี้พบได้ที่บริเวณไมโตคอนเดรีย (Monaghan, et al 1992) โดยกลุ่มของ Bcl-2 ประกอบไปด้วยกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการตายของเซลล์ (pro-apoptotic) และกลุ่มที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์ (anti-apoptotic) (Itoh et al., 1993) ซึ่ง Bcl-2 และ Bcl-xl เป็นโปรตีนกลุ่มที่ยับยั้งการเกิดรูปแบบการตายของเซลล์ โดยมีส่วนป้องกันไม่ให้เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียสูญสลาย และยับยั้งการปลดปล่อย cytochrome c ไม่ให้ออกสู่ cytosol เพื่อไม่ให้กลไกการส่งสัญญาณการเสื่อมตายของเซลล์ทำงานได้ ดังนั้น โปรตีนกลุ่ม Bcl-2 จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการอยู่รอดของ neutrophils และเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่น (Kunes et al., 2009)

การศึกษาในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า กลไกการเสื่อมตายตายของเซลล์นั้น มีบทบาทสำคัญมากต่อการพัฒนาและรักษาสภาพสมดุลของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Nagata, 1999) เช่น ในสภาวะร่างกายที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก จะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยการปล่อย neutrophils ออกมาเพื่อทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการร่างกายจะเหนี่ยวนำให้ neutrophils เกิดการเสื่อมตายเพื่อป้องกันไม่ให้ neutrophils ที่มีมากเกินไปทำลายเซลล์ภายในร่างกายด้วยกันเอง (Rane and Klein, 2009) นอกจากนี้ การเสื่อมตายของเซลล์ยังทำหน้าที่ในการคัดเลือก T-cells ที่เหมาะสมและควบคุมปริมาณของ T-cells โดยใช้กลไกการทำงานของระบบ Fas-FasL (Alderson et al., 1995) นอกจากนี้ กลไกดังกล่าวสามารถทำงานเป็นกลไกที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ภายในร่างกายด้วย โดยการทำให้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันถูกทำลาย อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกทั้งทางด้านสรีรวิทยาและทางพยาธิ

วิทยาจะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการเสื่อมตายของเซลล์ แต่ก็ไม่จำเป็นเสมอไปที่เซลล์ทุกเซลล์จะต้องมีการเสื่อมตายเกิดขึ้นในสภาวะที่ถูกกระตุ้นในลักษณะนั้น(Susan, 2007)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างปีกมดลูกและท่อนำไข่

การศึกษาในครั้งนี้ เก็บตัวอย่างปีกมดลูกและท่อนำไข่ของกระบือปลักไทย จากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่นในพื้นที่จังหวัดปทุมธานี นำตัวอย่างที่ได้เข้าสู่ห้องปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใน 40-45 นาที โดยเก็บรักษาในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาอุณหภูมิในระหว่างการขนส่งให้อยู่ประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส คัดแยกปีกมดลูกและท่อนำไข่ออกเป็นระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase, n=5) และระยะลูเตียลช่วงกลาง (mid-luteal phase, n=5) การแบ่งแยกทั้ง 2 ระยะ ทำได้จากการสังเกตลักษณะการปรากฏของคอร์ปัสลูเทียมและฟอลลิเคิลเด่นของรังไข่ ตามที่มีรายงานโดย Ali และคณะ (2003) จากนั้น ตัดแยกปีกมดลูกและท่อนำไข่ออกจากทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย เก็บรักษาไว้ใน 4% paraformaldehyde ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อจากปีกมดลูกและท่อนำไข่ทั้ง 2 ระยะ เข้าสู่กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยท่อนำไข่จะนำมาตัดออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ส่วนรอยต่อระหว่างปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (UTJ) อิสธ์มัส แอมพูลลา และอินฟันดิบูลัมนำชิ้นเนื้อทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการชะล้าง (washing) โดยน้ำประปาที่เปิดไหลผ่านเพื่อชะล้าง paraformaldehyde ส่วนเกินออกไป จากนั้น นำชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยใส่ในแอลกอฮอล์เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง และเข้าสู่กระบวนการเคลียริ่ง (clearing) และตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้นำมาผ่านขั้นตอนการแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) และฝังชิ้นเนื้อลงในพาราฟิน (embedding) และเข้าสู่กระบวนการตัดชิ้นเนื้อ (sectioning) ให้ได้ความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร จากนั้น นำไปวางลงบนแผ่นสไลด์ชนิด superfrost plus slide (Menzel-Graser, Frieburg, Germany) และอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง เพื่อเตรียมนำไปใช้สำหรับเทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมี และเทคนิคการตรวจหาการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay

เทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมี

ใช้เทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมีด้วยวิธี avidin-biotin-peroxidase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ดังที่มีรายงานโดย Bergqvist และคณะ (2005a) โดยแอนติบอดี้ปฐมภูมิในการตรวจหาโปรตีน Fas จะใช้ Fas monoclonal mouse anti-human antibody (B-10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 1:100 ขณะที่การตรวจหาโปรตีน FasL จะใช้ FasL polyclonal rabbit anti-rat antibody (N-20, Santa Cruz Biotechnology, USA) ที่ความเข้มข้น 1:150 และตรวจสอบผลการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง นำชิ้นเนื้อตัวอย่างมาขจัดพาราฟินออกด้วย xylene และเติมน้ำเข้ากลับเข้าเซลล์อีกครั้ง โดยใช้แอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปยังความเข้มข้นต่ำ หลังจากนั้นจึงล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดและแช่ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) เป็นเวลา 15 นาที นำชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการกระตุ้นเพื่อเปิดเผยแอนติเจน (antigen retrieval) โดยนำสไลด์แช่ใน citrate buffer (pH 6.0) และอบในไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 15 นาที (3 ครั้งๆ ละ 5 นาที) ทิ้งให้สไลด์เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปล้างในสารละลาย PBS เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ไว้ใน 3% hydrogen peroxide ที่ทำให้เจือจางด้วย methanol เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา endogenous peroxide activity จากนั้น นำไปล้างในสารละลาย PBS เป็นเวลา 5 นาที หยด 10% normal horse serum (สำหรับ Fas) และ 10% normal goat serum (สำหรับ FasL) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมา หยดแอนติบอดี้ปฐมภูมิของ Fas และ FasL ที่เจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 1:100 และ 1:150 ตามลำดับ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง (overnight) จากนั้น นำสไลด์มาล้างด้วย PBS และหยดด้วย biotinylated anti-mouse immunoglobulins สำหรับ Fas หรือ biotinylated anti-rabbit immunoglobulins สำหรับ FasL ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างออกด้วย PBS อีกครั้ง หยด avidin-biotin-complex (ABC) ลงบนสไลด์ ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำสไลด์มาล้างด้วย PBS และนำมาหยดด้วย substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB) ใน 0.1% H_2O_2 เป็นเวลา 1-3 นาที เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาบวกตรงบริเวณที่เกิดการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี้ จากนั้น นำสไลด์มาล้างด้วยน้ำประปา ย้อมด้วยสี Meyer's hematoxylin และปิดทับด้วย cover slip โดยใช้ glycerine gelatin เป็น mounting media ขั้นตอนสุดท้ายคือ การตรวจผลการติดสีบวกโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยกรณีที่ผลออกมาเป็นบวก การแสดงปฏิกิริยาจะปรากฏผลออกมาเป็นสีน้ำตาลในสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้อวัยวะที่ทราบผลของการติดสีบวกของโปรตีน

Fas และ FasL คือ รังไข่หนูไมซ์ เป็นสไลด์ควบคุมบวก (positive control) ขณะที่สไลด์ควบคุมลบ (negative control) จะใช้ IgG1 (1:100) แทนที่แอนติบอดี้ปฐมภูมิของ Fas และ FasL

เทคนิคการตรวจหาภาวะการเสื่อมตายของเซลล์

ใช้วิธี Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTPdigoxigenin nick end-labelling (TUNEL) assay ในการตรวจหาการสภาวะการเสื่อมตายของเซลล์ ตามที่มีการรายงานโดย Gavrieli และคณะ (1992) เริ่มจาก หยด 15 µg/ml proteinase K ที่เจือจางใน 0.1 M Tris-HCl buffer และผสมด้วย 0.05 M EDTA เป็นเวลา 30 นาที นำชิ้นเนื้อมาตรึงสภาพใน 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงหยดด้วย Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) buffer ที่มี 25 U/ml TdT, 1mM digoxigenin dUTP, 1mM dNTPs ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำสไลด์ชิ้นเนื้อมาทำการหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการหยด 0.3 M sodium chloride, 0.03 M sodium citrate เป็นเวลา 1-2 นาที นำสไลด์มาล้างด้วย PBS แล้วจึงหยด 0.2 M HCl เป็นเวลา 30 นาที เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา endogenous alkaline phosphatase activity ที่อาจเกิดขึ้นได้ ต่อมา นำสไลด์มาหยดด้วย AP-conjugated sheep anti-digoxigenin Fab fragments (1:1000) และนำมาหยดด้วย substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB) ใน 0.1% H_2O_2 เป็นเวลา 1-3 นาที จากนั้นนำสไลด์มาล้างด้วยน้ำประปาย้อมด้วยสี hematoxylin และปิดทับด้วย cover slip ตรวจผลการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างการศึกษาครั้งนี้ใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) เป็นสไลด์ควบคุมบวก ในขณะที่สไลด์ควบคุมลบจะไม่ใช้ TdT หรือ digoxigenin-dUTP หยดบนสไลด์ชิ้นเนื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

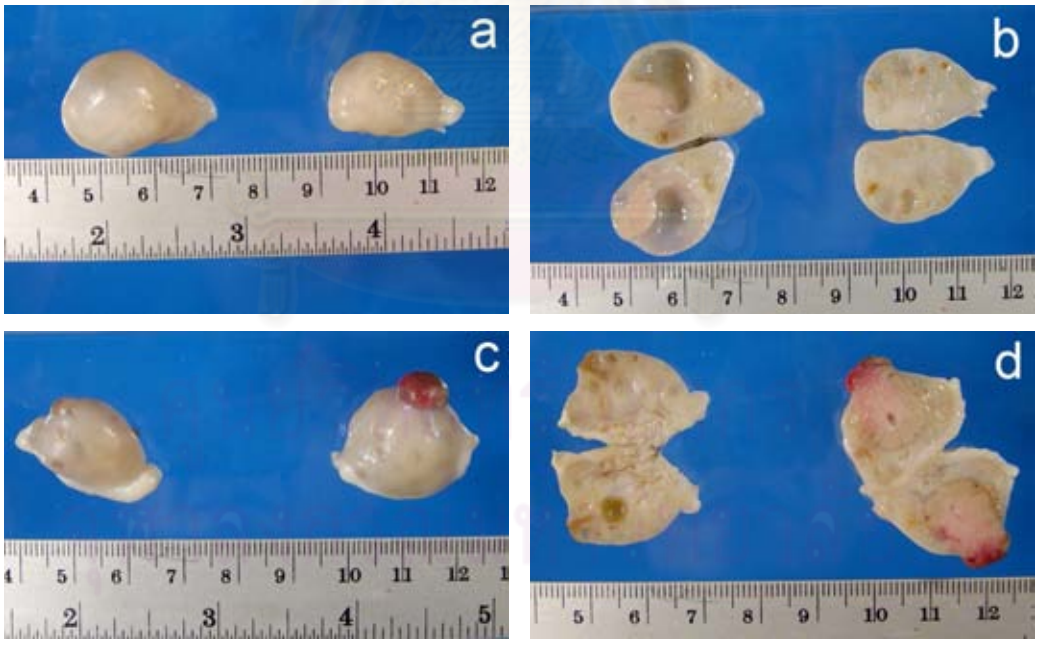
แต่ละตัวอย่างที่ได้จากการทดลองในการย้อมทางอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas และ FasL จะวัดผลความเข้ม (intensity staining) ในการติดสีบวกโดยประเมินแบบ semiquantitative evaluation ดังนี้ เกรด 0 = ไม่ติดสี (negative staining) เกรด 1 = ติดสีอ่อน (weak staining) เกรด 2 = ติดสีปานกลาง (moderate staining) และ เกรด 3 = ติดสีเข้ม (strong staining) สำหรับวิธี TUNEL assay จะตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวก (ติดสีน้ำตาล) ในชิ้นเนื้อตัวอย่างโดยใช้ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 400x โดยการสุ่มนับจำนวน 5 พื้นที่ตามแนวของชั้นเยื่อบุ ผลที่ได้จะเป็นจำนวนเซลล์/พื้นที่ 15,625 ตารางไมโครเมตร จากนั้น ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะนำมาคำนวณทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โดยโปรแกรม SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่กระบือปลักไทย

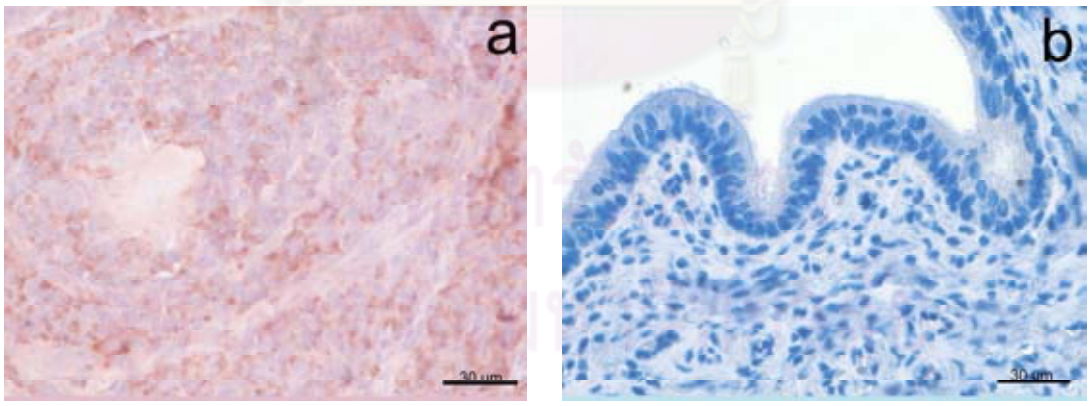
กระบือปลักที่ใช้ในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของกระบือปลักที่อยู่ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง โดยสังเกตจากลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่ตามการศึกษาของ Ali และคณะ (2003) รังไข่กระบือปลักที่เข้าสู่ระยะฟอลลิคูลาร์ พบว่าบนพื้นผิวของรังไข่มีฟอลลิเคิลชนิดเด่น (dominant follicle) ขนาดใหญ่ปรากฏอยู่ ซึ่งในการศึกษานี้มีขนาดประมาณ 1.54 ± 0.16 ซม. (n=5) และพบคอร์ปัสลูเทียมที่กำลังเสื่อม (regressing corpus luteum) (รูปที่ 1a และ b) ขณะที่รังไข่ของกระบือปลักในระยะลูเตียลช่วงกลาง พบคอร์ปัสลูเทียมขนาดใหญ่ยื่นนูนขึ้นมาบนผิวของรังไข่ โดยด้านบนของคอร์ปัสลูเทียมอาจมีสีแดงปรากฏด้วย เมื่อผ่ารังไข่จะพบว่า คอร์ปัสลูเทียมจะเจริญเกือบเต็มพื้นที่ภายในรังไข่ซึ่งมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 1.68 ± 0.13 ซม. (n=5) และจะพบฟอลลิเคิลขนาดเล็กๆ (รูปที่ 1c และ d)



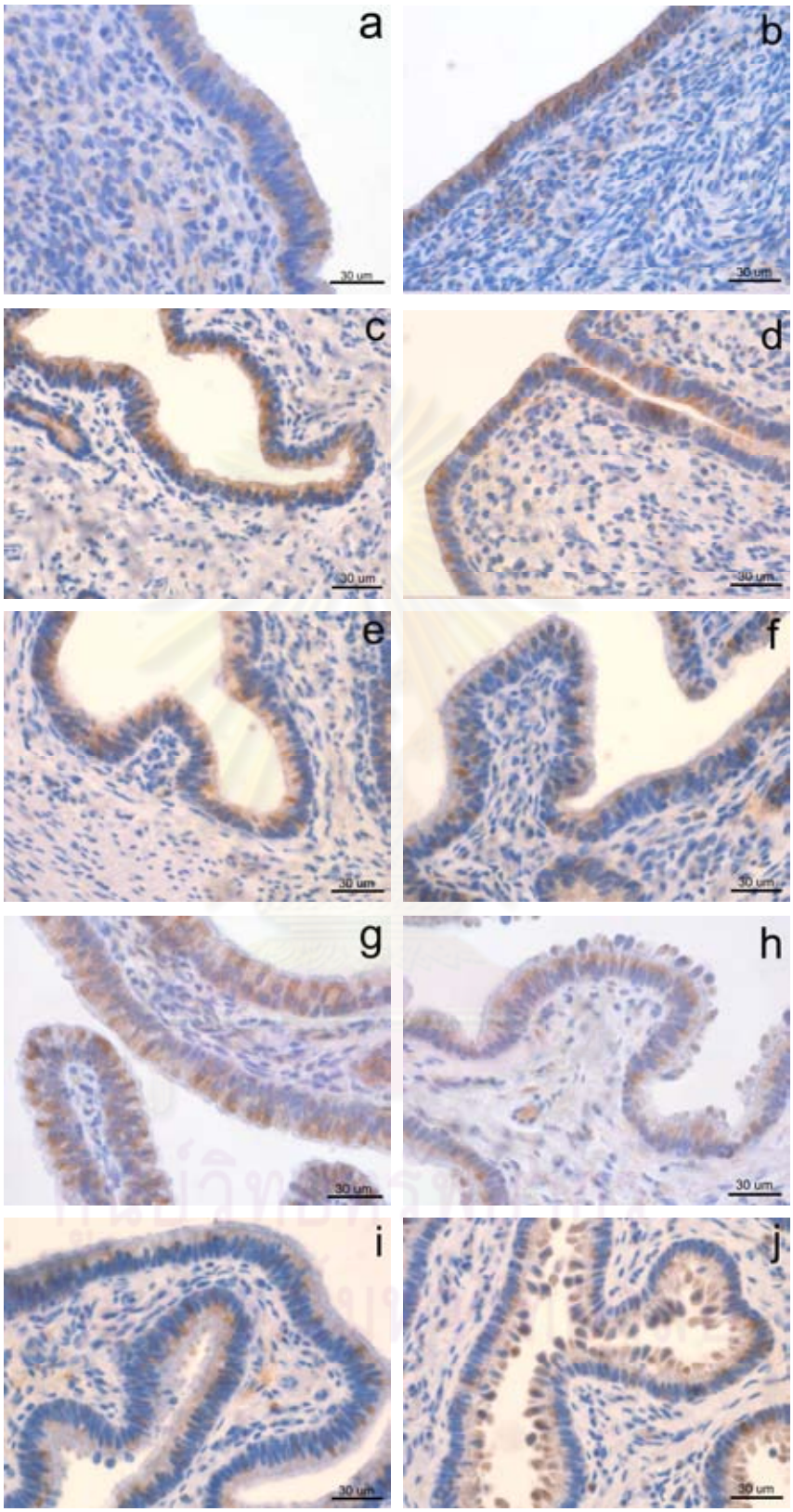
รูปที่ 1 ลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่กระบือปลักไทยในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, b) และระยะลูเตียลช่วงกลาง (c, d) จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดปทุมธานี สังเกตลักษณะของฟอลลิเคิลและคอร์ปัสลูเทียมซึ่งมีขนาดใหญ่

การแสดงออกของโปรตีน Fas ในปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก

การแสดงออกของโปรตีน Fas ที่ปรากฏในสไลด์ควบคุมบวก พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ภายในรังไข่ โดยเฉพาะ granulosa cells ให้ผลบวกติดสีน้ำตาล โดยปรากฏภายในไซโตพลาสมของเซลล์ (รูปที่ 2a) ขณะที่สไลด์ควบคุมลบไม่พบการติดสี (รูปที่ 2b) ผลการศึกษาความเข้มในการติดสีบวกที่ปรากฏในปีกมดลูกและท่อนำไข่ (ตารางที่ 1) พบว่า การแสดงออกของโปรตีน Fas ที่ติดสีบวกโดยส่วนใหญ่พบที่เซลล์เยื่อบุผิวโดยกระจายตลอดแนวยาวของเยื่อบุ ขณะที่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิวพบการติดสีบวกกระจัดกระจายและปรากฏอยู่เพียงเล็กน้อย ลักษณะการติดสีบวกภายในเซลล์เยื่อบุผิวพบภายในไซโตพลาสมของเซลล์เยื่อบุ ซึ่งไม่อาจระบุชนิดของเซลล์ได้ว่าเป็นเซลล์คัดหลั่งหรือเซลล์ชนิดที่มีซีเลีย (รูปที่ 3) เปรียบเทียบผลการติดสีบวกของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ทุกส่วนของกระบือปลักในระยะเดียวกัน (ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง) พบระดับความเข้มของการติดสีบวกอยู่ในระดับปานกลาง และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (รูปที่ 4a) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีน Fas ในส่วนเดียวกัน ในส่วนของปีกมดลูก UTJ อิสธ์มัส และแอมพูลลา ในระยะที่ต่างกันระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของระดับความเข้มของการติดสีบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นในท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัม ซึ่งพบว่าระดับความเข้มในการติดสีบวกในระยะฟอลลิคูลาร์ต่ำกว่าระยะลูเทียล ($P<0.05$) (รูปที่ 4b)



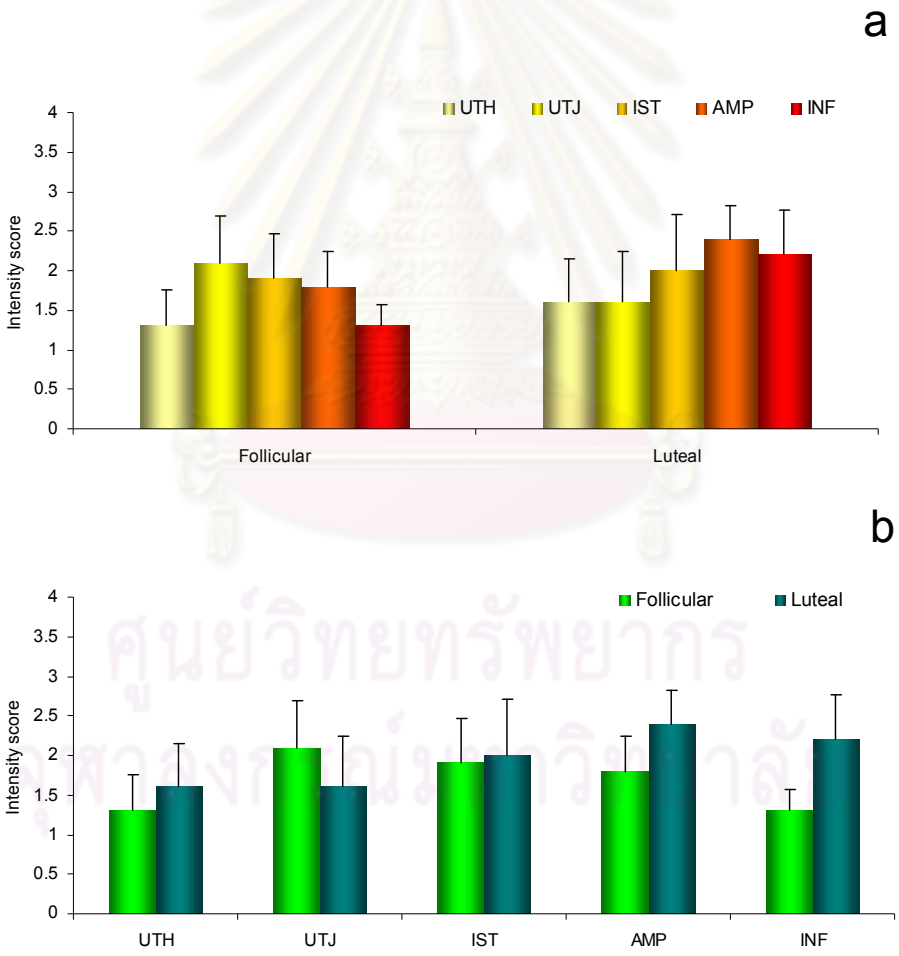
รูปที่ 2 แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ที่ปรากฏใน granulosa cells ซึ่งพบภายในฟอลลิเคิลของรังไข่หนู (a) ซึ่งใช้เป็นสไลด์ควบคุมบวก และการไม่ติดสีในท่อนำไข่ส่วน UTJ (b) ที่ใช้ IgG1 ทดแทนการใช้แอนติบอดี้ปฐมภูมิ



รูปที่ 3 แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ในปีกมดลูก (a, b) และท่อนำไข่ส่วน UTJ (c, d) อิสธ์มัส (e, f) แอมพูลลา (g, h) และอินฟันดิบูลัม (i, j) ของกระบือปลักที่ปรากฏในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e, g, i) และระยะลูเตียลช่วงกลาง (b, d, f, h, j) สังเกตบริเวณของการติดสีบวกกระจายตลอดแนวยาวเยื่อบุผิวของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ

ตารางที่ 1 ระดับความเข้ม (intensity) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas ที่ปรากฏในชั้นเยื่อบุของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ในระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลางของกระบือปลักไทย

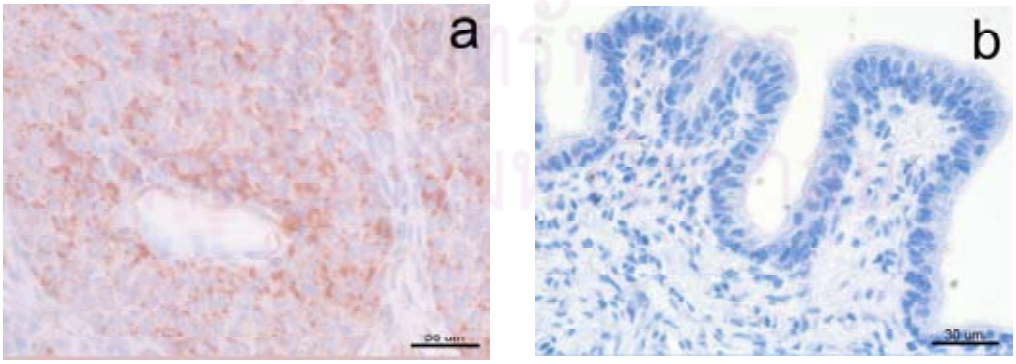
ระยะของการเป็นสัด	ความเข้ม (ค่าเฉลี่ย ± SEM)				
	ปีกมดลูก	UTJ	อิสธ์มัส	แอมพูลลา	อินฟันดิบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	1.3 ± 0.4	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.6	1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.3
ลูเตียลช่วงกลาง	1.6 ± 0.7	1.6 ± 0.6	2.0 ± 0.7	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.6



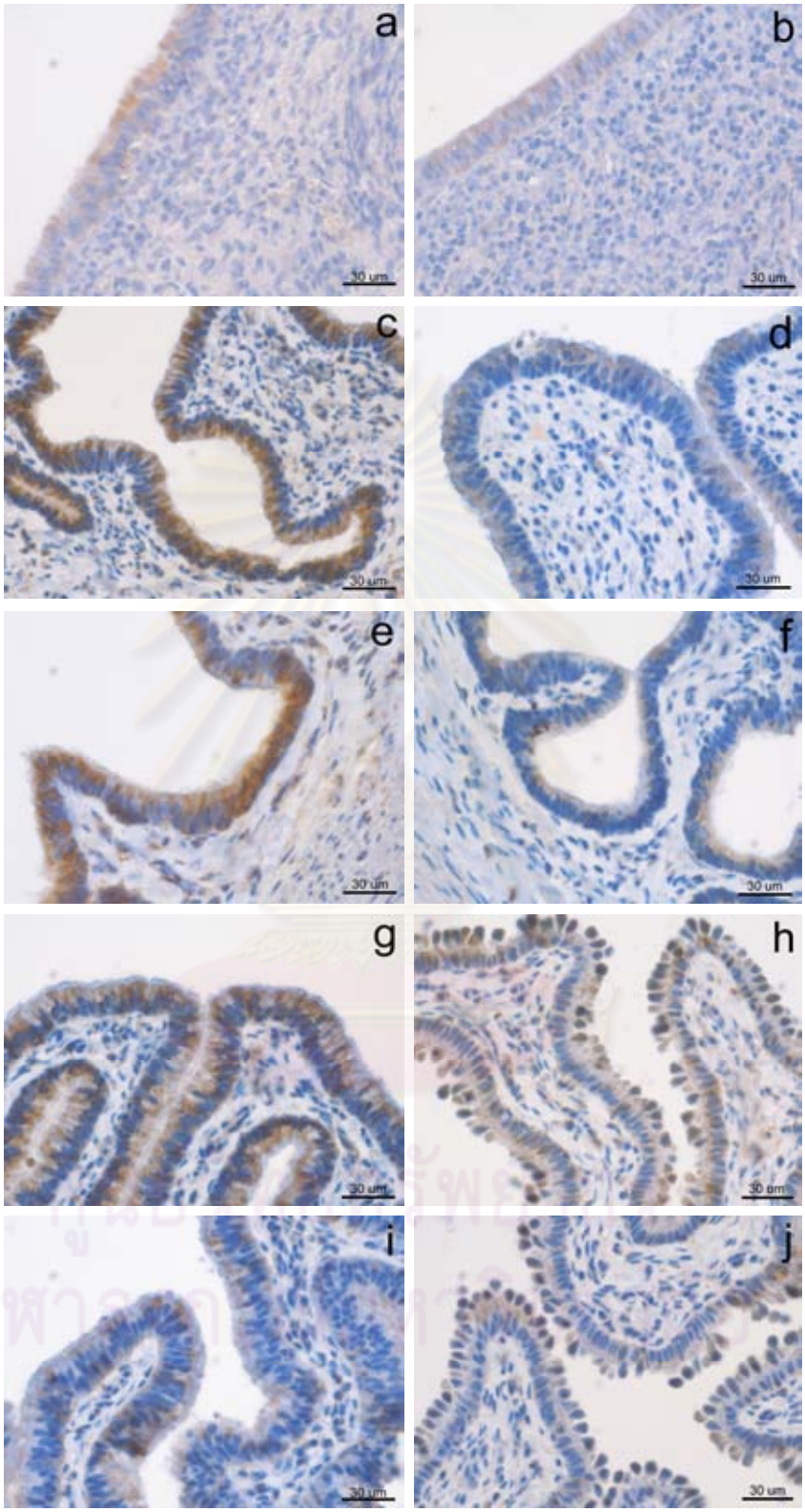
รูปที่ 4 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย ± SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas เมื่อเปรียบเทียบในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะเดียวกัน (a) และระดับความเข้มในการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบในอวัยวะส่วนเดียวกันที่ระยะแตกต่างกัน (b); ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ปรากฏแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การแสดงออกของโปรตีน FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก

ในสไลด์ควบคุมบวก พบว่า granulosa cells ติดสีบวกของ FasL ปรากฏที่ไซโตพลาสมของเซลล์ (รูปที่ 5a) ในขณะที่สไลด์ควบคุมลบไม่พบการติดสีบวกในแสดงออกของโปรตีน FasL (รูปที่ 5b) ความเข้มในการแสดงออกของโปรตีน FasL ในปีกมดลูกและท่อนำไข่ (ตารางที่ 2) ปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนภายในเซลล์เยื่อบุผิว (รูปที่ 6) การติดสีบวกพบได้ในไซโตพลาสมของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งการติดสีไม่พบในเซลล์เยื่อบุผิวทุกเซลล์ และเซลล์ที่ติดสีบวกนั้นไม่สามารถระบุชนิดของเซลล์ได้ว่าเป็นเซลล์คัดหลั่งหรือเซลล์ที่มีซีเลีย โดยลักษณะดังกล่าวนี้พบได้ชัดเจนในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ (รูปที่ 6c-j) บางตัวอย่างของท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัส พบการติดสีเข้มในบริเวณที่เป็นร่องหลืบ (crypt) ของเยื่อบุผิว อย่างไรก็ดี ความเข้มในการติดสีบวกของ FasL มีความแตกต่างระหว่างปีกมดลูกและท่อนำไข่แต่ละส่วนเมื่อเปรียบเทียบในระยะเดียวกัน (รูปที่ 7a) ในระยะฟอลลิคูลาร์ พบว่า ความเข้มของการติดสีบวกใน UTJ และอิสธ์มัสอยู่ในระดับเข้มมาก และทั้งสองส่วนนี้มีความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับปีกมดลูก ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาและอินฟันดิบูลัม ทั้งนี้ความเข้มของการติดสีบวกที่ปรากฏในท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาและอินฟันดิบูลัมมากกว่าปีกมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ขณะที่ในระยะลูเตียลช่วงกลาง ท่อนำไข่ส่วน UTJ อิสธ์มัส และแอมพูลลา พบความเข้มของการติดสีบวกแตกต่างจากปีกมดลูก และท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ (รูปที่ 7a) เมื่อพิจารณาความเข้มในการติดสีบวกของปีกมดลูก และท่อนำไข่ในส่วนเดียวกันในระยะที่แตกต่างกัน พบว่า ความเข้มของการติดสีบวกของโปรตีน FasL ที่พบในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสในระยะฟอลลิคูลาร์ มีความเข้มมากกว่าระยะลูเตียลช่วงกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (รูปที่ 7b)



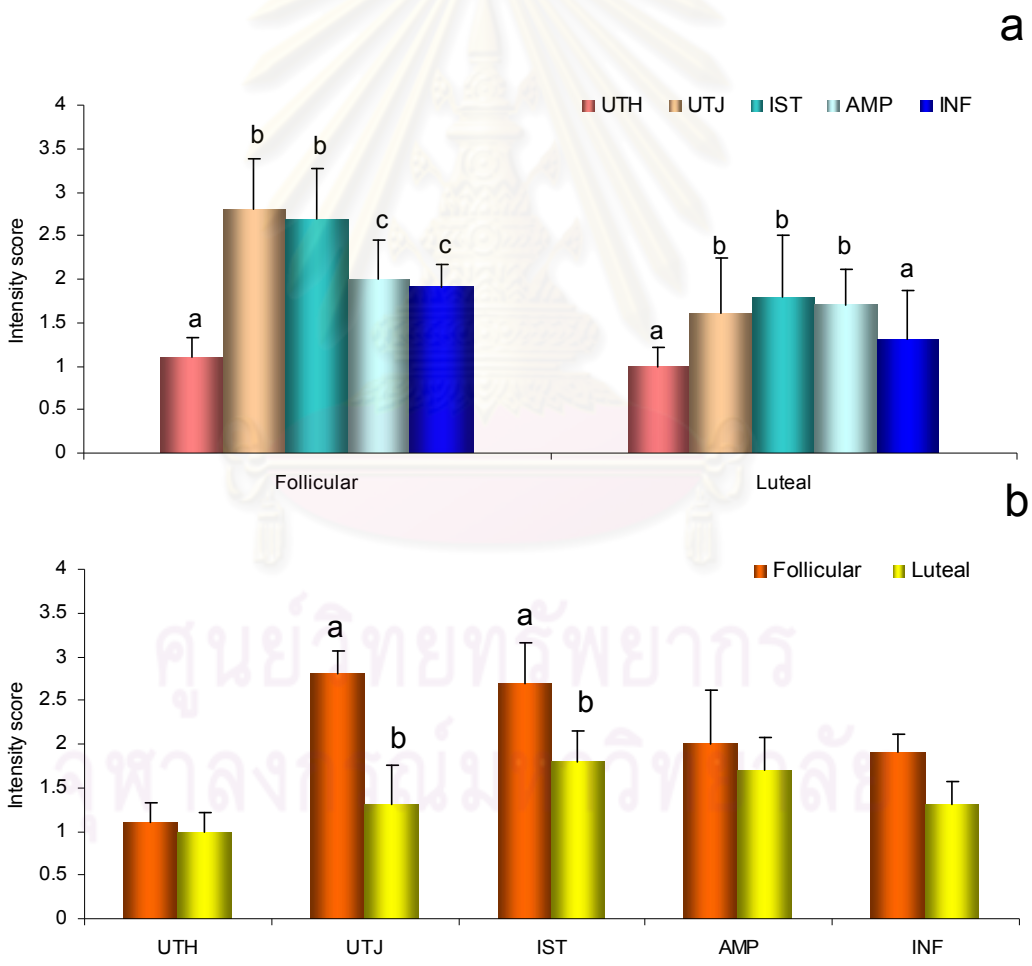
รูปที่ 5 แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ที่ปรากฏใน granulosa cells ภายในฟอลลิเคิลของรังไข่หนู (a) ซึ่งใช้เป็นสไลด์ควบคุมบวก และการไม่ติดสีในท่อนำไข่ส่วน UTJ (b) ที่ใช้ IgG1 ทดแทนการใช้แอนติบอดี้ปฐมภูมิ



รูปที่ 6 แสดงการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ในปีกมดลูก (a, b) และท่อนำไข่ส่วน UTJ (c, d) อิสธ์มัส (e, f) แอมพูลลา (g, h) และอินฟันดิบูลัม (i, j) ของกระบือปลักที่ปรากฏในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e, g, i) และระยะลูเตียลช่วงกลาง (b, d, f, h, j) สังเกตบริเวณของการติดสีบวกกระจายตลอดแนวยาวเยื่อบุผิวของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ

ตารางที่ 2 ระดับความเข้ม (intensity) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL ที่ปรากฏในชั้นเยื่อบุของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ในระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลางของกระบือปลักไทย

ระยะของการเป็นสัด	ความเข้ม (ค่าเฉลี่ย ± SEM)				
	ปีกมดลูก	UTJ	อิสธ์มัส	แอมพูลลา	อินฟันดิบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	1.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.5	2.0 ± 0.6	1.9 ± 0.2
ลูเตียลช่วงกลาง	1.0 ± 0.2	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.3



รูปที่ 7 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย ± SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL เมื่อเปรียบเทียบในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะเดียวกัน (a) และระดับความเข้มในการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบในอวัยวะส่วนเดียวกันที่ระยะแตกต่างกัน (b); ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ปรากฏแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

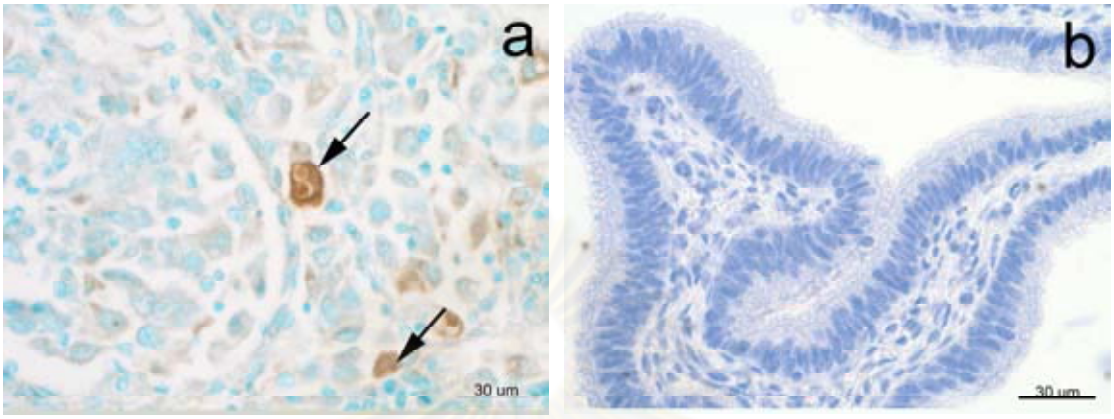
ลักษณะการปรากฏของการเสื่อมตายของเซลล์โดยเทคนิค TUNEL assay

จากการศึกษาหาสภาพการเสื่อมตายของเซลล์ด้วยวิธี TUNEL assay ในสไลด์ควบคุมบวกซึ่งใช้ต่อมน้ำเหลืองที่เป็นมะเร็ง (lymphoma) พบการติดสีบวก (สีน้ำตาล) ปรากฏภายในเซลล์ที่กำลังเสื่อมตายกระจายอยู่ทั่วทั้งเนื้อเยื่อของต่อมน้ำเหลือง (รูปที่ 8a) ขณะที่สไลด์ควบคุมลบซึ่งใช้ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลา จะไม่พบการติดสี (รูปที่ 8b) ภายในเนื้อเยื่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การติดสีบวก (สีน้ำตาล) ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมตายของเซลล์ โดยส่วนใหญ่กระจายอยู่ในเซลล์ของชั้นเยื่อบุผิวซึ่งเกิดขึ้นทั้งในปีกมดลูกและท่อนำไข่ทุกส่วน ข้อสังเกตในการติดสีบวก พบว่า การแสดงออกในการติดสีบวกของ TUNEL assay ปรากฏอยู่ที่เซลล์บริเวณด้านล่างของเซลล์เยื่อบุ (รูปที่ 9) นอกจากนี้ เซลล์ที่ติดสีบวกในปีกมดลูก พบว่ามีปริมาณสูงในระยะลูเตียลช่วงกลางเมื่อเปรียบเทียบกับระยะฟอลลิคูลาร์ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ พบว่า จำนวนเซลล์ที่ติดสีบวกนั้น ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบทั้งสองระยะของวงรอบการเป็นสัดเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ที่ติดสีบวกภายในปีกมดลูกมีปริมาณสูง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ภายในระยะเดียวกัน(ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนของเซลล์ที่เสื่อมตายซึ่งติดสีบวกด้วยวิธี TUNEL assay (ค่าเฉลี่ย ± SD / พื้นที่ 15,625 ตารางไมโครเมตร) ที่ปรากฏภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง

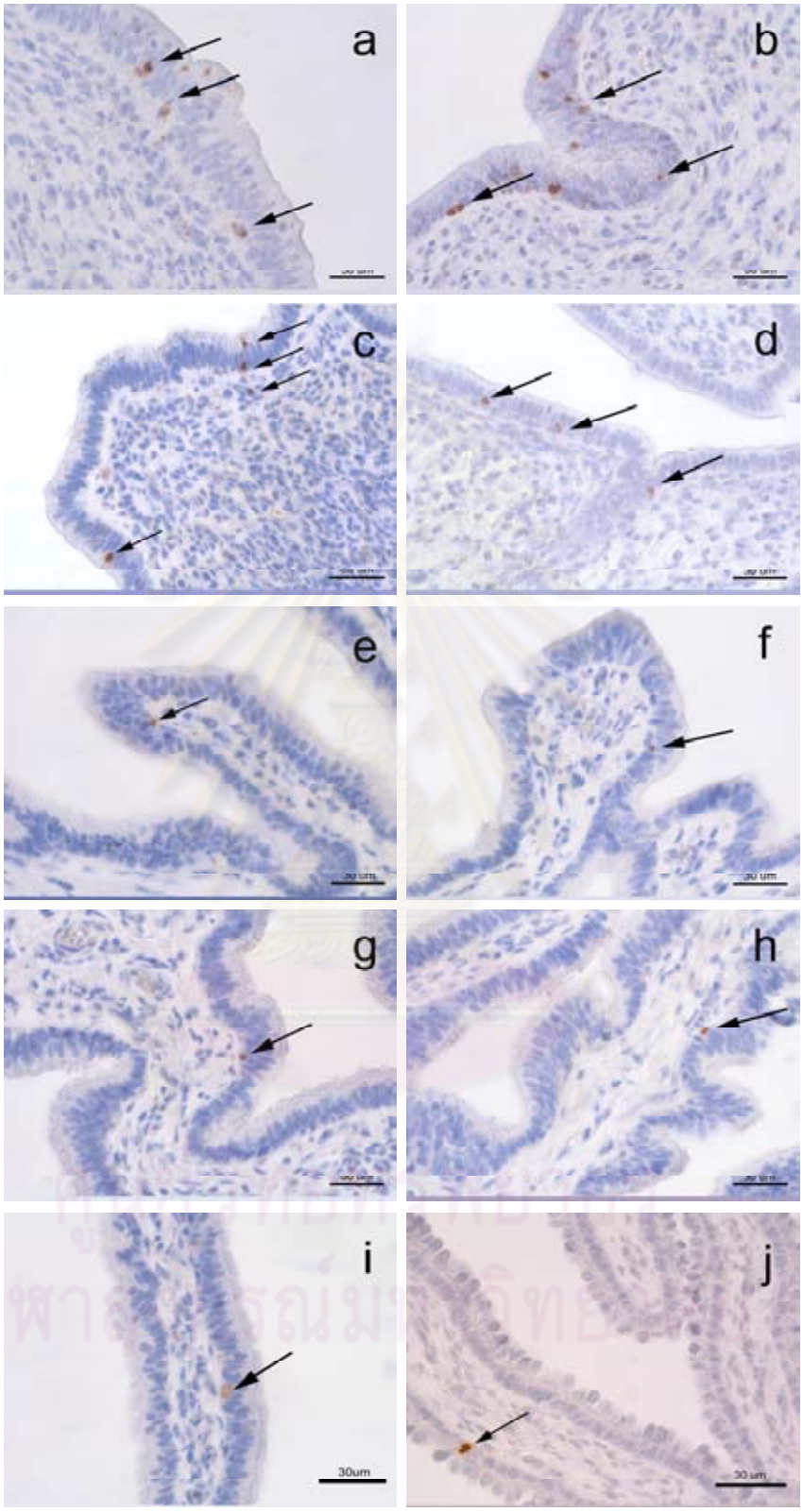
ระยะของการเป็นสัด	จำนวนเซลล์ (ค่าเฉลี่ย ± SD / พื้นที่ 15,625 ตารางไมโครเมตร)				
	ปีกมดลูก	UTJ	อิสธ์มัส	แอมพูลลา	อินฟันดิบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	1.28 ± 1.21[a]	0.24 ± 0.52[b]	0.08 ± 0.28[b]	0.16 ± 0.37[b]	0.12 ± 0.33[b]
ลูเตียลช่วงกลาง	1.60 ± 1.83[a]	0.12 ± 0.33[b]	0.04 ± 0.20[b]	0.20 ± 0.50[b]	0.12 ± 0.33[b]

*ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ปรากฏในแถวเดียวกันของแต่ละระยะ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001)



รูปที่ 8 แสดงการติดสีบวก (ปลายลูกศรชี้) ของสภาพการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay ที่ปรากฏในมะเร็งต่อมน้ำเหลือง lymphoma (a) ซึ่งใช้เป็นสไลด์ควบคุมบวก และการไม่ติดสีบวกในท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลา (b) ที่ไม่ใช้ TdT หรือ digoxigenin-dUTP หยดบนสไลด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แสดงการติดสีบวก (สีน้ำตาล) ของสภาพการเสื่อมตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL assay ในปีกมดลูก (a, b) และท่อนำไข่ส่วน UTJ (c, d) อิสธ์มัส (e, f) แอมพูลลา (g, h) และอินฟันดิบูลัม (i, j) ของกระบือปลักที่ปรากฏในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e, g, i) และระยะลูเตียลช่วงกลาง (b, d, f, h, j) สังเกตการติดสีบวกเป็นจุดสีน้ำตาลที่เยื่อบุผิวของปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ มีความสอดคล้องและมีประเด็นที่แตกต่างกับการศึกษาที่ผ่านมาหลายประการ โดยประเด็นที่น่าสังเกต 2 ประการคือ การปรากฏของโปรตีน Fas นั้นไม่สอดคล้องกับอัตราการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อบุที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสื่อมตายของเซลล์ที่พบภายในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี TUNEL assay และประการที่สองคือ การแสดงออกของโปรตีน FasL มีความเข้มของการติดสีบวกอย่างเด่นชัดเฉพาะในท่อนำไข่กระบือปลักส่วน UTJ และอิสธ์มัส ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) เป็นที่น่าสนใจว่า การศึกษานี้ เป็นครั้งแรกที่ได้พยายามค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL กับการทำหน้าที่ของท่อนำไข่ในส่วนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ รวมทั้งความเกี่ยวข้องกับกลไกการเสื่อมตายของเซลล์ที่ปรากฏขึ้นภายในท่อนำไข่กระบือปลักไทย

การแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ทั้งในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ได้พบในมดลูกของมนุษย์ ซึ่งระบุว่าการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL ตลอดวงรอบการมีประจำเดือน (Yamashita et al., 1999) ปรากฏเด่นชัดมากบริเวณเซลล์เยื่อบุ แต่ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุ จะพบได้น้อยมากทั้งในปีกมดลูกและท่อนำไข่ การแสดงออกของโปรตีน Fas ในครั้งนี้ มีความเข้มของการติดสีที่พบภายในปีกมดลูกอยู่ในระดับใกล้เคียงกับที่พบภายในท่อนำไข่ และที่สำคัญคือไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเกิดขึ้น ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระยะฟอลลิคูลาร์กับระยะลูเตียลช่วงกลาง ยกเว้นการแสดงออกของ Fas ที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัมในระยะลูเตียลช่วงกลาง ที่พบความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการแสดงออกของโปรตีน FasL นั้น พบความแตกต่างอย่างชัดเจนภายในบริเวณท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสซึ่งมีระดับความเข้มของการติดสีในระยะฟอลลิคูลาร์อย่างชัดเจนและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเตียลช่วงกลาง ในขณะที่ท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างทั้งสองระยะของวงรอบการเป็นสัด ขณะที่การเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นกลับพบว่า ภายในท่อนำไข่กระบือปลักนั้น มีอัตราการเสื่อมตายของเซลล์น้อยกว่าการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นภายในปีกมดลูกอย่างเห็นได้ชัด ผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในท่อนำไข่โคซึ่งระบุว่า อัตราการเสื่อมตายของเซลล์ไม่ได้เกิดขึ้นอย่างเด่นชัดภายในท่อนำไข่ แม้จะมีการปรากฏโปรตีน Fas อย่างเด่นชัดก็ตาม (Bergqvist et al., 2005a) สำหรับจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อบุภายในปีกมดลูกระยะลูเตียลช่วงกลางมีแนวโน้มว่า มีจำนวนที่พบมากกว่าระยะฟอลลิคูลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับผล

การศึกษาทางวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีที่พบว่า การติดสีของโปรตีน Fas ในระยะลูเตียลช่วงกลางมีความเข้มมากกว่าที่พบในระยะฟอลลิคูลาร์

อิทธิพลของฮอร์โมนที่มีผลต่อการแสดงออกโปรตีน Fas

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ภายในรังไข่พบการแสดงออกของโปรตีน Fas และ FasL (Hu et al., 2001; Inoue et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในรังไข่ที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก การศึกษาในครั้งนี้ภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก พบการแสดงออกของโปรตีน Fas ทั้งในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลาง โดยไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกมากนัก อย่างไรก็ตามถึงแม้ในระยะฟอลลิคูลาร์จะมีการแสดงออกของโปรตีน Fas มากแต่การเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นกลับพบได้น้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งภายในท่อนำไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเทคนิค TUNEL assay ใช้ตรวจหาการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ได้ค่อนข้างน้อย (Bergqvist et al., 2005a) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค single strand DNA (SSDNA) (Steffl et al., 2008) ในทางตรงกันข้ามภายในปีกมดลูกซึ่งมีการแสดงออกโปรตีน Fas น้อยกว่า แต่พบการเสื่อมตายของเซลล์มากกว่าภายในท่อนำไข่ การศึกษาครั้งนี้พบว่าภายในปีกมดลูกในระยะลูเตียลช่วงกลาง มีระดับของการติดสีของโปรตีน Fas รวมทั้งจำนวนเซลล์ที่ปรากฏการเสื่อมตายของเซลล์มากกว่าที่พบในระยะฟอลลิคูลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การเสื่อมตายของเซลล์ภายในมดลูกมนุษย์ในระยะ secretory phase ช่วงปลาย (ซึ่งใกล้เคียงกับระยะลูเตียล) มีการเสื่อมตายเกิดขึ้นมากกว่าระยะ proliferative phase อย่างชัดเจน (Hopwood and Levison, 1976) ดังนั้น การเสื่อมตายของเซลล์ภายในปีกมดลูกในระยะลูเทียลช่วงกลาง น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยตรง เป็นที่ทราบดีว่าโปรเจสเตอโรนเป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่หลักหลังจากที่มีการตกไข่แล้ว ในการปรับสภาพเซลล์เยื่อบุภายในมดลูก (Nayak et al., 2000) และทำให้มีการหนาตัวของชั้น endometrium มากขึ้น เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน ฮอร์โมนชนิดนี้จะค่อยๆ ลดลง หากไม่มีการตั้งท้องเกิดขึ้นเพื่อพร้อมเข้าสู่วงรอบการเป็นสัดอีกครั้ง ในมนุษย์ ระยะดังกล่าวนี้จะพบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุภายในมดลูก (Hafez, 1993) มีการศึกษาในมดลูกมนุษย์ ได้พบว่าสภาวะที่เซลล์มดลูกได้รับการบ่มด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนหรือเอสโตรเจนพบว่าการแสดงออกของโปรตีน Fas อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ขณะเดียวกันในสภาพที่ปราศจากฮอร์โมนทั้งสองจะส่งผลให้มีแสดงออกของโปรตีน Fas มากขึ้นรวมทั้งทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ภายในมดลูกมากขึ้นด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ ทำหน้าที่ในการยับยั้ง (suppressor) การแสดงออกของโปรตีน Fas รวมถึงยับยั้งการเกิดการเสื่อมตายภายในเซลล์ด้วย (Song et al., 2002) สอดคล้องกับการศึกษาในหนูที่ระบุว่า โปรเจสเตอโรนมีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Fas ภายในเซลล์

ลูเตียล (Kuranaga et al., 2000) และสอดคล้องกับการศึกษาในสุกร (Okano et al., 2007) และกระต่าย (Rotello et al., 1992) ที่ระบุว่าอิทธิพลของโปรเจสเตอโรน ยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในมดลูก การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสื่อมตายของเซลล์ในชั้นใต้เยื่อบุของปีกมดลูกกระบือปลักระยะฟอลลิคูลาร์พบว่า เกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเตียลช่วงกลาง สอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์มดลูกที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนสามารถยับยั้งไม่ให้ stromal cells และ glandular cells เกิดการเสื่อมตาย โดยพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์ ได้มากกว่าโปรเจสเตอโรน ถึงแม้ว่าจะได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน FasL (Song et al., 2002) สอดคล้องกับการทำหน้าที่ของเอสโตรเจนในต่อมน้ำนม ซึ่งทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามปกติ และช่วยลดอัตราการเสื่อมตายของเซลล์ (Lewis-Wambi and Jordan 2009) และในสมองที่พบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถยับยั้งไม่ให้มีการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้น ถึงแม้ว่าจะพบการแสดงออกของโปรตีน Fas ก็ตาม (Jia et al., 2008) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า การเสื่อมตายภายในปีกมดลูกในระยะฟอลลิคูลาร์มีจำนวนน้อยกว่าในระยะลูเทียลช่วงกลาง เป็นผลมาจากฮอร์โมนเอสโตรเจนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นได้มากกว่าโปรเจสเตอโรน

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่าภายในท่อนำไข่กระบือปลักทั้งระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลางมีอัตราการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้นอยู่ในระดับที่ต่ำมาก สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในโค (Bergqvist et al., 2005a) และการศึกษานี้พบการแสดงออกของโปรตีน Fas ในระยะลูเตียลช่วงกลางมากกว่าระยะฟอลลิคูลาร์ในท่อนำไข่ส่วนอินฟันดิบูลัม การศึกษาที่ผ่านมาในท่อนำไข่สุกร ระบุว่า เซลล์คัดหลั่งมีอัตราการเสื่อมตายเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในระยะลูเตียล โดยได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Steffl et al., 2008) นอกจากนี้ ท่อนำไข่ยังพบการแสดงออกของโปรตีน Bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเสื่อมตายของเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้นในระยะลูเตียลเมื่อเปรียบเทียบกับในระยะฟอลลิคูลาร์ (Briton-Jones et al., 2006) และการศึกษาในไก่ ที่ระบุว่าเอสโตรเจนสามารถยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์ภายในท่อนำไข่ได้ และเริ่มมีการเสื่อมตายเกิดขึ้นเมื่อปราศจากฮอร์โมนดังกล่าว (Monroe et al., 2000) เอสโตรเจนยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์ caspase โดยไปยับยั้งเอ็นไซม์นี้ส่งผลให้ไม่เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ภายในท่อนำไข่ (Monroe et al., 2002) ดังนั้นการปรากฏของโปรตีน Fas อาจเกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์เยื่อบุในท่อนำไข่เกิดการเสื่อมตายเพื่อขจัดเซลล์ที่มีอายุมาก โดยผ่านการควบคุมของฮอร์โมนในวงรอบการเป็นสัด (Bergqvist et al., 2005a) เช่นเดียวกับภายในมดลูก เป็นที่น่าสังเกตว่า กระบวนการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เกิดขึ้นได้น้อยกว่าเซลล์เยื่อบุของมดลูกมาก จึงเป็นไปได้ว่า เซลล์เยื่อบุของท่อนำไข่โคและกระบือมีช่วงในการทำงานที่

ยาวนานกว่า จึงมีการผลัดเปลี่ยนเซลล์ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษากลไกการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่กระบือปลักในอนาคตต่อไป

อิทธิพลของฮอร์โมนที่มีผลต่อการแสดงออกโปรตีน FasL

สำหรับการแสดงออกของโปรตีน FasL ในการศึกษาครั้งนี้ พบมากภายในเซลล์เยื่อบุของทั้งปีกมดลูกและท่อนำไข่กระบือปลัก ตำแหน่งของการติดสีจะพบบริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อบุ (apical part of epithelial cells) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาภายในมดลูกและท่อนำไข่ของหนู ที่พบการแสดงออกในลักษณะคล้าย granules บริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อบุ ซึ่งพบว่าเป็น vesicles ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน FasL (Imarai et al., 2005) การสังเคราะห์และผลิตโปรตีน FasL ภายใน vesicles ยังพบได้ภายในเซลล์เนื้องอก (Andreola et al., 2002) และในมดลูกมนุษย์ (Yamashita et al., 1999) โดยโปรตีน FasL ที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ภายใน vesicles เหล่านั้น เมื่อปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงานและสามารถเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเสื่อมตายได้ (Andreola et al., 2002) พบว่านิวโทรฟิลและแมคโครฟาจต่างมีการแสดงออกของโปรตีน Fas ซึ่งมีความไวรับต่อการเกิดการเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดจากการจับกับโปรตีน FasL โดยเฉพาะอย่างยิ่งนิวโทรฟิลจะมีความไวรับมากเป็นพิเศษ (Iwai., 1994) รวมถึงลิมโฟไซต์ชนิด T-cell ภายในมดลูกเช่นกัน (Imarai et al., 2005) และพบว่าลิมโฟไซต์กลุ่ม T helper cell ชนิด Th1 มีความไวต่อการถูกทำลายโดยการทำงานของระบบ Fas-FasL มากกว่า T helper cell ชนิด Th2 (Zhang et al., 1997) ระบุได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีกลไกการควบคุมจำนวนด้วยกันเองโดยอาศัยการทำงานของระบบ Fas-FasL นอกจากนี้ พบว่า T-cell ที่มีการแสดงออกของ FasL จะทำหน้าที่กำจัดแมคโครฟาจบางส่วนที่อยู่ภายในผนังเยื่อบุช่องท้องที่มีการแสดงออกของโปรตีน Fas (Ashany et al., 1995) และการควบคุมเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำงานของระบบ Fas-FasL ของ T-cell สามารถพบได้ใน B-cell ด้วยเช่นกัน โดยการส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีน Fas ที่อยู่บน B-cell ภายในไขกระดูก ต่อมน้ำเหลืองและม้าม (Ju et al., 1994)

การศึกษาภายในเซลล์เยื่อบุของปีกมดลูกพบว่า การแสดงออกของโปรตีน FasL ไม่แตกต่างกันมากเมื่อเปรียบเทียบระยะฟอลลิคูลาร์และลูเตียลช่วงกลาง เป็นที่ทราบดีว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนทำหน้าที่หลักในระยะฟอลลิคูลาร์ ขณะที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนทำหน้าที่ในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Fas ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในทางกลับกันฮอร์โมนดังกล่าวกลับส่งผลให้โปรตีน FasL มีการแสดงออกมากขึ้นภายในเซลล์มดลูก (Song et al., 2002) และยังพบว่าเมื่อทดสอบโดยการนำเซลล์มดลูกที่เพาะเลี้ยงมาเติมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ระดับ 10^{-9} M ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้ stromal cells และ glandular cells มีการแสดงออกของ FasL มากขึ้น ในขณะที่โปรเจสเตอโรนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน

FasL ได้เช่นกัน แต่จะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อยกว่าเอสโตรเจน (Selam et al., 2001) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้โมโนไซต์มีการแสดงออกของโปรตีน FasL มากขึ้น (Mor et al., 2003) หรือแม้แต่ใน osteoblast (Krum et al., 2008), human coronary artery endothelial cells (HCAECs) (Seli et al., 2006) และเซลล์มะเร็งเต้านม (Mor et al., 2000) นอกจากนี้ ในเซลล์เยื่อบุของรังไข่ (ovarian epithelial cells) พบการแสดงออกของโปรตีน FasL ในระยะเอสตรัสมากกว่าในระยะเมทเอสตรัส และค่อยๆ ลดลงในระยะไดเอสตรัส (Sapi et al., 2002) ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีน FasL ที่มากขึ้นในมดลูก เป็นผลมาจากการทำหน้าที่ของเอสโตรเจน ซึ่งเกี่ยวข้องการควบคุมสมดุลระหว่างการเสื่อมตายของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Song et al., 2002; Havelka et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเอสโตรเจนที่เพิ่มมากขึ้น สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน FasL ให้มากขึ้นตามไปด้วย ภายในมดลูก (Selam et al., 2001) สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ทุกส่วนมีการแสดงออกของโปรตีน FasL ในระยะฟอลลิคูลาร์มากกว่าในระยะลูเตียลช่วงกลาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายในบริเวณท่อนำไข่ส่วน UTJ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้มีความขัดแย้งกับการศึกษาในมดลูกของมนุษย์ที่พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน FasL ในระยะ secretory phase มากกว่าระยะ proliferative phase (Selam et al., 2001) ในขณะที่ภายในปีกมดลูกกระบือปลัก พบการแสดงออกของโปรตีน FasL ในระยะฟอลลิคูลาร์ไม่แตกต่างจากระยะลูเตียลช่วงกลาง ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ไม่เหมือนกัน ดังเช่นการศึกษาในมดลูกของหนู ซึ่งมีการค้นพบว่าระดับของเอสโตรเจนไม่มีผลต่อการแสดงออกที่มากขึ้นของโปรตีน FasL (Imarai et al., 2005) ในทางตรงกันข้ามยังพบว่า เอสโตรเจนส่งผลทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน FasL น้อยลงในมดลูกของหนู (Wu et al., 2003) ดังนั้น จึงอาจเป็นได้ว่าการตอบสนองต่อฮอร์โมนต่อการแสดงออกของโปรตีน FasL อาจมีความแตกต่างกันระหว่างกระบือปลักและมนุษย์

ปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของระบบ Fas-FasL

นอกจากฮอร์โมนทั้งสองชนิดดังกล่าวแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นจากการทำงานของระบบ Fas-FasL ตัวอย่างเช่น Bcl-2 (Itoh et al., 1993), FLIP (Abe et al., 2006) และ laminin (Tanaka et al., 2009) การศึกษาในมดลูกมนุษย์ พบว่าโปรตีน Fas-FasL มีการแสดงออกตลอดวงรอบการมีประจำเดือน ในขณะที่โปรตีน Bcl-2 มีการแสดงออกมากที่สุดในช่วงท้ายของระยะ proliferative phase ก่อนที่จะค่อยๆ ลดลงในระยะ secretory phase และพบการเสื่อมตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นในระยะดังกล่าว (Yamashita et al., 1999; Otsuki, 2001) สอดคล้องกับการศึกษานี้ ที่พบการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้นค่อนข้างน้อยในปีกมดลูก

ระยะฟอลลิคูลาร์เมื่อเทียบกับระยะลูเตียลช่วงกลาง ขณะที่ laminin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในเซลล์เยื่อบุของมดลูก จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้มีการเจริญของเซลล์ รวมถึงเป็นส่วนหนึ่งในการยับยั้งการเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของระบบ Fas-FasL ในทางตรงกันข้าม พบว่า type IV collagen (COL-IV) จะทำหน้าที่ในการสนับสนุนการทำงานของระบบ Fas-FasL เพื่อให้มีการเสื่อมตายเกิดขึ้นในระยะ secretory phase และพร้อมเข้าสู่วงรอบการมีประจำเดือนอีกครั้ง (Tanaka et al., 2009) ขณะที่การแสดงออกของ FLIP ที่ลดลงในมดลูกมนุษย์ในช่วงท้ายของระยะ secretory phase อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเสื่อมตายเกิดจากการทำงานของระบบ Fas-FasL (Abe et al., 2006) ซึ่ง FLIP มีคุณสมบัติที่สามารถจะเข้าไปจับกับ FADD และ FLICE ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณผ่านโปรตีน Fas และไม่ก่อให้เกิดการเสื่อมตายจากการทำงานของระบบ Fas-FasL (Nagata, 1997; Irmler et al., 1997) ดังนั้น การเสื่อมตายของเซลล์มดลูกที่เกิดขึ้นจากการแสดงออกของโปรตีน Fas ในระยะ secretory phase อาจเป็นส่วนหนึ่งของกลไกภายในร่างกาย เพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณเซลล์มดลูกให้กลับสู่สภาวะปกติและพร้อมเข้าสู่การมีรอบเดือนอีกครั้ง นอกจากนี้ ในช่วงที่มีการตั้งท้องพบว่า ร่างกายได้มีการทำงานแบบ immune privilege เพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของระบบ Fas-FasL ดังเช่นในมดลูกในช่วงที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน พบว่า stromal cells ได้มีการหลั่งสาร interferon-gamma และ TNF-alfa ซึ่งสามารถยับยั้งการเสื่อมตายที่เกิดจากการทำงานของระบบ Fas-FasL ได้ ทำให้เซลล์บริเวณนี้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในช่วงที่มีการฝังตัวเกิดขึ้น (Fluhr et al., 2007) สารกลุ่มไซโตไคน์บางชนิดเช่น transforming growth factor-ß (TGF- ß) และ platelet-derived growth factor (PDGF) มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของโปรตีน FasL ด้วยเช่นกัน โดยไซโตไคน์ดังกล่าวนี้สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโปรตีน FasL เพิ่มมากขึ้นภายในมดลูกมนุษย์ (Garcia-Velasco et al., 1999) การศึกษาในปีกมดลูกระบือปลักครั้งนี้ พบการแสดงออกของโปรตีน FasL ระยะลูเตียลช่วงกลางใกล้เคียงกับระยะฟอลลิคูลาร์และอยู่ในระดับต่ำ ผลการศึกษาที่ได้นี้อาจเกี่ยวกับการทำงานของ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรวมถึงความอยู่รอดของเซลล์ภายใน endometrium ของวงรอบการเป็นสัด โดยพบว่า VEGF มีอิทธิพลต่อโปรตีน FasL โดยจะลดการแสดงออกของโปรตีน FasL ซึ่งพบ VEGF ภายใน endometrial stromal cells เพิ่มมากขึ้นเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะ secretory phase ช่วงกลางไปจนถึงช่วงปลาย (Berkkanoglu et al., 2004) ยังมีการศึกษาในมดลูกมนุษย์พบว่า การแสดงออกของโปรตีน FasL ในระยะ secretory phase มากกว่าในระยะ proliferative phase โดยมีการแสดงออกภายใน stromal cells และ glandular cells โดยการแสดงออกในระยะ secretory phase อาจมีผลในการเหนี่ยวนำให้ stroma cells และ glandular cells เกิดการเสื่อมตายเพื่อให้ตัวอ่อนสามารถหลบหลีกและเข้าไปฝังตัวได้ในกรณีที่มีการตั้งท้องเกิดขึ้น (Selam et

al., 2001) รวมถึงอาจมีส่วนในการทำหน้าที่สำคัญในการกำจัดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน (Hunt et al., 1997) ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมในฮอร์โมน human chorionic gonadotropin (hCG) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พบในช่วงที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนเกิดขึ้น โดยพบว่าฮอร์โมน hCG มีส่วนช่วยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน FasL ภายใน stromal cells และ glandular cells และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันภายในมดลูกให้เกิดการเสื่อมตายได้ (Kayisli et al., 2003) การศึกษาในมดลูกหนูในระยะแรกของการตั้งท้อง ระบุว่าการปรากฏของตัวอ่อนทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ขึ้นบริเวณเซลล์เยื่อบุของมดลูก รวมถึงมีการแสดงออกของโปรตีน Fas-FasL มากขึ้นด้วย ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนทั้งสอง อาจเกี่ยวข้องกับกลไกภายในร่างกายเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน เช่น กระบวนการ decidualizaion (Joswig et al., 2003) และ trophoblastic evasion (Selam et al., 2001) ดังนั้น การปรากฏของโปรตีน FasL ภายในมดลูกในช่วงที่มีการตั้งท้องจึงเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำหน้าที่ภายในร่างกายแบบ immune privilege เพื่อช่วยให้ตัวอ่อนมีโอกาสรอดชีวิต โดยไม่ได้รับผลกระทบจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ การปรากฏของโปรตีน FasL ในระยะลูเตียลช่วงกลางซึ่งไม่มีการตั้งท้องเกิดขึ้นอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเสื่อมตายภายในมดลูกเช่นเดียวกับที่พบในมนุษย์ ซึ่งสาเหตุที่การแสดงออกของโปรตีน FasL ภายในกระบือไม่ชัดเจนเท่าในมนุษย์ อาจเป็นผลมาจากการที่ในสัตว์ไม่มีการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุภายในมดลูกชัดเจนเหมือนที่ปรากฏในมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวนี้อาจใช้อธิบายได้ว่าทำไมการแสดงออกโปรตีน FasL ในกระบือปลักในระยะลูเตียลช่วงกลางจึงพบการแสดงออกได้น้อยกว่าในมนุษย์

การทำงานของระบบ Fas-FasL ที่เกี่ยวข้องกับกลไก immune privilege

ดังที่กล่าวแล้วว่า การแสดงออกโปรตีน FasL ภายในมดลูก มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานแบบ immune privilege การศึกษาที่ผ่านมาในรกและมดลูกพบว่า การทำงานของระบบ Fas-FasL มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของตัวอ่อนในช่วงตั้งท้อง ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องตัวอ่อนโดยการทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อช่วยให้การตั้งท้องมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้น (Hunt et al., 1997; Kauma et al., 1999) การอธิบายดังกล่าวข้างต้นนี้สัมพันธ์กับการศึกษาที่เกี่ยวกับการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวภายใน endometrium ของมดลูกมีจำนวนลดลงในช่วงแรกของการตั้งท้อง (Pace et al., 1991) ในขณะที่การแสดงออกของ FasL ในช่วงที่ไม่มีการตั้งท้องพบว่า มีการเสื่อมตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นทันทีที่มีการแทรกซึมเข้าสู่ภายในเนื้อเยื่อมดลูก (Imarai et al., 2005) ดังนั้น การแสดงออกของโปรตีน FasL ที่เกิดขึ้นดังกล่าวในช่วงที่ไม่มีการตั้งท้อง อาจเกี่ยวข้องกับการทำงานในร่างกายแบบ

immune privilege โดยผ่านทางการทำงานของระบบ Fas-FasL เพื่อช่วยทำหน้าที่ในการจำกัดขอบเขตความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (Ferguson et al., 2002) การศึกษาในครั้งนี้พบว่า ท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัส พบการแสดงออกของโปรตีน FasL อย่างเด่นชัดในระยะฟอลลิคูลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเตียลช่วงกลาง ขณะที่ภายในปีกมดลูกและท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาและอินฟันดิบูลัม ไม่พบการแสดงออกของ FasL ที่แตกต่างกัน การแสดงออกของโปรตีน FasL ทั้งในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียลช่วงกลางนั้นปรากฏอย่างชัดเจนและกระจัดกระจายที่บริเวณเซลล์เยื่อบุ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในโค (Bergqvist et al., 2005a)

Fas เป็นโปรตีนตัวรับที่พบได้ในเซลล์ทั่วๆ ไป ขณะที่ การปรากฏของ FasL ต้องอาศัยสภาพจำเพาะเจาะจงกว่าและจะปรากฏในรูปแบบที่จำกัดภายในเซลล์บางชนิดเท่านั้น เช่น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์ในอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege (Lettau et al., 2008) เช่น รก (Kauma et al., 1999) กระจกตา (Stuart et al., 1997) และอัณฑะ (Lee et al., 1997) การปรากฏของ FasL ดังกล่าว เป็นการแสดงออกเพื่อส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย ดังนั้น การปรากฏของโปรตีน FasL ที่เด่นชัดในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสของกระบือปลักในครั้งนี้ อาจเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของระบบ Fas-FasL เพื่อช่วยสนับสนุนการอยู่รอดของเซลล์อสุจิในช่วงที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิเกิดขึ้น เป็นที่ทราบดีว่า ท่อนำไข่เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สำคัญมากมาย เช่น การเดินทางของเซลล์อสุจิ (Suarez and Pacey, 2006) การคาปาซิเตชั่น (Rodriguez-Martinez, 2007) การกักเก็บเซลล์อสุจิ (Suarez, 2002) จนกระทั่งปฏิสนธิกับโอโอไซต์ แต่การที่เซลล์อสุจิซึ่งบรรจุโปรตีนแปลกปลอมจากภายนอก (โดยเฉพาะจาก seminal plasma) ได้รุกล้ำเข้ามาภายในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ทำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น มีการศึกษาพบว่าเซลล์อสุจิที่เดินทางเข้ามามีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันภายในมดลูก โดยกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาทำลายเซลล์อสุจิ (Katila, 2001) การศึกษาภายในชั้นเยื่อบุของมดลูกสุกรเกี่ยวกับการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด โดยพบว่า ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ มีปริมาณมากที่สุดในระยะโปรเอสตรัสและระยะเอสตรัส (Kaeoket et al., 2002) และลิมโฟไซต์โดยเฉพาะ T-cell มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากที่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น (Tunon et al., 1999) โดยเซลล์ทั้งหมดนี้ มีการแสดงออกของโปรตีน Fas อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Iwai et al., 1994) ในทางตรงกันข้าม การศึกษาภายในส่วน UTJ และอิสธ์มัส ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิกลับพบว่า การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวเกิดขึ้นน้อยมากในท่อนำไข่ทั้งสองส่วนนี้ โดยไม่พบปรากฏของนิวโทรฟิลภายใน UTJ และอิสธ์มัสหลังการผสมพันธุ์ (Rodriguez-

Martinez et al., 1990) นอกจากนี้ ยังพบว่า เซลล์อสุจิที่รอดพ้นจากการถูกเก็บกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในมดลูก มีความเสียหายเกิดขึ้นมากที่บริเวณ plasma membrane ในขณะที่เซลล์อสุจิส่วนใหญ่ภายใน UTJ อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (Rodriguez-Martinez et al., 1990) สอดคล้องกับการศึกษาในท่อนำไข่ของสุกรในช่วงหลังการตกไข่หลังการผสมพันธุ์ ที่ไม่พบการปรากฏของนิวโทรฟิลเลยในเนื้อเยื่อทุกชั้นของท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัส (Jiwakanon et al., 2006) ขณะที่ภายในท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาและอินฟันดิบูลัมในระยะโปรเอสตรัสและเอสตรัส พบจำนวนนิวโทรฟิลและลิมโฟไซต์เป็นจำนวนมาก (Jiwakanon et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ ซึ่งอยู่ติดกับท่อนำไข่ส่วนอิสธ์มัส อาจมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างจากมดลูกและท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลาและอินฟันดิบูลัม ซึ่งอาจใช้โปรตีน FasL ในการควบคุมปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาว คล้ายกับการทำงานที่พบในลำไส้ส่วน colon ที่มีการปรากฏของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน FasL เพื่อเหนี่ยวนำให้ T-cells เกิดการเสื่อมตายและสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (Zhang et al., 2005) ดังนั้น การทำงานของโปรตีน FasL ภายในท่อนำไข่จะทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการปฏิสนธิ นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับการกักเก็บเซลล์อสุจิพบว่า เซลล์อสุจิจะเข้าไปยึดติดกับเยื่อบุภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสธ์มัสในช่วงก่อนการตกไข่โดยเฉพาะบริเวณหลืบของ UTJ และอิสธ์มัส (Suarez, 1987) ซึ่งการแสดงออกโปรตีน FasL บริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อบุ อาจเกี่ยวข้องในการทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อให้เซลล์อสุจิสามารถเข้ามายึดจับกับเยื่อบุของท่อนำไข่ได้

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า โปรตีน Fas อาจเป็นโปรตีนตัวรับที่มีอยู่ตลอดเวลาในการส่งสัญญาณให้เกิดการเสื่อมตายในบริเวณที่มีการแสดงออก เพื่อการรักษาสมดุลระหว่างการเสื่อมตายของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในช่วงของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นในปีกมดลูกแต่อาจไม่มีการแสดงออกชัดเจนนักภายในท่อนำไข่ สำหรับโปรตีน FasL จะมีความสำคัญมากกว่า เนื่องจากจะมีการแสดงออกที่จำเพาะเจาะจงกว่าทั้งปริมาณและช่วงเวลาที่ปรากฏในวงรอบการเป็นสัด ซึ่งแตกต่างกันระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง โดยเฉพาะในท่อนำไข่กระบือปลักในบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ ซึ่งเป็นการทำหน้าที่ภายในร่างกายแบบ immune privilege จึงเป็นไปได้ว่า การปรากฏของโปรตีน FasL มีส่วนทำหน้าที่ในการช่วยเหลือไม่ให้เซลล์อสุจิถูกทำลายและมีชีวิตรอด ก่อนที่เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่ไปยังท่อนำไข่บริเวณที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น และสนับสนุนการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับกลไกดังกล่าว อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อค้นหาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของระบบ Fas-FasL ที่มีต่อการเสื่อมตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในท่อนำไข่ ที่อาจมีผลต่อความสำเร็จของกลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิในอนาคตต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กลุ่มงานเศรษฐกิจการปศุสัตว์. 2000. (2543). กระบือ. ใน: ข้อมูลเศรษฐกิจการปศุสัตว์ประจำปี 2543. 11-13.

ไพศาล เทียนไทย. 2007. (2550). กายวิภาคเปรียบเทียบของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย. ใน: กายวิภาคศาสตร์และหน้าที่ระบบสืบพันธุ์เพศเมียในสัตว์เลี้ยง. กรุงเทพ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 77-106.

ภาษาอังกฤษ

Abe, H., Onodera, M. and Sugawara, S., 1993. Scanning electron microscopy of goat oviductal epithelium cells at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. J. Anat. 183: 425-421.

Abe, H., Onodera, M., Sugawara, S., Satoh, T. and Hoshi, H., 1999. Ultrastructural features oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. J. Anat. 195: 515-521.

Abe, H., Shibata, M. A. and Otsuki, Y. 2006. Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells. Mol. Hum. Reprod. 12: 535-541.

Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G. and Fais, S.. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. J. Exp. Med. 195: 1303-1316.

Ashany, D., Song, X., Lacy, E., Nikolic-Zugic, J., Friedman, S. M. and Elkon, K.B. 1995. Th1 CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway. 92: 11225-11229.

Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramdell, F. and Lynch, D.H. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J. Exp. Med. 181: 71-77.

Ali, A., Abdel-Razek, A.K., Abdel-Ghaffar, S. and Glatzel, P.S. 2003. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). Reprod. Domest. Anim. 38: 214-218.

Arck, P.C., Gilhar, A., Bienenstock, J. and Paus, R. 2008. The alchemy of immune privilege explored from a neuroimmunlogical perspective. Pharmacology 8: 480-489.

Bergqvist, A.S., Killian, G., Erikson, D., Hoshino, Y., Bage, R., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2005a. Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. Anim. Reprod. Sci. 86: 71-88.

Bergqvist, A.S., Yokoo, M., Bage, R., Sato, E. and Rodriguez-Martinez H. 2005b. Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviduct epithelium. J. Reprod. Dev. 51: 445-453.

Berkkanoglu, M., Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U.A., Selam, B.F. and Arici, A. 2004. Regulation of Fas ligand expression by vascular endothelial growth factor in endometrial stromal cells *in vitro*. Mol. Hum. Reprod. 10: 393-398.

Bischof, R.J., Brandon, M.R. and Lee, C.S. 1995. Cellular immune response in the pig uterus during pregnancy. J. Reprod. Immunol. 29: 161-178.

Blott, E.J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M. and Griffiths, G.M. 2001. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. J. Cell. Sci. 114: 2405-2416.

Briton-Jones, C., Lok, I.H., Po, A.L., Cheung, C.K., Chiu, T.T. and Haines, C. 2006. Changes in the ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression and their cellular localization throughout the ovulatory cycle in the human oviduct. J. Assist. Reprod. Genet. 23: 149-156.

Brown, D. 1987. Female reproductive system. In: Textbook of Veterinary Histology. 3rd ed. Philadelphia. 327-334.

Camous, S., Prunier, A. and Pelletier, J. 1985. Plasma prolactin, LH, FSH and estrogen excretion patterns in gilts during sexual development. J. Anim. Sci. 60: 1308-1317.

Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D. and Ploix, C.C. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. Immunol. Rev. 13: 48-65.

Chinnaiyan, A. M., Rourke, K.O., Tewari, M. and Dixit, V.M. 1995. FADD, A novel death domain, containing protein, interacts with the death domain of the fas and initiates apoptosis. Cell 81: 505-512.

Clarke, P.G. and Clarke, S. 1996. Nineteenth century research on naturally occing cell death and related phenomena. Anat. Embryol. 193: 81-99.

De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. Hum. Reprod. Update. 11: 205-214.

Dopson, H. and Kamonpatana, M. 1986. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes cows and zebu. J. Reprod. Fertil. 77: 1-36.

Drost, M. 2007. Bubaline versus bovine reproduction. Theriogenology 68: 447-449.

Dziuk, P. 1985. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. J. Reprod. Fertil. Suppl. 33: 57-63.

Ferguson, A.T., Green, D.R. and Griffith, T.S. 2002. Cell death and immune privilege. Intern. Rev. Immunol. 21: 153-172.

Filippini, A., Riccioli, A., Padula, F., Lauretti, P., Dalessio, A., Cesaris, P.D., Gandini, L., Lenzi, A. and Ziparo, E. 2001. Immunology and immunopathology of the male genital tract. J. Hum. Repod. Sci. 7: 444-449.

Fluhr, H., Krenzer, S., Stein, G.M., Stork, B., Deperschmidt, M., Wallwiener, D., Wesselborg, S., Zygmunt, M. and Licht, P. 2007. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. J. Cell. Sci. 120: 4126-4133

Francavilla, S., D'abrizio, P., Rucci, N., Silvano, G., Properzi, G. and Straface, E. 2000. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2692-700.

Francisco, J.R., Bernard, A.J., Karin, A.S., Helena, T., Ben, C. and Kajtja, J.T. 2004. Role of Fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes *in vitro*. Biol. Reprod. 71: 790-796.

Frandson, R.D. 2006. Anatomy of the female reproductive system. In: Anatomy and Physiology of Farm Animals. 4th ed. R.D. Frandson, W.L. Wilke and A.D. Fails (eds.) Oxford: Blackwell Publishing. 387-394.

Garcia-Velasco, J.A., Arici, A., Zreik, T., Naftolin, F. and Mor, G. 1999. Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis. Mol. Hum. Reprod. 5: 642-650.

Gwathmey, T.M., Ignotz, G.G., Mueller, J.L., Manjunath, P. and Suarez, S.S. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. Biol. Reprod. 75: 501-507.

Ghosh, F., Rauer, O. and Arner, K. 2008. Immune privilege of allogenic neuroretinal transplant in the subconjunctival space. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 246: 1715-1722.

Green, D.R. and Ferguson, T.A. 2001. The role of Fas ligand in immune privilege. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 917-924.

Haanen, C. and Vermes, I. 1995. Apoptosis and inflammation. Mediators Inflamm. 4: 5-15.

Hacker, G. 2000. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res. 301: 5-17.

Hafez, E.S.E. 1993. Anatomy of female reproduction. In: Reproduction in Farm Animals. 6th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia: Lea & Febiger. 45-48.

Havelka, P., Oborna, I., Brezinova, J. and Lichnovsky, V. 2005. Apoptosis and expression of Bcl-2 in human endometrium in natural and artificial cycles. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 149: 303-307.

Hawk, H. W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. J. Dairy Sci. 66: 2645-2660.

Ho, H.C. and Suarez, S.S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction 122: 519-526.

Hopwood, D. and Levison, D.A. 1976. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. J. Pathol. 119: 159-166.

Hori, J. 2008. Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. J. Ocul. Biol. Infor. 1: 94-100.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. and Swanson, P.E. 2009. Cell death. N. Engl. J. Med. 361: 1570-1583.

Hu, C.L., Cowan, R.G., Harman, R.M., Porter, D.A. and Quirk, S.M. 2001. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD65) and Fas ligand. Biol. Reprod. 64: 518-526.

Hunt, J.S., Vassmer, D., Ferguson, T.A. and Miller, L. 1997. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. J. Immunol. 158: 4122-4128.

Hunter, R.H.F. 1981. Sperm transport and reservoir in the pig oviduct in relation to the time pf ovulation. J. Reprod. Fertil. 63: 109-117.

Hunter, R.H.F., Flechon, B. and Flechon, J. E. 1991. Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. Tissue Cell 23: 641-656.

Hunter, R.H.F. 1998. Have the fallopian tubes a vital role in promoting fertility? Acta Obstet. Gynecol. Scand. 77: 475-486.

Hunter, R.H.F. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? Reprod. Nutri. Dev. 45: 281-290.

Imarai, M., Varela-Nallar, L., Figueroa-Gaete, C., Gonzalez, P., Valdes, D., Velasquez, L., Cardenas, H. and Maisey, K. 2005. Fas ligand in the uterus of the non-pregnant mouse induces apoptosis of CD4+ T cells. J. Reprod. Immunol. 66: 13-32.

Inoue, N., Maeda, A., Matsuda-Minehata, F., Fukuta, K. and Nanube, N. 2006. Expression and localization of Fas ligand and Fas during atresia in porcine ovarian follicles. J. Reprod. Dev. 52: 723-730.

Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 388: 190-195.

Isobe, N. and Yoshimura, Y.1999. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: A DNA-END labeling histochemical study. Theriogenology 53: 897-904.

Ito, T., Ito, N., Saatoff, M., Hashizume, H., Fukamizu, H., Nickoloff, B.J., Takigawa, M. and Paus, R. 2008. Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. J. Invest. Dermatol. 128:1196-1206.

Itoh, N., Tsujimoto, Y. and Nagata, S. 1993. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. J. Immunol. 151: 621-627.

Iwai, K., Miyawaki, T., Takizawa, T., Konno, A., Ohta, K., Yachie, A., Seki, H. and Taniguchi, N. 1994. Differential expression of Bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-

mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Blood 84: 1201-1208.

Jia, J., Guan, D., Zhu, W., Alkayed, N. J., Wang, M. M., Hua, Z. and Xu, Y. 2008. Estrogen inhibits Fas-mediated apoptosis in experimental stroke. Exp. Neurol. 215: 48-52.

Jiwakanon, J., Persson, E., Kaeoket, K. and Dalin, A.M. 2005. The sow endosalpinx at different stages of the oestrous cycle and at anoestrus: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. Reprod. Domest. Anim. 40: 28-39.

Jiwakanon, J., Persson, E. and Dalin, A.M. 2006. The influence of pre- and post-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow oviduct. Reprod. Domest. Anim. 41: 455-466.

Joswig, A., Gabriel, H. D., Kibschull, M. and Winterhager, E. 2003. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. Reprod. Biol. Endocrinol. 26: 1-9.

Ju, S.T., Cui, H., Panka, D. J., Ettinger, R. and Marshak-Rothstein, A. 1994. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 4185-4189.

Kaeoket, K., Persson, E. and Dalin, A.M. 2002. Corrigendum to “The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system” [Anim. Reprod. Sci. 65 (2001): 95-114]. Anim. Reprod. Sci. 73: 89-107.

Kanai, Y. and Shimizu, H. 1983. Characteristics of the estrous cycle of the swamp buffalo under temperate conditions. Theriogenology 19: 593-602.

Kanai, Y. and Shimizu, H. 1984. Plasma concentration of LH, progesterone and oestradiol during the oestrous cycle in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). J. Reprod. Fertil. 70: 507-610.

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green DR. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. Mol. Cell. 1: 543-551.

Katila, T. 2001. Sperm-uterine interactions: a review. Anim. Reprod. Sci. 68: 267-272.

Kauma, S.W., Huff, T.F., Hayes, N. and Nilkaeo, A. 1999. Placenta Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. J. Clin. Endocrinology Metab. 84: 2188-2194.

Kayisli, U. A., Selam, B., Guzeloglu-Kayisli, O., Demir, R., Arici, A. 2003. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. J. Immunol. 171: 2305-2313.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with-wild ranging implication in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26: 239-257.

Koonjaenak, S., Chanatinart, V., Aiumlamai, S., Pinyopumimintr, T. and Rodriguez-Martinez, H. 2007. Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) in Thailand. Asian J. Androl. 9: 92-101.

Krum, S.A., Miranda-Carboni, G.A., Hauschka, P.V., Carroll, J.S., Lane, T.F., Freedman, L.P. and Brown, M. 2008. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. EMBO. J. 27: 535-545.

Kunes, P., Krejsek, J., Brtko, M., Mandak, J., Kolackova, M., Trojackova Kudlova, M. and Andrys C. 2009. Neutrophil apoptosis by Fas/FasL: harmful or advantageous in cardiac surgery?. Thorac. Cardiovasc. Surg. 57: 1-6.

Kuranaga, E., Kanuka, H., Hirabayashi, K., Suzuki, M., Nishihara, M. and Takahashi, M. 2000. Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum. FEBS. Lett. 466: 279-282.

Lee, J., Richburg, J.H., Younkin, S.C. and Boekelheide, K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology 138: 2081-2088.

Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J. and Zheng, L. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annu. Rev. Immunol. 17: 221-253.

Lettau, M., Paulsen, M., Kabelitz, D., Janssen, O. 2008. Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells. Curr. Med. Chem. 1684-1696.

Lewis-Wambi, J.S. and Jordan, V.C. 2009. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? Breast Cancer. Res. 11: 1-12.

Lynch, D.H., Ramsdell, F. and Alderson, M.R. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol. Today 16: 569-574.

Manjunath, P. and Sairam, M. R. 1987. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. Biochem. J. 241: 685-692.

Marsden, V.S. and Strasser, A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl2, BH3-only proteins and more. Annu. Rev. Immunol. 21: 71-105.

Medema, J.P. 1997. Flice is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). J. Embryo. 16: 2794-2804.

Menezo, Y. and Guerin, P. 1997. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 73: 99-104.

Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y. and Greaves, M.F. 1992. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. J. Histochem. Cytochem. 40: 1819-1825.

Monroe, D.G., Jin, D.F. and Sanders, M.M. 2000. Estrogen opposes the apoptotic effects of bone morphogenetic protein 7 on tissue remodeling. Mol. Cell. Biol. 20: 4626-4634.

Monroe, D.G., Berger, R.R. and Sanders, M.M. 2002. Tissue-protective effects of estrogen involve regulation of caspase gene expression. Mol. Endocrinol. 16: 1322-1331.

Montel, A.H., Bochan, M.R., Hobbs, J.A., Lynch, D.H. and Brahmi, Z. 1995. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. Cell. Immunol. 166: 236-246.

Mor, G., Kohen, F., Garcia-Velasco, J., Nilsen, J., Brown, W., Song, J. and Naftolin, F. 2000. Regulation of fas ligand expression in breast cancer cells by estrogen: functional differences between estradiol and tamoxifen. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 73: 185-194.

Mor, G., Sapi, E., Abrahams, V.M., Rutherford, T., Song, J., Hao, X.Y., Muzaffar, S. and Kohen, F. 2003. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. J. Immunol. 170: 114-122.

Mortimer, D., Leslie, E.E., Kelly, R.W. and Templeton, A.A. 1982. Morphological selection of human spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 64: 391-399.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365.

Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. Annu. Rev. Genet. 33: 29-55.

Nanda, A.S. and Nakao, T. 2003. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. Anim. Sci. J. 74: 443-455.

Nayak, N.R., Critchley, H.O., Slayden, O.D., Menrad, A., Chwalisz, K., Baird, D.T. and Brenner, R.M. 2000. Progesterone withdrawal up-regulates vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the superficial zone stroma of the human and macaque endometrium: potential relevance to menstruation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 3442-3452.

Niederer, P., Weiss, S., Caduff, R., Bajka, M., Szekely, G. and Harders, M. 2009. Uterus models for use in virtual reality histeroscopy stimulators. EURO. 6537: 1-6.

O'connell, J.O. 2001. Role of Fas-FasL in inflammatory disease. Expert Rev. Mol. Med. 10: 1-18.

Okano, A., Ogawa, H. Takahashi, H. and Geshi, M. 2007. Apoptosis in the porcine uterine endometrium during the estrous cycle, early pregnancy and post partum. J. Reprod. Dev. 53: 923-930.

Oliveira, J.B. and Gupta, S. 2008. Disorder of apoptosis: Mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency disease. J. Clin. Immunol. 28: 20-28.

Otsuki, Y. 2001. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. Med. Electron. Microsc. 34: 166-173.

Pace, D., Longfellow, M. and Bulmer, J.N. 1991. Characterization of intraepithelial lymphocytes in human endometrium. J. Reprod. Fertil. 91: 165-174.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Handrow, R.R., Sims, M.M. and First, N.L. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol. Reprod. 40: 1020-1025.

Paus, R., Ito, N., Takigawa, M. and Ito, T. 2003. The hair follicle and immune privilege. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 8: 188-194.

Phichitrasilp, T., Hondo, E., Kusakabe, K., Nakagawa, Y., Ihara, K., Wakitani, S. and Kiso, Y. 2009. Uterine natural killer cells in perforin and $ß_2$- microglobulin deficient mice. J. Vet. Med. Sci. 71: 251-253.

Priedkalns, J. 1987. Female reproductive system. In: Textbook of Veterinary Histology. 3rded. H.D. Dellmann and E.M. Brown (eds.). Philadelphia: Lea & Febiger. 327-334.

Quirk, S.M., Porter, D.A., Huber, S.C. and Cowan, R.G. 1998. Potentiation of Fas-mediated apoptosis of murine granulosa cells by interferon-tumor necrosis factor and cycloheximide. Endocrinology 139: 4860-4869.

Rane, M.J. and Klein, J.B. 2009. Regulation of neutrophil apoptosis by modulation of PKB/Akt activation. Front. Biosci. 14: 2400-2412.

Rensis, F.D. and Lopez-Gatius, F. 2007. Protocals for synchronizing estrous and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. Theriogenology 67: 209-216.

Robertson, S. 2005. Seminal plasma and male factor signaling in the female Reproductive tract. Cell Tissue Res. 322: 43-52.

Rodriguez-Martinez, H., Nicander, L., Viring, S., Einarsson, S. and Larrsson, K. 1990. Ultrastructure of uterotubal junction in preovulatory pigs. Anat. Histol. Embryol. 19: 16-36.

Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J.M. Martinez, E., Roca, J., Sanz, L. and Calvete, J.J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. Theriogenology 63: 514-535.

Rodriguez-Martinez, H., 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. Theriogenology 68: 138-146.

Rotello, R.J., Lieberman, R.C., Lepoff, R.B. and Gerschenson, L.E. 1992. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. Am. J. Pathol. 140: 449-456.

Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Billie, P.Y., Berry, D.M, Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W.C, McGlade, J.C., Ohashi, P.S. and Hakem, R. 2003. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. Genes. Dev. 17: 883-895.

Sapi, E., Brown, W.D., Aschkenazi, S., Lim, C., Munoz, A., Kacinski, B.M., Rutherford, T. and Mor, G. 2002. Regulation of Fas ligand expression by estrogen in normal ovary. J. Soc. Gynecol. Investig. 9: 243-250.

Schuberth, H.J., Taylor, U., Zerbe, H., Waberski, D., Hunter, R. and Rath, D. 2008. Immunological responses to semen in the female genital tract. Theriogenology 70: 1174-1181.

Selam, B., Kayisli, U.A., Mulayim, N., Arici, A. 2001. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. Biol. Reprod. 65: 979-985.

Seli, E., Guzeloglu-Kayisli, O., Cakmak, H., Kayisli, U. A., Selam, B. and Arici, A. 2006. Estradiol increases apoptosis in human coronary artery endothelial cells by up-regulating Fas and Fas ligand expression. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 4995-5001.

Soong, J., Rutherford, T., Naftolin, F., Brown, S. and Mor, G. 2002. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. Mol. Hum. Reprod. 8: 447-455.

Sonnenburg, J.L., Angenent, L.T. and Gordon, J.I. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? Nat. Immunol. 5: 569-573.

Steffl, M., Schweiger, M., Sugiyama, T. and Amselgruber, W.M. 2008. Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. Ann. Anat. 190: 46-52.

Stein-Streilein, J. 2008. Immune regulation and the eye. Trends Immunol. 29: 548-554.

Stuart, P.M., Griffith, T.S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X. and Ferguson, T.A., 1997. CD95 ligand (FASL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. J. Clin. Invest. 99: 396-402.

Suarez, S.S. 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. Biol. Reprod. 36: 203-210.

Suarez, 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 a sperm reservoir. Biol. Reprod. 44: 998-1004.

Suarez, S.S., Brockman, K. and Lefebvre, R. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination. Biol. Reprod. 44: 998-1004.

Suarez, S.S. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. Reprod. Domest. Anim. 37: 140-143.

Suarez, S.S. and Pacey, A.A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. Hum. Reprod. Update. 12: 23-27.

Suarez, S.S. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. Int. J. Dev. Biol. 52: 455-462.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell. 75: 1169-1178.

Sugiura, T., Murakawa, Y., Nagai, A., Kondo, M. and Kobayashi, S. 1999. Fas and Fas ligand interaction induce apoptosis in inflammatory myopathies: CD4+ T cells cause muscle cell injury directly in polymyositis. Arthritis Rheum. 42: 291-298.

Susan, E. 2007. Apoptosis: A review of program cell death. Toxicol. Pathol. 35: 495-516.

Tanaka, T., Wang, C. and Umesaki, N. 2009. Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. Int. J. Mol. Med. 23: 173-180.

Taylor, A.W. 2007. Ocular immunosuppressive microenvironment. Chem. Immunol. Allergy. 92: 71-75.

Thomas, P.G., Ball, B.A. and Brinsko, S.P. 1994. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. Biol. Reprod. 51: 222-228.

Tienthai, P., Kjellen, L., Pertoft, H., Suzuki, K. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. Reprod. Fertil. Dev. 12: 173-182.

Tienthai, P., Sajjarengpong, K. and Techakumphu, M. 2009. Light and scanning electron microscopic studies of oviductal epithelium in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) at the follicular and luteal phase. Reprod. Domest. Anim. 44: 450-455.

Troedsson, M.H., Liu, I.K. and Crabo, B.G. 1998. Sperm transport and survival in the mare: a review. Theriogenology 50: 807-818.

Tunon, A.M., Nummijarvi, A., Katila, T., Magnusson, U. and Rodriguez-Martinez, H. 1999. Distribution of T cells in the endometrium of the mare 6 and 48 h after insemination. Reprod. Domest. Anim. 34: 443-444.

Vandemark, N.L. and Moeller, A.N. 1951. Speed of spermatozoan transport in reproductive tract of estrous cow. Am. J. Physiol. 165: 674-679.

Vandemark, N. L. and Hays, R. L. 1952. Uterine motility response to mating. Am. J. Physiol. 170: 518-521.

Wu, X., Pang, S. T., Sahlin, L., Blanck, A., Norstedt, G. and Flores-Morales, A. 2003. Gene expression profiling of the effects of castration and estrogen treatment in the rat uterus. Biol. Reprod. 69: 1308-1317.

Xerri, L., Devilard, E., Hassoun, J., Mawas, C. and Birgm, F. 1997. Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. Mol. Pathol. 50: 87-91.

Yamashita, H., Otsuki, Y., Matsumoto, K., Ueki, K. and Ueki, M. 1999. Fas ligand, Fas antigen and Bcl-2 expression in human endometrium during the menstrual cycle. Mol. Hum. Reprod. 5: 358-364.

Yudin, A.I., Hanson, F.W. and Katz, D.F. 1989. Human cervical mucus and its interaction with sperm: a fine-structural view. Biol. Reprod. 40: 661-671.

Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R. W., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J. C., Green, D. and Swain, S. L. 1997. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. J. Exp. Med. 185: 1837-1849.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย พงษ์พิสุทธิ์ จิวะเจริญ เกิดวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี เกษตรศาสตรบัณฑิต คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี 2550 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขากายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ทางสัตวแพทย์ ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2551

ผลงานวิจัย

Pongpisut Chivacharern Paisan Tienthai. 2010. Fas-L Immunolocalization in Thai swamp buffalo oviduct. Proceeding of the 9th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference. Bangkok, Thailand. April 1, Vol. 40, p.114.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย