



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การปรากฏของไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงาน  
ของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไข่ของกระบี้อปลักไทย

ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียล

โดย

ไพศาล เทียนไทย

พรชลิต อัสวชีพ

มีนาคม 2554

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนโครงการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2552 (ครั้งที่ 3) ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

กราบขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร. เกียรติยศ สัจจเจริญพงษ์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกและอนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของภาควิชา และกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างพร้อมการบันทึกภาพเพื่อใช้ประกอบในรายงานการวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ดร. เเผด็จ ธรรมรักษ์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เชนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการวิจัยทางสถิติ

ขอขอบคุณ คุณพงษ์พิสุทธิ์ จิระเจริญ นิสิตมหาบัณฑิต สาขากายวิภาคศาสตร์ประยุกต์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการดำเนินการวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณศิลาปีย์ เพียรชอบ คุณวิฑูรย์ มะบุตร และคุณจันทิมา อินทรปัญญา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือในการตัดชิ้นเนื้อ การเตรียมอุปกรณ์ การเตรียมสีย้อม การเตรียมสารเคมีพื้นฐาน

ขอขอบคุณเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกๆ ท่าน ที่ได้เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกให้กับคณะผู้วิจัยเข้าไปเก็บตัวอย่างของกระบือปลัก

## ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย)	การปรากฏของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงานของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อน้ำไขของกระเป๋อปลักไทยในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียล
(ภาษาอังกฤษ)	The appearance of glycosaminoglycans and the regulation of Fas-Fas ligand system in Thai swamp buffalo ( <i>Bubalus bubalis</i> ) oviduct at the follicular and luteal phases

## ชื่อหัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย)	รศ.น.สพ.ดร. ไพศาล เทียนไทย
(ภาษาอังกฤษ)	Assoc. Prof. Dr. Paisan Tienthai
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์ ระดับ 8 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. อังรีตุนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9658 โทรสาร 0-2218-9657

## ชื่อผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย)	อ.น.สพ.ดร. พรชลิต อัสวชีพ
(ภาษาอังกฤษ)	Dr. Pornchalit Assawacheep
ตำแหน่งทางวิชาการ	อาจารย์ ระดับ 7 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ. อังรีตุนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9412 โทรสาร 0-2252-9575

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ระยะเวลาของโครงการวิจัย	1 ปี
งบประมาณรวม	400,000 บาท (สี่แสนบาทถ้วน)

## ผลผลิต (Output)

1. Chivachareern, P. and **Tienthai, P.** 2010. Fas-L immunolocalization in Thai swamp buffalo oviduct. Proceedings of the 9<sup>th</sup> Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Thai J. Vet. Med. Vol. 40(1), p. 113.
2. **Tienthai, P.**, Chivachareern, P., Sajjarengpong, K. and Assavacheep, P. 2011. Fas ligand in swamp buffalo oviduct during follicular and luteal phases. Thai J. Vet. Med. 41(1): 21-29
3. **Tienthai, P.** 2011. Hyaluronan and sulphated glycosaminoglycans in Thai swamp buffalo oviduct at follicular and luteal phase. Reprod. Demest. Anim. (writing manuscript).

ชื่อโครงการวิจัย	การปรากฏของไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์และกลไกการทำงานของระบบ Fas-Fas ligand ในท่อนำไขของกระบี้อปลักไทยในระยะฟอลลิคูลาร์ และระยะลูทีเยล
ชื่อผู้วิจัย	ไพศาล เทียนไทย และ พรชลิต อัคราชชีพ
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	กันยายน 2553

#### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต (ไฮยาลูโรแนน) และชนิดที่มีซัลเฟต (syndecan-1, syndecan-2) การปรากฏของตัวรับ CD44 การปรากฏของโปรตีน Fas และ Fas ligand (FasL) รวมทั้งการแสดงออกของ FasL mRNA ภายในท่อนำไขกระบี้อปลักไทย ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของรังไข่ เก็บอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกระบี้อปลักจากโรงฆ่าสัตว์จำนวนทั้งหมด 40 ตัว แบ่งกลุ่มของกระบี้อปลักออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่พบทางมหกายภาคของรังไข่ทั้งสองข้างคือ ระยะฟอลลิคูลาร์ (จำนวน 20 ตัว) และระยะลูทีเยลช่วงกลาง (จำนวน 20 ตัว) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียที่เก็บได้จะนำมาตรวจสอบและไม่มีความผิดปกติทางพยาธิวิทยา จากนั้นจึงนำตัดแบ่งท่อนำไขออกเป็น 4 ส่วนประกอบด้วย ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข (uterotubal junction, UTJ) อีส์มัส แอมพูลลา และอินฟันติบูลัม เก็บชิ้นเนื้อตัวอย่างส่วนหนึ่งใน 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ ผ่านกระบวนการทำพาราฟิน นำมาศึกษาการปรากฏของไฮยาลูโรแนนด้วยวิธีฮิสโตเคมี ศึกษาการปรากฏของ syndecan-1, syndecan-2, CD44, Fas, FasL ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และชิ้นเนื้ออีกส่วนหนึ่งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะนำมาสกัดแยก RNA เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของ FasL mRNA ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาเกี่ยวกับไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ พบการปรากฏของไฮยาลูโรแนน syndecan-1 และ syndecan-2 อย่างเด่นชัดในท่อนำไขกระบี้อปลัก โดยการปรากฏของไฮยาลูโรแนนและ syndecan-2 เท่านั้นที่พบความเข้มข้นในการติดสีบวกเข้มชัดเจนในส่วน UTJ และอีส์มัสเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไขส่วนอื่น และปรากฏชัดเจนมากในระยะฟอลลิคูลาร์ ขณะที่ตัวรับของไฮยาลูโรแนน CD44 ปรากฏที่เซลล์เยื่อของท่อนำไขทุกส่วนโดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ สำหรับการศึกษาการทำงานของระบบ Fas-FasL พบว่า การปรากฏของโปรตีน Fas สามารถพบได้ในเยื่อหุ้มท่อนำไขกระบี้อปลักทุกส่วน โดยไม่พบความแตกต่างในระดับความเข้มของการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไขแต่ละส่วน และระหว่างระยะของวงรอบการเป็นสัด ขณะที่ การปรากฏของโปรตีน FasL ภายในท่อนำไขกระบี้อปลักส่วน UTJ และอีส์มัสในระยะฟอลลิคูลาร์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูทีเยลช่วงกลาง สัมพันธ์กับการแสดงออกของ FasL mRNA ซึ่งแถบความเข้มพบได้อย่างเด่นชัดใน UTJ และอีส์มัสโดยเฉพาะระยะฟอลลิคูลาร์ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูทีเยลช่วงกลาง ผลการศึกษาที่ได้รับเป็นครั้งแรกในกระบี้อปลักถึงการทำหน้าที่ของไฮยาลูโรแนนซึ่งอาจทำงานร่วมกับ CD44 เพื่อรักษาการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิในช่วงก่อนการตกไข่ รวมทั้งหน้าที่ของ syndecan-2 ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมที่อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการคาปาซิเตชันและการปลดปล่อยของเซลล์อสุจิภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ การปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL และการแสดงออกของ FasL mRNA ในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิอาจเป็นข้อมูลสนับสนุนว่า ท่อนำไขกระบี้อปลักมีกลไกที่จัดเป็นอวัยวะที่เรียกว่า immune privileged organ

**คำสำคัญ** ไฮยาลูโรแนน ซินดีแคนส์ ระบบ Fas และ Fas ligand ท่อนำไข กระบี้อปลัก

<b>Project title</b>	The appearance of glycosaminoglycans and the regulation of Fas-Fas ligand system in Thai swamp buffalo ( <i>Bubalus bubalis</i> ) oviduct at the follicular and luteal phases
<b>Name of the investigators</b>	Paisan Tienthai and Pornchalit Assavacheep
<b>Month and year</b>	September, 2010

### Abstract

The objectives of the present study were to investigate the localization of non-sulphated (hyaluronan), sulphated (syndecan-1, syndecan-2) glycosaminoglycans (GAGs), CD44, Fas and Fas ligand (FasL) proteins as well as the expression of FasL mRNA in the Thai swamp buffalo oviducts in relation to ovarian functions. The reproductive tracts of female swamp buffalo (n=40) were collected from local abattoirs and were classified into 2 groups by the macroscopic characteristics of both ovaries, i.e. follicular phase (n=20) and mid-luteal phase (n=20). All reproductive organs used in this study were thoroughly examined and showed no pathological conditions. The oviduct was divided into 4 parts composed of uterotubal junction (UTJ), isthmus, ampulla and infundibulum. The specimens fixed in 4% paraformaldehyde were embedded in paraffin and for determining the presence of hyaluronan by histochemistry and the presence of syndecan-1, syndecan-2, Fas and FasL proteins by Immunohistochemistry. The other oviductal specimens were kept in -20°C for isolating total RNA to study the FasL mRNA expression by RT-PCR. The results about the GAGs revealed that the hyaluronan, syndecan-1 and syndecan-2 were found in all segments of swamp buffalo oviducts, however, the strong intensity of hyaluronan and syndecan-2 were obviously found in UTJ and isthmus (as sperm reservoir) compared to the other portions, and particularly presence at follicular phase. In addition, hyaluronan receptor CD44 has been detected in all oviductal portions, particularly during follicular phase. For the Fas-FasL system, the results demonstrated that Fas protein was generally localized within the epithelial layer of every oviductal segment without any statistically significances in the intensity of positive staining. On the other hands, the appearance of FasL protein was obviously found in UTJ and isthmus during follicular phase compared to mid-luteal phase and other oviductal segments ( $P<0.05$ ) in association with the expression of FasL mRNA which was shown in the sperm reservoir at follicular phase different from other oviductal portions and mid-luteal phase ( $P<0.05$ ). These findings demonstrated for the first time in the swamp buffalo suggesting that the hyaluronan might function via CD44 in the maintenance of sperm viability during pre-ovulation and of syndecan-2 in the sperm capacitation and the sperm releasing in the sperm reservoir. Furthermore, the presence of Fas-FasL proteins and the expression of FasL mRNA in the sperm reservoir might support the Fas-FasL system related to the immune privilege organ in the swamp buffalo oviduct.

**Keywords:** Hyaluronan, Syndecans, Fas-Fas ligand system, Oviduct, Swamp buffalo

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
รายละเอียดของโครงการ.....	iii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	v
สารบัญ.....	vi
รายการตารางประกอบ.....	vii
รายการรูปประกอบ.....	viii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	15
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	40
การเผยแพร่งานวิจัย.....	46
ตารางแสดงรายละเอียดการใช้งบประมาณ.....	47

## รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลของไฮyalูโรแนน.....	15
ตารางที่ 2 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1.....	18
ตารางที่ 3 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2.....	18
ตารางที่ 4 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44.....	21
ตารางที่ 5 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas.....	23
ตารางที่ 6 ระดับความเข้มในการติดสีบวกลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL.....	27

## รายการรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 การปรากฏทางฮิสโตเคมีของไฮยาลูโรแนนในท่อนำไขกระดูก.....	16
รูปที่ 2 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1 ในท่อนำไขกระดูก.....	19
รูปที่ 3 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2 ในท่อนำไขกระดูก.....	20
รูปที่ 4 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44 ในท่อนำไขกระดูก.....	22
รูปที่ 5 การติดสีบวกของโปรตีน Fas ในสไลด์ควบคุมบวกโดยใช้ต่อมน้ำเหลือง.....	23
รูปที่ 6 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ในท่อนำไขกระดูก.....	24
รูปที่ 7 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas.....	25
รูปที่ 8 การติดสีบวกโดยปรากฏเห็นเป็นสีน้ำตาลของโปรตีน FasL ในสไลด์ควบคุมบวก.....	27
รูปที่ 9 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ในท่อนำไขกระดูก.....	28
รูปที่ 10 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL.....	29
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ในการแสดงออกของ FasL mRNA โดยวิธี RT-PCR ในชั้นเยื่อ ของท่อนำไขกระดูก.....	30
รูปที่ 12 อัตราส่วน (%) ของระดับความเข้มในการแสดงออกของ FasL: $\beta$ -actin ที่ปรากฏ ในท่อนำไขกระดูก.....	30



## บทที่ 1

### บทนำ

“กระบือ” เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศอย่างมากชนิดหนึ่ง เกษตรกรไทยเลี้ยงกระบือควบคู่กับวัฒนธรรมการเกษตรมาตั้งแต่โบราณ กระบือนอกจากจะให้เนื้อเพื่อบริโภคแล้ว ยังมีมูลค่าที่ไม่สามารถประเมินได้ คือการใช้แรงงาน ได้มูลเป็นปุ๋ย และเปลี่ยนผลพลอยได้ในไร่นาราคาถูก ให้เป็นเนื้อหรือโปรตีนบริโภคในราคาสูง ประชากรกระบือของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น “กระบือปลัก” (swamp buffalo) ในรอบทศวรรษที่ผ่านมา ปริมาณกระบือทั้งประเทศมีแนวโน้มลดลงอย่างมาก คือปี 2524 มีกระบือ 6.1 ล้านตัว ขณะที่ปี 2533 มีกระบือ 4.7 ล้านตัว และตามสถิติที่ได้สำรวจล่าสุดเมื่อปี 2545 มีจำนวนกระบือในประเทศไทยอยู่ประมาณ 2.1 ล้านตัวเท่านั้น (FAO, 2003) สาเหตุที่ปริมาณกระบือทั้งประเทศลดลงมีสาเหตุหลายประการ เช่น การเปลี่ยนแปลงของระบบเศรษฐกิจของประเทศจากภาคการเกษตรกรรมเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมมากขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำการเกษตรกรรมหลายประการ เกษตรกรนิยมใช้เครื่องจักรกลการเกษตรเพิ่มขึ้น มีทำเลเลี้ยงสัตว์ลดลง แรงงานเลี้ยงกระบือบางฤดูจะขาดแคลน เนื่องจากการอพยพแรงงานจากชนบทเข้าสู่เมืองมากขึ้น รวมทั้งปริมาณการฆ่าและเนื้อกระบือเพื่อบริโภคภายในประเทศคิดเป็น 30% ของปริมาณที่บริโภคทั้งประเทศ เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของประชากรจึงมีความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์มากขึ้น (Nanda and Nakao, 2003) รวมทั้งปัญหาที่สำคัญคือความรู้ทางด้านคุณลักษณะของระบบสืบพันธุ์และผลตอบสนองทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ (Nanda et al., 2003) ทำให้การเลี้ยงกระบือของเกษตรกรเหล่านี้ไม่ได้รับการพัฒนาเท่าที่ควรเมื่อเปรียบเทียบกับโค ความรู้ความเข้าใจในเรื่องการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ที่สำคัญคือความรู้พื้นฐานทางด้านระบบสืบพันธุ์ของกระบือมีผลกระทบต่อการพัฒนาและการผลิตกระบือในระยะยาว โดยความรู้พื้นฐานเรื่องระบบสืบพันธุ์มีความเกี่ยวข้องตั้งแต่การเจริญพันธุ์ของสัตว์ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ กระบวนการต่างๆ ของเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นภายในทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย รวมทั้งเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อ การตรวจจัสต์ และการผสมเทียม ฯลฯ จะประสบความสำเร็จมากในโค แต่พัฒนาได้ช้ามากในกระบือ ปัญหาสำคัญที่พบคือ การตรวจจัสต์ในกระบือค่อนข้างทำได้ยาก รวมทั้งมีอาการที่แสดงออกและระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดแตกต่างกันไป (Perera, 2008) ถึงแม้ว่าในช่วงที่ผ่านมาเกือบ 2 ทศวรรษ จะมีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่ง ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับระบบฮอร์โมนเพศเมียของกระบือที่สอดคล้องกับวงจรการเป็นสัด (Kanai and Shimizu, 1983; Singh et al., 2000) เพื่อช่วยให้การตรวจจัสต์ได้ง่ายขึ้นและเหมาะสมกับการผสมเทียม รวมทั้งงานวิจัยอื่นๆ อย่างไรก็ตาม การพัฒนางานวิจัยดังกล่าวนี้ ควรทำควบคู่ไปกับการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาและหน้าที่ของอวัยวะสืบพันธุ์กระบือ เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยและกระบวนการที่สำคัญที่เกิดขึ้นภายในทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ตั้งแต่ตัวอสุจิเคลื่อนที่เข้าไปจนถึงปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยความรู้ดังกล่าวข้างต้นเกี่ยวกับกระบือปลักของไทยยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น การที่จะทำให้กระบือไทยมีปริมาณที่มากขึ้น นอกจากความรู้ทางด้าน การปรับปรุงพันธุ์ที่ดีแล้ว ยังต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิชาการ นักวิจัย หรือผู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ รวมทั้งเทคโนโลยีทางชีวภาพในการผลิตกระบือ ได้ใช้เป็นข้อมูลหลักโดยไม่ต้องอ้างอิงข้อมูลของโคซึ่งบางครั้งอาจมีความแตกต่างกัน

ความสำเร็จในการปฏิสนธิของสัตว์ปศุสัตว์ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการด้วยกัน เช่น เวลาที่เหมาะสมในการผสม ทั้งการผสมตามธรรมชาติด้วยพ่อพันธุ์ (natural insemination) และการผสมเทียม (artificial insemination, AI) เป็นต้น การผสมเทียมนี้ยังคงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับการผลิตสัตว์ปศุสัตว์

ซึ่งรวมถึงกระเบื้องด้วย (Perera, 2008) การผสมเทียมต้องอาศัยการกำหนดหรือการทำนายเวลาที่เหมาะสม สำหรับการตกไข่ และการใช้น้ำเชื้อที่มีปริมาณมากเพียงพอและมีคุณภาพที่เหมาะสม ซึ่งทั้งสองประการนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งการผสมเทียมในฟาร์มสุกรหรือโค ถือได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมที่มีการพัฒนาอย่างมาก โดยเป้าหมายที่สำคัญคือ การเก็บรักษาเซลล์อสุจิให้อยู่ในสภาพที่มีชีวิตอยู่รอด และมีประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ได้เป็นอย่างดี ในสารที่มีสภาพเหมาะสมสำหรับการการแช่เย็นหรือแช่แข็ง ซึ่งมีความจำเป็นมากในกรณีที่สัตว์เพศเมียอยู่ห่างไกลจากศูนย์ผสมเทียม และช่วยในการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ไว้ได้อีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้น สารหรือปัจจัยที่ช่วยเก็บรักษาคุณภาพ จำเป็นต้องมีการพัฒนาปรับปรุงให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด ในกระเบื้อง การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อยังมีอยู่น้อยมาก และมีความจำเป็นที่ต้องใช้วิธีการที่ใช้โคเป็นหลัก (Sansone et al., 2000) ซึ่งข้อมูลในการพัฒนานี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อ และส่วนประกอบต่างๆ ของสารคัดหลั่งที่ปรากฏในท่อนำไข่ของกระเบื้องในระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด โดยเฉพาะในส่วนของท่อนำไข่ที่ทำหน้าที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) ซึ่งบริเวณดังกล่าวพบที่บริเวณรอยต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก (uterotubal junction, UTJ) และส่วนท้ายของอิสรัมัส (caudal isthmus) (Suarez, 1998) ก่อนที่นำข้อมูลที่ได้มาใช้ต่อยอดในขั้นตอนต่อไป โดยบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจินั้นมีหน้าที่ในการเก็บรักษาความสามารถและประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิ และมีบทบาทในการควบคุมกลไกการคาปาซิเตชันให้เกิดขึ้นพร้อมๆ กันกับการตกไข่ รวมทั้งการปลดปล่อยเซลล์อสุจิดังกล่าวเคลื่อนที่ขึ้นไปเพื่อปฏิสนธิในส่วน AIU ของท่อนำไข่ (Suarez, 2002) โดยกลไกต่างๆ เหล่านี้ที่เกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับเซลล์เยื่อ และสารต่างๆ ที่คัดหลั่งมาจากเซลล์เยื่อท่อนำไข่นั้นเอง ซึ่งสัมพันธ์กับการทำงานของฮอร์โมนจากรังไข่ตามวงรอบการเป็นสัด (Hunter et al., 1999) นอกจากการผสมเทียม การพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์กระเบื้องได้มีพัฒนากันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การผลิตตัวอ่อนในห้องทดลอง การย้ายฝากตัวอ่อนหรือแม้กระทั่งการโคลนนิ่ง (cloning) กระเบื้องจากเซลล์ใบหู (Gasparrini, 2002) พบว่า ขั้นตอนต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวนี้ ได้มีการนำเยื่อของท่อนำไข่และสารคัดหลั่งที่ผลิตภายหลังที่ผลิตมาใช้ เช่น การเตรียมเซลล์อสุจิหลังการแช่แข็งให้พร้อมสำหรับการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ (Kumaresan et al., 2006) และการเตรียมโอโอไซต์ และให้ตัวอ่อนในระยะแรกที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการให้มีความสมบูรณ์พร้อม (Nandi et al., 2003) สำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน รวมทั้งการโคลนนิ่ง (Kitiyant et al., 2001) ดังนั้น ความรู้ขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการทำหน้าที่อย่างจำเพาะของเซลล์เยื่อ และส่วนประกอบของสารคัดหลั่งที่ผลิตภายในท่อนำไข่ รวมทั้งการทำหน้าที่พิเศษของท่อนำไข่กระเบื้องในการกักเก็บตัวอสุจิให้มีชีวิตอยู่รอด และมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นในการเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิสัมพันธ์กับวงรอบการเป็นสัดของกระเบื้องปลักไทย ซึ่งเป็นเรื่องที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัย

มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากได้มีการศึกษาสารและปัจจัยต่างๆ จำนวนมากที่มีผลต่อการคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิ (sperm capacitation) ในห้องปฏิบัติการ ช่วงเวลากว่า 20 ปีที่ผ่านมา Parrish และคณะ (1988) พบว่า เฮพาริน (heparin) มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิได้อย่างชัดเจน จึงได้มีการนำเฮพารินมาใช้กันอย่างกว้างขวางในกระบวนการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization, IVF) ของโค ต่อมา ได้มีรายงานการใช้สารในกลุ่มซัลเฟตไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ (sulphated glycosaminoglycans, S-GAGs) ในการกระตุ้นการเกิดคาปาซิเตชันในรูปแบบที่แตกต่างกัน (Parrish et al., 1989) และมีรายงานพบการปรากฏของสารในกลุ่มไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ ในท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียในสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งโนโค (Lee and Ax, 1984; Lee et al., 1986; Varner et al., 1991; Tienthai et al., 2000) โดยทั่วไป ไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ประกอบด้วย 2 กลุ่มหลักคือ กลุ่มที่ไม่มีซัลเฟต และกลุ่มที่มีซัลเฟต โดยกลุ่มที่ไม่มีซัลเฟตนี้มีเพียงกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) หรือไฮยาลูโรแนน (hyaluronan)

เท่านั้นที่อยู่ในกลุ่มนี้ (Hileman et al., 1998) ซึ่งมีการศึกษาวิจัยในสุกรพบว่า ไฮยาโลรอนแนปรากพบอยู่ในท่อหน้าไขของสุกรโดยเฉพาะส่วน UTJ และส่วนท้ายของอวัยวะสืบพันธุ์โดยเฉพาะในระยะก่อนการตกไข่ (Tienthai et al., 2000) และมีส่วนช่วยในการรักษาการมีชีวิตรอดและรักษาสภาพของเซลล์อสุจิให้พร้อมก่อนการเกิดคาปาซิเตชัน ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญของกลไกในการสร้างที่กักเก็บเซลล์อสุจิ ก่อนที่เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (Tienthai et al., 2004) ขณะที่สารในกลุ่มซัลเฟตไกลโคสะอะมิโนไกลแคนส์ประกอบด้วย 1) เฮพารันซัลเฟต (heparan sulphates) ซึ่งรวมถึงเฮพาริน 2) คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulphates) และ 3) เคอราตานซัลเฟต (keratan sulphates) (Cao et al., 1997) โดยปกติ สารในกลุ่มดังกล่าวนี้จะมีการเชื่อมต่อกับโปรตีนเกิดเป็นโปรตีโอไกลแคนส์ (proteoglycans) (Kjellen and Lindahl, 1991) ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิดการคาปาซิเตชันในเซลล์อสุจิของโคเซ็นกัน (Bergqvist et al., 2006) ดังนั้น การศึกษาการปรากฏของไกลโคสะอะมิโนไกลแคนส์ในกระปือปลักไทย จะทำให้ทราบถึงบทบาทของสารดังกล่าวที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกในการสร้างที่กักเก็บเซลล์อสุจิได้เป็นอย่างดี

นอกจากไกลโคสะอะมิโนไกลแคนส์ ซึ่งจะเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งในกระบวนการสร้างที่กักเก็บเซลล์อสุจิในโคแล้ว ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการสร้างนี้คือ กลไกในการปกป้องเซลล์อสุจิจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Bergqvist et al., 2005) เป็นที่ทราบกันดีว่า ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ จากภายนอกไม่ให้เข้าไปถึงช่องว่างภายในของระบบสืบพันธุ์ ทั้งที่เป็นเช่นนี้แต่พบว่า ตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิตสามารถเดินทางผ่านมาฝังตัวยังบริเวณมดลูกได้ และที่สำคัญที่สุดคือเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ซึ่งมีโปรตีนแปลกปลอมปรากฏอยู่ สามารถเดินทางเข้าไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ที่อยู่ภายในท่อหน้าไขได้ โดยทั่วไป การเดินทางเพื่อไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ของเซลล์อสุจิจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ โดยช่วงแรก เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่ได้จะต้องได้รับการบีบตัวของ myometrium ในปีกมดลูก เพื่อให้เซลล์อสุจิสามารถเดินทางไปยังบริเวณที่มีการปฏิสนธิ เป็นช่วงที่เรียกว่า “rapid phase” จากนั้นเมื่อเซลล์อสุจิเดินทางเข้าสู่ UTJ ก็จะเข้าสู่ช่วงที่ 2 ซึ่งมีกลไกในการกักเก็บเซลล์อสุจิเกิดขึ้นเพื่อรักษาการมีชีวิตอยู่รอด และควบคุมปริมาณเซลล์อสุจิให้มีปริมาณที่เหมาะสมก่อนที่เซลล์อสุจิจะเดินทางไปยัง AIJ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปฏิสนธิและเป็นช่วงสุดท้ายในการเดินทางของเซลล์อสุจิ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) กระบวนการทั้งหมดนี้จะเกิดขึ้นได้เฉพาะในกรณีที่เซลล์อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ท่ามกลางระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ในท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียเท่านั้น จึงได้มีการตั้งสมมติฐานขึ้นมาว่า ในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมียอาจจะมีการกักเก็บอย่างควบคุมการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ซึ่งมีหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ตัวอย่างเช่น ระบบการป้องกันตนเองระดับเซลล์ในการหลั่งสาร Th-2 type immune response ที่มีผลต่อกระบวนการป้องกันการทำลายเซลล์อสุจิและตัวอ่อน (Hunt et al., 1997; Kauma et al., 1999) จึงเป็นไปได้ว่า ภายในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย อาจมีกลไกบางอย่างที่ช่วยให้เซลล์ดังกล่าวนี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และทำให้บางบริเวณของอวัยวะนี้มีคุณสมบัติที่เรียกว่า “immune privileged organ” เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นใน ดวงตา (Stuart et al., 1997) รวมทั้งในรังไข่และอวัยวะ (Green and Ferguson, 2001) เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการค้นพบกลไกการทำงานของระบบ Fas-Fas Ligand (Fas-FasL system) ซึ่งนำมาใช้อธิบายการทำงานของ immune privileged organ ได้เป็นอย่างดี (Bergqvist et al., 2005) ระบบดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับ Fas ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ type I membrane protein และเป็นส่วนประกอบของ tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งเป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะเจาะจงกับ Fas Ligand (FasL) เมื่อ FasL เข้ามาจับกับ Fas ซึ่งเป็นตัวรับที่เยื่อหุ้มของเซลล์นั้นๆ (Nagata et al., 1997) จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ของเซลล์ขึ้นมา (Quirk et al., 1998) ดังนั้น ถ้า FasL สามารถเข้าไปจับกับ Fas ที่อยู่บนบริเวณเยื่อหุ้มของเซลล์เม็ดเลือดขาว จะทำให้เกิดรูปแบบการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ จึงทำให้ FasL เป็นกลไกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของ T cells ภายใน

ร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่พบตามวัยต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้น บทบาทของระบบ Fas-FasL ที่สำคัญคือ ช่วยการทำงานในกระบวนการตายของ T lymphocytes ในขณะที่ยอมให้เซลล์แปลกปลอมอื่นเข้ามา (Ferguson et al., 2002) การทำงานของระบบ Fas-FasL ในการเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการเสื่อมตายของเซลล์ที่พบภายในรังไข่จะทำให้เกิดการฝ่อ (atresia) ของโอโอไซต์ (Hu et al., 2001) ขณะที่ระบบ Fas-FasL ที่พบในอวัยวะของเพศผู้จะทำให้เกิดการฝ่อของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะ spermatogonia (Francavilla et al., 2000) เป็นต้น ในท่อนำไข่ของโค ระบบการทำงานของ Fas-FasL มีส่วนเกี่ยวข้องในการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิและตัวอ่อนระยะแรก (Bergqvist et al., 2005) ซึ่งการทำงานของระบบ Fas-FasL อาจมีประสิทธิภาพในการกำจัด T-lymphocytes และ NK cells ในระบบภูมิคุ้มกันภายในท่อนำไข่ ดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน ภาวะบิวต์ในประทศไทยมีจำนวนลดลงอย่างมาก ถึงแม้ว่าจะมีการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีซึ่งสามารถผลิตตัวอสุจิที่สมบูรณ์และนำการผสมเทียมมาช่วยในการแก้ปัญหา แต่ว่าผลของการผสมเทียมภาวะบิวต์ในประทศไทยยังคงมีอัตราการผสมติดที่ไม่สูงเท่าที่ควร โดยปัญหาส่วนหนึ่ง อาจเกิดขึ้นจากความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย สิ่งที่สำคัญคือความรู้ขั้นพื้นฐานของระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย รวมถึงความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของหน้าที่การทำงานในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งสัมพันธ์กับวงจรรอบของการเป็นสัดในกระบือนั้น มีรายงานการวิจัยที่เกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้น ผลจากการศึกษาการปรากฏของไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์และการทำงานของระบบ Fas-FasL ในครั้งนี้ จะช่วยเสริมความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับการทำงานภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของภาวะบิวต์ไทย โดยเฉพาะกลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ และนำไปศึกษาประยุกต์ เพื่อช่วยกระตุ้นให้เกิดการปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคโนโลยีการระบบสืบพันธุ์ของภาวะบิวต์ไทยต่อไปในอนาคต

## วัตถุประสงค์โครงการ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาการปรากฏของไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์ ทั้งกลุ่มที่มีซัลเฟต (ซินติแคนส์) และกลุ่มที่ไม่มีซัลเฟต (ไฮยาลูโรแนน) ภายในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของภาวะบิวต์ไทยในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง
2. เพื่อศึกษาการปรากฏของตัวรับของไฮยาลูโรแนน (CD44) ในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของภาวะบิวต์ไทยในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง
3. ศึกษาการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL รวมทั้ง FasL mRNA ในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของภาวะบิวต์ไทย โดยเฉพาะในท่อนำไข่บริเวณที่ทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง
4. นำข้อมูลที่ศึกษาได้ทั้งหมด มาใช้เป็นข้อมูลขั้นพื้นฐานทางด้านชีววิทยาและสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ภาวะบิวต์เพศเมีย รวมทั้งนำมาใช้ประกอบในการเรียนการสอน การทำงานวิจัยทางด้านพยาธิวิทยาและเทคโนโลยีในการสืบพันธุ์ต่อไป

## บทที่ 2

### ทบทวนผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

“การปฏิสนธิ” เป็นจุดเริ่มต้นของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด แต่กระบวนการและกลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในการปฏิสนธินั้นยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแน่นอน แม้ว่าจะมีตำราและงานวิจัยต่างๆ ที่ศึกษากันอย่างมากมายก็ตาม อย่างไรก็ตาม วัฏจักรที่สำคัญที่สุดคือการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพศเมีย และขั้นตอนที่เกิดขึ้นตามลำดับของการปฏิสนธิ ลำดับขั้นตอนดังกล่าวนี้รวมถึงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ การเจริญสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ โดยขั้นตอนเหล่านี้ต้องรับรองว่าเซลล์สืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย จะประสบความสำเร็จในการปฏิสนธิในตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้นภายหลังจากการผสมพันธุ์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ การปฏิสนธิเกิดขึ้นภายใน “ท่อนำไข่” (oviduct, uterine tube, Fallopian tube) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จะเกิดขึ้นบริเวณรอยต่อของท่อนำไข่ส่วนอิชมิคัสและแอมพูลลาซึ่งเรียกว่า “ampullary-isthmic junction” (AIJ) ท่อนำไข่ของโคและกระบือเป็นอวัยวะที่ค่อนข้างเรียบง่าย ประกอบด้วยชั้นต่างๆ 3 ชั้นคือ ชั้นนอกสุดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียกว่า mesosalpinx ชั้นกลางเป็นกล้ามเนื้อเรียบเรียกว่า myosalpinx และชั้นในสุดที่ติดกับช่องว่างภายในที่เรียกว่า endosalpinx ซึ่งชั้นนี้ประกอบด้วยเยื่อของท่อนำไข่ และชั้นใต้เยื่อเรียกว่า lamina propria (Yaniz et al., 2000) จากการศึกษาที่ผ่านมาเร็วๆ นี้ พบว่า เยื่อผิวท่อนำไข่ของกระบือไทยมีลักษณะเป็น simple columnar epithelium โดยส่วนใหญ่และประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ เซลล์ที่มีซีเลีย (ciliated cells) และเซลล์คัดหลั่ง (secretory cells) (Tienthai et al., 2008) เช่นเดียวกับที่พบในสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น เป็นที่ทราบว่า ท่อนำไข่มีบทบาทสำคัญหลายประการก่อนที่จะมีการปฏิสนธิเกิดขึ้น คือ การขนส่งโอโอไซต์ภายหลังการตกไข่ โดยลำเลียงผ่านอินฟินิตูบลัมและแอมพูลลา จนกระทั่งถึงส่วน AIJ เพื่อปฏิสนธิ นอกจากนี้ ท่อนำไข่ยังมีบทบาทในการขนส่ง กักเก็บ และกระบวนการคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิ ซึ่งกลไกดังกล่าวเกิดขึ้นเพื่อช่วยรักษาความสามารถในการเคลื่อนที่ การมีชีวิตรอด และประสิทธิภาพในการเข้าปฏิสนธิของเซลล์อสุจิ (Pollard et al., 1991; Lefebvre et al., 1995) ดังนั้น ท่อนำไข่จึงทำหน้าที่หลักในการจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิ รวมทั้งสำหรับการเจริญของตัวอ่อนในระยะแรกซึ่งยังคงอยู่ในช่องว่างของท่อนำไข่เป็นเวลา 3-4 วัน ก่อนที่ตัวอ่อนจะเข้าไปฝังตัวในปีกมดลูกเพื่อเจริญเติบโตต่อไป มีรายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างของเยื่อ รวมทั้งส่วนประกอบอื่นๆ ของท่อนำไข่ส่วนต่างๆ อยู่มากมายในสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดต่างๆ เช่น แกะ (Murray, 1997) แพะ (Abe et al., 1999) และโค (Abe and Oikawa, 1993) ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับงานวิจัยขั้นสูงอื่นๆ อีกมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งและการกระจายตัวของตัวอสุจิภายในท่อนำไข่ (Flechon and Hunter, 1981; Lefebvre et al., 1995) รวมทั้งการเจริญพัฒนาของโอโอไซต์จากของเหลวหรือเซลล์ที่ได้จากท่อนำไข่ (Schmidt et al., 1997) และการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายทั้งในมนุษย์ (Goldberg et al., 1991) และสัตว์ต่างๆ (Kim et al., 1996; Bureau et al., 2000) ถึงแม้ว่าความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตสัตว์ต่างๆ รวมทั้งกระบือปลัก จะมีการพัฒนาอย่างมากจนถึงการฝากยัยตัวอ่อน (Techakumphu et al., 2001) และการโคลนนิ่ง (Kitiyant et al., 2001) แต่กระบวนการดังกล่าวนี้ มีความจำเป็นต้องใช้สารหรือน้ำยาที่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และเหมาะสมสำหรับ

การใช้เตรียมเซลล์อสุจิให้มีความสมบูรณ์พร้อมในกระบวนการปฏิสนธิอกร่างกายและการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งต้องใช้ความรู้พื้นฐานที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติระหว่างเซลล์สืบพันธุ์และอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

ในระหว่างการผสมพันธุ์ เมื่อพ่อพันธุ์มีการหลั่งน้ำเชื้อแล้ว พบว่า เซลล์อสุจิจะมีช่วงชีวิตอยู่อย่างจำกัด แนนอนว่า เซลล์อสุจินั้นมีหน้าที่หลักในการนำโครโมโซมจากพ่อพันธุ์ที่ติดายทอดไปยังลูกหลานที่จะเกิดขึ้นหลังจากที่การปฏิสนธิประสบความสำเร็จ มีรายงานการวิจัยพบว่า เซลล์อสุจิของโคจะต้องเข้าปฏิสนธิภายใน 12 ชั่วโมงหลังการตกไข่ (Brackett et al., 1980) กลไกที่เกิดขึ้นหลังจากการหลั่งน้ำเชื้อของสัตว์ที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นคือ เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วผ่านช่องคลอดและมดลูก เพื่อเข้าไปในโครงสร้างแรกๆ ที่พบกับท่อไข่คือ ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อไข่ (utero-tubal junction) หรือ UTJ ซึ่งจะครอบคลุมไปถึงส่วนท้ายๆ ของอวัยวะสืบด้วย บริเวณดังกล่าวนี้จะทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิหรือ sperm reservoir โดยบริเวณ UTJ ทำหน้าที่ควบคุมจำนวนของเซลล์อสุจิที่จะเข้าไปสู่ท่อไข่ การศึกษาในโค พบว่า มีจำนวนของเซลล์อสุจิประมาณ 100 เซลล์เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปสู่ท่อไข่ได้ (Larsson and Larsson, 1985) กลไกในการจำกัดจำนวนเซลล์อสุจินี้ เป็นการป้องกันการเข้าปฏิสนธิของเซลล์อสุจิหลายเซลล์ต่อหนึ่งโอโอไซต์ (polyspermic fertilization หรือ polyspermia) ขณะที่กลไกดังกล่าวนี้สามารถรักษาโอกาสในการเข้าปฏิสนธิของเซลล์อสุจิได้ตามปกติ (Hunter and Leglise, 1971) และที่สำคัญการเกิด polyspermia นำไปสู่ความล้มเหลวในกระบวนการปฏิสนธิของสัตว์ ดังนั้น ในขณะที่เซลล์อสุจิจำนวนหนึ่งที่จะผ่านเข้าไปสู่ท่อไข่ จะต้องผ่านโครงสร้างที่เป็นช่องแคบที่เต็มไปด้วยเมือกชั้นเหนียวตามที่มีการวิจัยในกระต่าย (Jansen, 1978) สุกร (Johansson et al., 2000) และโค (Suarez et al., 1997) ช่องว่างที่มีลักษณะแคบดังกล่าวนี้ จะแคบลงมากขึ้นเนื่องจากภาวะการบวมน้ำที่เกิดขึ้นในชั้น lamina propria ซึ่งมีสาเหตุมาจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สูงขึ้นในระยะเอสตรัส (Hunter et al., 1991) โครงสร้างที่เป็นช่องแคบและความเหนียวชั้นของเมือกที่อยู่ภายในบริเวณดังกล่าวนี้ทำให้เซลล์อสุจิที่ผ่านเข้ามาเคลื่อนที่ช้าลง ทั้งยังเพิ่มโอกาสให้บริเวณส่วนหัวของเซลล์อสุจิได้เข้าไปสัมผัสหรือเข้าจับกับพื้นผิวของเซลล์เยื่ออุทอไข่ ซึ่งการเข้าจับนั้นอาจเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ มากมาย ขั้นตอนเหล่านี้ทำให้เซลล์อสุจิได้พักชั่วคราวหนึ่งและเป็นกลไกเบื้องต้นในการสร้างบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) (Suarez, 1998; Suarez, 2002) มีรายงานการวิจัยได้มีการศึกษาการเข้าจับของเซลล์อสุจิกับเซลล์เยื่ออุทอไข่ในสัตว์หลายชนิด ระบุว่าปัจจัยดังกล่าวเกิดจากการจดจำของสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Suarez, 2001) และการสนับสนุนของสารประเภทไกลโคสโอะมิโนไกลแคนส์ (GAGs) (Johansson et al., 2000; Tienthai et al., 2000)

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่า หน้าที่หลักของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิเกี่ยวข้องกับการรักษาความสามารถและประสิทธิภาพในการเข้าปฏิสนธิของเซลล์อสุจิ ซึ่งจะเกี่ยวกับกลไกการเกิดคาปาซิเตชัน โดยให้กลไกดังกล่าวนี้เกิดขึ้นเป็นจังหวะสอดคล้องกับช่วงเวลาของการตกไข่ และควบคุมการปลดปล่อยเซลล์อสุจิเข้าสู่ท่อไข่ส่วน AIJ เพื่อการปฏิสนธิต่อไป (Suarez, 2002) พบว่า เซลล์อสุจิกลุ่มดังกล่าวจะเคลื่อนที่ออกจากบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิพร้อมๆ กับการตกไข่ ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องการสัญญาณในการปลดปล่อยเซลล์อสุจิเหล่านี้ ให้หลุดออกจากผิวของเซลล์เยื่ออุทอไข่ยังไม่มีรายงานอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า follicular fluid ที่เข้ามาภายในท่อไข่หลังการตกไข่อาจมีบทบาทต่อกลไกนี้ และอิทธิพลของฮอร์โมนที่

สัมพันธ์กับการทำงานของรังไข่ ซึ่งมีผลกระทบต่อท่อนำไข่ส่วนอิสรมีส อาจช่วยปรับเปลี่ยนสารประกอบของของเหลวภายในท่อนำไข่ และช่วยกระตุ้นการปลดปล่อยเซลล์อสุจิเช่นกัน (Hunter et al., 1999) ทั้งยังมีรายงานว่า ในระหว่างที่เกิดการปลดปล่อยเซลล์อสุจิจากเยื่อเมือก มีส่วนสัมพันธ์กับกลไกการเกิดคาปาซิเตชันภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (Lefebvre and Suarez, 1996) โดยส่วนประกอบของของเหลวที่คัดหลั่งภายในท่อนำไข่ที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ซัลเฟตไกลโคซอมีโนไกลแคนส์ (sulphated glycosaminoglycans, S-GAGs) มีบทบาทในการช่วยปลดปล่อยเซลล์อสุจิออกจากบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (Talevi and Gualtieri, 2001) ด้วยเหตุนี้ เหตุการณ์หรือกลไกบางอย่างที่ทำให้ส่วนประกอบบางชนิดของของเหลวภายในท่อนำไข่เปลี่ยนแปลง อาจจะมีส่วนร่วมในกระบวนการสร้างบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิซึ่งรวมถึงการจับและปลดปล่อยเซลล์อสุจิจากพื้นผิวของเซลล์เยื่อเมือกท่อนำไข่ ดังนั้น บทบาทที่แท้จริงของท่อนำไข่ต่อหน้าที่ของเซลล์อสุจิกระเบื้องปลัก จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาบทบาท หน้าที่ และกลไกการทำงานเบื้องต้นของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิในกระเบื้องปลักเพศเมียเป็นอันดับแรก

การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับการเกิดกระบวนการคาปาซิเตชันซึ่งสัมพันธ์กับกลไกของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิมีอยู่จำนวนมาก นักวิจัยบางกลุ่มระบุว่า กระบวนการเกิดคาปาซิเตชันเกิดขึ้นภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ (Grippio et al., 1995; Lefebvre and Suarez, 1996; Fazeli et al., 1999) ในทางตรงกันข้าม นักวิจัยบางกลุ่มระบุว่า บริเวณ sperm reservoir โดยเฉพาะในระยะก่อนการตกไข่ (pre-ovulation) มีส่วนในการป้องกันการเกิดคาปาซิเตชัน และกระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการปลดปล่อยเซลล์อสุจิ และเคลื่อนที่ขึ้นไปตำแหน่งที่มีการปฏิสนธิ (Smith, 1998; Tienthai et al., 2004) ความแตกต่างนี้อาจเป็นเพราะว่า บริเวณที่เกิดกระบวนการคาปาซิเตชันในสัตว์ชนิดที่มีชีวิตเป็นสิ่งที่ยากจะศึกษา และอาจต้องใช้เทคนิคหรือวิธีในการ ศึกษาที่ซับซ้อน ดังนั้น การศึกษาเบื้องต้นควรมุ่งประเด็นในเรื่องของสารประกอบต่างๆ ที่เซลล์เยื่อเมือกท่อนำไข่ผลิตขึ้นมา ซึ่งสารประกอบดังกล่าวต้องมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นตลอดวงจรการเป็นสัด โดยเฉพาะสารที่น่าสนใจนี้ต้องมีการปรากฏอย่างเด่นชัดในช่วงก่อนการตกไข่ ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมาหลายทศวรรษ ได้มีการศึกษาสารประกอบต่างๆ มากมายที่มีผลในการเหนี่ยวนำการเกิดคาปาซิเตชันในห้องปฏิบัติการ Parrish และคณะ (1988) รายงานว่า “เฮพาริน” มีบทบาททวนในการเหนี่ยวนำการเกิดคาปาซิเตชันในเซลล์อสุจิของโคได้อย่างชัดเจน จากนั้นเป็นต้นมา จึงได้นำเฮพารินมาใช้อย่างแพร่หลายในการเตรียมเซลล์อสุจิเพื่อการปฏิสนธินอกร่างกาย ช่วงเวลาต่อมา ได้มีรายงานเพิ่มเติมว่า ซัลเฟตไกลโคคอนจูเกตส์ และซัลเฟตไกลโคซอมีโนไกลแคนส์ มีผลเหนี่ยวนำการเกิดคาปาซิเตชันเช่นเดียวกับเฮพารินในระดับที่แตกต่างกันไป (Parrish et al., 1989) การศึกษาการปรากฏของไกลโคซอมีโนไกลแคนส์ได้มีรายงานการพบในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งในโค (Lee et al., 1986; Varner et al., 1991; Tienthai et al., 2000) รวมทั้งได้มีรายงานพบว่าของเหลวได้เก็บได้จากท่อนำไข่มี ไกลโคซอมีโนไกลแคนส์เป็นส่วนประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก (Kawakami et al., 2000; Tienthai et al., 2000) ไกลโคซอมีโนไกลแคนส์ มีโครงสร้างเป็น amino-polysaccharide ที่เป็นโซ่ยาว ไม่มีแขนง ประกอบด้วย 2 กลุ่มหลัก คือกลุ่มที่ไม่มีซัลเฟตและกลุ่มที่มีซัลเฟต โดยกลุ่มที่ไม่มีซัลเฟตจะมีเพียงไฮยาลูโรแนนหรือที่เรียกรวดไฮยาลูโรนิก (hyaluronan, hyaluronic acid) เท่านั้น ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ (Hileman et al., 1998) แต่กลุ่มที่มีซัลเฟต (S-GAGs) จะประกอบไปด้วย 1) เฮพารินซัลเฟต (heparan sulphates) ซึ่งกลุ่มนี้รวมถึงเฮพาริน 2) คอนดรอ

ยตินซัลเฟต (chondroitin sulphates) และ 3) เคอราตทานซัลเฟต (keratin sulphates) (Cao et al., 1997) โดยทั่วไปแล้ว S-GAGs จะเชื่อมต่อกับโปรตีน เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างเป็นโปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) (Kjellen and Lindahl, 1991) กลุ่มหนึ่งของโปรตีโอไกลแคนที่มีเฮพารินซัลเฟตเป็นส่วนประกอบอยู่คือ ซินดีแคนส์ (syndecans) (Gallagher et al., 1986) นอกจากนี้ จากคุณสมบัติเฉพาะตัวของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ซึ่งเป็น hydrophobic อย่างสูงและมีขั้วเป็นลบซึ่งจะดึงดูด cations ทำให้เกิดสภาวะออสโมติกสูงชันและเปลี่ยนเป็นสารที่มีความข้นเหนียวมากขึ้น ซึ่งสารที่มีคุณบัตินี้ก็คือ ไฮยาลูโรแนน ที่มีความสามารถในการปรับสภาพเป็นวุ้นเหนียวได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำ (Toole, 2004) โดยไฮยาลูโรแนนพบได้ทั่วร่างกาย และมีรายงานว่าเซลล์ควมูลัสที่อยู่รอบๆ โอลิโกไซต์สามารถสร้างไฮยาลูโรแนนได้เป็นอย่างดี (Ball et al., 1982) ในการเตรียมสารสำหรับเพาะเลี้ยงตัวของหนู สุนัข และโค เพื่อให้เจริญสมบูรณ์เต็มที่ ถ้ามีการเติมไฮยาลูโรแนนเพิ่มลงไปจะทำให้สารสำหรับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Furnus et al., 1998; Gardner et al., 1999; Miyoshi et al., 1999) มีรายงานการวิจัยตรวจพบไฮยาลูโรแนนในเมือกชั้นจากคอมดลูก และของเหลวในท่อหน้าไขของสุกรและโค (Lee and Ax, 1984; Tienthai et al., 2000) ในขณะที่ S-GAGs ได้มีการตรวจพบในเมือกชั้นจากคอมดลูกในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าที่พบในมดลูกและท่อหน้าไขของโค ตรงกันข้ามกับไฮยาลูโรแนนซึ่งตรวจพบภายในท่อหน้าไขในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับมดลูกและคอมดลูกในช่วงเป็นสัตว์ (Lee and Ax, 1984) นอกจากนี้ การศึกษาในห้องปฏิบัติการมีรายงานว่าไฮยาลูโรแนนในความเข้มข้นที่เหมาะสม ช่วยทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์ของโคมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Huszar et al., 1990) และควบคุมการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์สุจิในกระบวนการคาปาซิเตชัน (Rodriguez-Martinez, 1997; Tienthai et al., 2004) การปฏิสัมพันธ์ของไฮยาลูโรแนนกับผิวของเซลล์จะเกิดขึ้นผ่านทางโปรตีนตัวรับซึ่งเรียกโดยรวมว่า hyaluronan-binding proteins (HABPs) เช่น ตัวรับ CD44 ซึ่งเป็นตัวรับของไฮยาลูโรแนนที่พบโดยทั่วไป (Ponta et al., 1998) CD44 มีความสามารถในการเข้าจับกับไฮยาลูโรแนนและตรวจพบได้ที่เซลล์เยื่อบุเป็นส่วนใหญ่ (Alho and Underhill, 1989) ซึ่งรวมถึงเซลล์เยื่อบุของท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียของมนุษย์และสุกร (Behzad et al., 1994; Tienthai et al., 2003) การปรากฏของ CD44 ยังพบได้ที่โอลิโกไซต์และตัวอ่อนระยะแรกของโค (Furnus et al., 2003) และเซลล์ควมูลัสของสุกร (Yokoo et al., 2002) CD44 มีส่วนร่วมในหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์อย่างกว้างขวาง เช่น การส่งสัญญาณของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเซลล์หรือระหว่างเซลล์กับสารที่อยู่รอบๆ เซลล์ การเคลื่อนย้ายของเซลล์และการเปลี่ยนลักษณะรูปร่างของเซลล์ รวมทั้ง กลไกในการเพิ่มขึ้นและการลดลงของไฮยาลูโรแนน (Underhill, 1992) สำหรับการลดลงของไฮยาลูโรแนนนั้น พบว่าไฮยาลูโรแนนต้องเข้าจับกับ CD44 ซึ่งทำให้เกิดการ endocytosis ของไฮยาลูโรแนน ส่งผลให้มีการย่อยสลายไฮยาลูโรแนนโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) เพื่อนำไฮยาลูโรแนนกลับเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ใหม่ (Culty et al., 1990) การศึกษาวิจัยเท่าที่ผ่านมาในสัตว์ปศุสัตว์นั้น พบว่าได้มีการศึกษาการปรากฏของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ในสุกรและโคเป็นส่วนใหญ่ ยังไม่มีรายงานการวิจัยใดเลยเกี่ยวกับสารดังกล่าวนี้ในท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียของกระบือในระยะต่างๆ ตลอดจนรอบการเป็นสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท่อหน้าไข ดังนั้น การศึกษาการปรากฏของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ทั้งชนิดที่มีซัลเฟต



และไม่มีซัลเฟตภายในเยื่อหุ้มท่อนำไขของกระบอกปลักซึ่งสัมพันธ์กับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย จึงเป็น ความรู้ขั้นพื้นฐานที่สำคัญนำไปสู่การประยุกต์ใช้ต่อยอดในเทคโนโลยีทางชีวภาพของกระบอกปลักต่อไป

นอกจากสารต่างๆ ภายในท่อนำไข ที่มีประโยชน์และช่วยรักษาการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง เพศผู้และเพศเมีย นักวิจัยยังได้พยายามศึกษาและเชื่อว่ายังมีกลไกอื่นๆ ที่มีส่วนทำให้ท่อนำไขมีความพิเศษ แตกต่างจากท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียส่วนอื่นๆ เช่น ในมดลูก พบว่าเซลล์อสุจิถูกเก็บกักเป็นจำนวนมาก โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (polymorphonuclear leukocytes) ต่างจากท่อนำไขที่ยินยอมให้เซลล์อสุจิมีชีวิตอยู่ใน ช่วงเวลาหนึ่ง (Rodriguez-Martinez et al., 1990) พบว่า seminal plasma ที่อยู่บนเซลล์อสุจิเป็นตัวกระตุ้นที่ เหนียวทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันภายในมดลูกทำงาน และเป็นปัจจัยที่ทำให้เซลล์อสุจิส่วนใหญ่ถูกทำลาย ภายในบริเวณมดลูก (Robertson, 2005) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ท่อนำไขอาจจัดอยู่ในกลุ่มของอวัยวะที่เรียกว่า "immune privileged organ" (Cardenas et al., 1998) เป็นที่ทราบกันดีว่า ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายของ สิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกายเพื่อปกป้องตัวเองไม่ให้ได้รับอันตราย โดยการเหนียวทำให้เกิดการอักเสบขึ้น แต่บางครั้งกลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกของเซลล์ ในระบบภูมิคุ้มกัน จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่รอบๆ ได้ ซึ่งอวัยวะส่วนใหญ่ภายในร่างกายสามารถที่จะทน ต่อการอักเสบที่เกิดขึ้นได้ แต่บางอวัยวะ เช่น ดวงตา และอวัยวะ ไม่สามารถที่จะทนต่อกระบวนการดังกล่าว นี้ (Nagata, 1997; Koji et al., 2001) อวัยวะที่มีความไวต่อการถูกทำลายได้ง่ายเหล่านี้ จึงได้มีกลไก immune privilege ช่วยป้องกันไม่ให้ได้รับผลกระทบจากการอักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย (Green and Ferguson, 2001) immune privilege เป็นกลไกภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่ในการ ปกป้องเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะบริเวณที่มีความไวต่อการถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของตัวเองไม่ให้มี ผลกระทบ โดยกลไกนี้ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสูญเสียคุณสมบัติในการทำงานบางอย่าง เพื่อป้องกัน ไม่ให้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันไปทำอันตรายต่อเซลล์ที่อยู่รอบๆ ทำให้อวัยวะที่มีความไวต่อการถูกทำลาย สามารถมีชีวิตรอดพ้นจากการถูกทำลายได้ (Arck et al., 2008) ในปัจจุบันได้มีการนำเอาคุณสมบัติของ อวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ทางด้านเทคโนโลยีการปลูกถ่าย เนื้อเยื่อ เช่น การปลูกถ่ายกระจกตา ซึ่งพบว่าภายในดวงตาได้มีกลไกที่ใช้ในการควบคุม การแสดงออกของ เซลล์ภูมิคุ้มกันนั้นคือการทำงานของระบบ Fas-FasL (Fas-FasL system) (Stein-Streilien, 2008) พบว่า Fas (CD95) จัดเป็น protein membrane type I อยู่ในกลุ่มของ tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งเป็นโปรตีน ตัวรับที่อยู่บนผิวหน้าของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการเหนียวทำให้เกิดรูปแบบการตายของเซลล์ขึ้น เมื่อจับกับแขนของ FasL (Nagata, 1997) โครงสร้างของ Fas ประกอบไปด้วย cysteine และมีจำนวนของ intracellular death domain ประมาณ 80 หมู่กรดอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนสื่อกลางในการส่งสัญญาณ ให้เกิดรูปแบบการตายของเซลล์ (Oconnell, 2001) เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก FasL โปรตีนจำนวนมากจะมารวมตัวกันที่บริเวณ death domain ใน Fas เพื่อสร้างสัญญาณในการเหนียวให้การตายของเซลล์หรือ death-inducing signaling complex (DISC) ขึ้นมา (Medema et al., 1997) ภายใน DISC นั้น Fas-associated death domain protein (FADD) จะสร้างสะพานเชื่อมระหว่าง Fas ที่ได้รับการกระตุ้นแล้วกับ เอนไซม์ pro-caspase-8 เข้าด้วยกัน FADD จะเป็นตัวกลางในการรวบรวมเอนไซม์ pro-caspase-8 ไปยัง Fas ที่ได้รับการกระตุ้นแล้ว ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ pro-caspase-8 กลายเป็นเอนไซม์ caspase-8 ที่อยู่ในสภาพ

พร้อมทำงานหรือที่เรียกว่า Fas-linked interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-converting enzyme like protease (FLICE) (Chinnaiyan et al., 1995) เอ็นไซม์ caspase ที่เกิดกระบวนการ proteolysis กับโปรตีนที่มีความจำเพาะจะเป็นจุดศูนย์กลางที่นำไปเกิดรูปแบบการตายของเซลล์ (Martin and Green, 1995) กระบวนการทำงานของระบบ Fas-FasL สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการตายของเซลล์ขึ้นมาโดยการจับกันระหว่าง FasL กับ Fas ซึ่งเป็นตัวรับที่อยู่บนผิวของเซลล์นั้นๆ (Nagata, 1997) และเป็นตัวรับที่สามารถพบได้ตามระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น หาก FasL สามารถเข้าไปจับกับ Fas ที่อยู่บนบริเวณผิวหน้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ จะทำให้เกิดรูปแบบการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นได้ จึงทำให้ FasL เป็นกลไกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของ T-cells ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ การพบ FasL ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของหนู โดยมีการแสดงออกที่ spermatogonia นั้นเกี่ยวข้องกับการลดจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในอวัยวะของหนู ขณะที่เกิดกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิในสภาวะปกติ (Lee et al., 1997) จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า กระบวนการเสื่อมตายของเซลล์อสุจิภายในอวัยวะของมนุษย์จะชัดเจนมาก ในช่วงที่มีการสร้างเซลล์อสุจิ ซึ่งกระบวนการนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการ Fas-FasL (Pentikainen et al., 1999; Francavilla et al., 2000) ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย พบรูปแบบการตายของเซลล์เกิดขึ้นที่บริเวณ theca interna ของฟอลลิเคิลภายในรังไข่ ทำให้เกิดการล่าช้าในการฝ่อตัวของฟอลลิเคิล (follicular regression) (Isobe and Yoshimura, 1999) นอกจากนี้ บริเวณ granulosa cell ก็มีรูปแบบการเสื่อมตายของเซลล์เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน พบว่าเป็นผลมาจากกระบวนการทำงานของระบบ Fas-FasL เหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการตายของ granulosa cells นั้นเอง รวมทั้งระบบการสร้างซีสต์ที่บริเวณดังกล่าวทำให้โอเอสโตรเจนที่ยังอ่อนอยู่เกิดการฝ่อตัวเช่นกัน ส่งผลทำให้โอเอสโตรเจนส่วนใหญ่ไม่พัฒนาจนถึงขั้นตอนในการตกไข่ (Hu et al., 2001) นอกจากนี้จะส่งผลดังกล่าวแล้ว ช่วงที่มีการพัฒนาของเซลล์ตัวเมียของโคพบว่า การทำงานของระบบ Fas-FasL และฮอร์โมน FSH มีส่วนเหนี่ยวนำให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ที่เซลล์ตัวเมียด้วย (Rubio Pomar et al., 2004) การทดลองในห้องปฏิบัติการยังพบอีกว่า กระบวนการทำงานของระบบ Fas-FasL ภายในรังไข่ของคน หนู และโค ค่อนข้างมีความไวสูงมากต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายดังกล่าวของเซลล์ (Quirk et al., 1998) ในช่วงที่มีการเจริญของตัวอ่อน การแสดงออกของ FasL มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการช่วยปกป้องตัวอ่อนในระยะพีตัส จากการทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Hunt et al., 1997) นอกจากนี้ บริเวณที่พบการกระจายตัวของ FasL อยู่หนาแน่นคือ decidual cells ของมดลูกในช่วงที่มีการตั้งท้อง และจากการที่ trophoblast มีความสามารถที่จะเหนี่ยวนำ FasL เข้ามาเพื่อทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ขึ้นได้อย่างอิสระ จึงชี้ให้เห็นว่าระบบ Fas-FasL มีบทบาทสำคัญต่อการปกป้องตัวอ่อนจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของแม่สัตว์ (Kauma et al., 1999) มีรายงานการวิจัยที่ผ่านมาไม่นานนี้ศึกษาในท่อนำไข่ของโคระบุว่า กลไกนี้อาจช่วยป้องกันเซลล์อสุจิให้รอดพ้นจากการถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว (Bergqvist et al., 2005) กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่สำคัญอีกกระบวนการหนึ่งซึ่งการทำงานของระบบ Fas-FasL เข้าไปมีบทบาทสำคัญคือ การทำหน้าที่เป็น immune privilege ซึ่งเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในลักษณะที่เซลล์บางเซลล์ได้รับการยกเว้นไม่ถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่แล้ว กระบวนการนี้จะทำหน้าที่จำกัดกระบวนการอักเสบที่จะเกิดขึ้น และยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อความอยู่รอดในการดำรงชีวิตในแต่ละเซลล์ ในบริเวณอวัยวะที่มีความไวต่อการรับสัมผัสรูปแบบต่างๆ เช่น นัยน์ตา และในเนื้อเยื่อของระบบ

สืบพันธุ์บางอวัยวะเป็นตำแหน่งที่ไม่สามารถทนต่อการถูกทำลายเนื้อเยื่อที่เกิดจากการอักเสบจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน อวัยวะเหล่านี้จึงได้มีกระบวนการในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้น หนึ่งในกระบวนการเหล่านี้ก็คือการทำงานของระบบ Fas-FasL (Oconnell, 2001) ยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับระบบ Fas-FasL ในท่อน้ำไขของกระบือ ดังนั้น การศึกษาระบบ Fas-FasL และการศึกษาการปรากฏไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และอาจช่วยสนับสนุนบทบาทหน้าที่ของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิในท่อน้ำไขกระบือไทยได้เป็นอย่างดี และพร้อมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีทางชีวภาพต่อไปในอนาคต

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือปลักไทยเพศเมีย จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยตรวจสอบประวัติของสัตว์ เช่น อายุ การตั้งท้อง หรือการมีลูก (ถ้ามี) จากเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 40 ตัว โดยอวัยวะสืบพันธุ์ของกระบือปลักไทยเพศเมียแต่ละตัวจะแยกเก็บใส่ในถุงพลาสติก ติดเบอร์ แล้วใส่กล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ซึ่งสามารถเก็บรักษาสภาพของอวัยวะให้สดตลอดเวลา จนมาถึงสถานที่ทำการชันสูตรภายใน 30-45 นาที หลังจากนั้นจะแยกรังไข่ (ovaries) ทั้งสองข้างของกระบือปลักไทยเพศเมียแต่ละตัว เพื่อตรวจสอบสภาพโดยทั่วไปและตรวจสอบระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัด โดยแบ่งเป็น 2 ระยะที่สำคัญคือ ระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) จำนวน 20 ตัว และระยะลูเทียลช่วงกลาง (mid-luteal phase) จำนวน 20 ตัว จำแนกตามลักษณะและขนาดของคอร์ปัสลูเทียม รวมทั้งขนาดของถุงฟอลลิเคิลเด่น (dominant follicle) ที่ปรากฏอยู่บนผิวของรังไข่ตามที่ได้มีการศึกษาผ่านมาโดย Ali และคณะ (2003)

ตรวจสอบสภาพทางมหกายวิภาคทั่วไปของท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียที่เก็บมา เมื่อไม่พบความผิดปกติใดๆ จึงตัดเก็บท่อนำไข่ทั้งสองข้าง และแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) อีสทมัส (isthmus) แอมพูลลา (ampulla) และอินฟันดิบูลัม (infundibulum) โดยตัดแต่ละส่วนให้มีความยาวประมาณ 2 ซม. โดยข้างหนึ่งเก็บไว้ใน 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ สำหรับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาทั่วไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยการย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) การตรวจสอบหา GAGs ชนิดต่างๆ รวมทั้ง Fas และ FasL ด้วยวิธีฮิสโตเคมีและวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ส่วนท่อนำไข่อีกข้างหนึ่งจะบรรจุไว้ในหลอดพลาสติกปิดสนิทแล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างในกลุ่มควบคุมบวกสำหรับการวิจัยที่เกี่ยวกับ Fas และ FasL จะใช้ต่อมน้ำเหลืองของกระบือเพื่อเป็นสไลด์ในการตรวจสอบ

##### การศึกษาด้วยวิธีฮิสโตเคมีและอิมมูโนฮิสโตเคมี

เลือกท่อนำไข่ส่วนต่างๆ คือ UTJ อีสทมัส แอมพูลลา และอินฟันดิบูลัม ของกระบือปลักทั้ง 2 ระยะๆ ละ 10 ตัว มาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ตามวิธีมาตรฐานทั่วไป โดยใส่ตัวอย่างท่อนำไข่ทั้ง 4 ส่วน วางลงใน 1 บล็อกพาราฟิน และตัดชิ้นตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร แล้วนำมาวางลงบนสไลด์แก้ว แต่ละสไลด์จะนำมาผ่านกระบวนการดังต่อไปนี้

- นำย้อมด้วยสี H&E เพื่อการตรวจสอบความสมบูรณ์ทางสัณฐานวิทยาทั่วไป
- นำมาผ่านกระบวนการทางฮิสโตเคมี เพื่อตรวจสอบการปรากฏของไฮยาลูโรแนน
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจสอบการปรากฏของซัลเฟตไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ (S-GAGs) ในรูปของเฮพารันซัลเฟตโปรติโอไกลแคนส์ซึ่งประกอบด้วย syndecan-1 และ syndecan-2
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจสอบหาตัวรับของไฮยาลูโรแนน CD44
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาโปรตีน Fas
- นำมาผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาโปรตีน FasL

ใช้กระบวนการฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหาการปรากฏของไฮยาลูโรแนนโดยใช้ biotinylated hyaluronan binding protein (HABP) (Seikagaku Corp., Japan) ที่ความเข้มข้น 1:100 (5 µg/ml) และผ่านเทคนิค avidin biotin complex (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) สำหรับสไลด์ negative control จะใช้ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ incubate ด้วย biotinylated HABP แต่จะใช้ phosphate buffer saline (PBS) buffer แทนที่ หรืออาจนำมา incubate ด้วย *Streptomyces hyaluronidase* (Sigma, St. Louis, MO, USA) ก่อนที่จะมา incubate ด้วย biotinylated HABP

กระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ใช้เทคนิค avidin-biotin-peroxydase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ซึ่งเป็นเทคนิคในการศึกษาการปรากฏของ syndecans, Fas และ FasL ที่อาจปรากฏในท่อไขสันหลังส่วนต่างๆ ของกระบอกปลั๊กไทย โดยชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วจะนำมาวางลงบนสไลด์แก้ว Super-Frost นำมาอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้ primary antibody ที่แตกต่างกันไป

สำหรับการตรวจหา syndecans ซึ่งจะใช้ syndecan-1 (monoclonal mouse anti-human antibody, DL-101, sc-12765, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) ที่ความเข้มข้น 1:100 และ syndecan-2 (monoclonal mouse anti-human antibody, 1F10/b8, sc-73516, Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:100 เป็น primary antibodies สำหรับ control slides จะใช้ normal horse serum ทดแทนการ incubate ด้วย primary antibody

ในการศึกษาการปรากฏของ CD44 จะใช้ monoclonal mouse anti-human CD44 (phagocytic glycoprotein-1, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:50 เป็น primary antibody สำหรับ control slides จะใช้ normal horse serum ทดแทนการ incubate ด้วย primary antibody

ในขณะที่การตรวจหาการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL จะใช้ primary antibody คือ Fas (monoclonal mouse anti-human antibody, B-10, Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:100 ในการตรวจหาการปรากฏของ Fas ขณะที่ Fas Ligand (polyclonal rabbit anti-rat antibody, N-20; Santa Cruz Biotechnology) ที่ความเข้มข้น 1:200 นำมาใช้ในการตรวจหา FasL สำหรับสไลด์ negative controls จะใช้การแทนที่ primary antibodies ด้วย mouse IgM (Serotec, Oxford, UK) สำหรับ Anti-Fas และแทนที่ด้วย mouse IgG (DAKO, Glostrup, Denmark) ขณะที่ ชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากต่อมน้ำเหลืองของโคจะนำมาใช้เป็น positive controls สำหรับ Fas และ FasL

กระบวนการขั้นตอนต่อไปของเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีนี้ คือ การใช้ secondary antibodies ที่จำเพาะและขั้นตอนของ avidin-biotin-peroxydase (Vectastain ABC-Elite, Vector Laboratories) จากนั้น ชิ้นเนื้อที่ได้ทั้งหมดจะผ่านการ incubate ด้วย 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DAKO, Glostrup, Denmark) ใน 3% hydrogen peroxide จากนั้น นำมาด้วยด้วย hematoxylin และปิดทับชิ้นเนื้อด้วย gelatin-glycerin สไลด์ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมด นำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (BX50, Olympus, Tokyo, Japan) ซึ่งมีกล้องดิจิทัลสำหรับการถ่ายภาพติดตั้งพร้อมโปรแกรมการถ่ายภาพ (ImagePro6, Tokyo, Japan)

### **การแสดงออกของ FasL mRNA ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)**

นำท่อน้ำไขกระดูกไทยอีกข้างหนึ่งทั้งระยะฟอลลิคูลาร์ (n=5) และระยะลูทีเยิลช่วงกลาง (n=5) ที่เก็บรักษาไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  แบ่งออกเป็น UTJ อีส์ธัมัส แอมพูลลา อินฟินิติบูลัม ทำการเปิดผ่าตามยาวและขูด (scratch) เซลล์เยื่อบุท่อน้ำไขออกด้วยสันของใบมีดผ่าตัด นำเซลล์เยื่อบุที่ได้จากท่อน้ำไขแต่ละส่วนมาสกัดเพื่อให้ได้ RNA โดยใช้ Rneasy mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) สำหรับการสังเคราะห์ cDNA และ PCR จะใช้ Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) ในส่วนของ primers ที่ใช้ designed สำหรับ bovine FasL (Sigma-Genosoyes Ltd., Pampisford, Cambridgeshire, UK) โดย sense และ anti-sense-specific primers คือ sense 5'-TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CA-3' และ anti-sense 5'-ACT GCC CCC AGG TAG CTG CTG-3' (Genebank accession number U95844) สำหรับ beta-actin เพื่อใช้เป็น internal positive control และใช้ในการคำนวณความสัมพันธ์ในการปรากฏของ FasL จะใช้ primer คือ 5'-GAC CCA GAT CAT GTT TGA GACC-3' และ reverse primer 5'-ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCAG-3' number U95844) แถบความเข้มที่ได้จะนำมาตรวจสอบโดยใช้ densitometric scanning using NIH Image, version 1.62, free software (NIH, Bethesda, MD, USA) และความสัมพันธ์ในการปรากฏของ FasL จะแปรผลในรูปสัดส่วนของ FasL :  $\beta$ -actin

### **การประเมินและวิเคราะห์ผลการทดลอง**

ในกลุ่มของชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยวิธีฮีสโตเคมีและอิมมูโนฮิสโตเคมี จะนำมาวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างด้วยกำลังขยายต่างๆ กัน เพื่อสังเกตและประเมินผลความเข้ม (intensity) ของการติดสีบวก (positive staining) ในส่วนต่างๆ ของท่อน้ำไข จะใช้การประเมินแบบ semi-quantitative evaluation ดังนี้ เกรด - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)

สำหรับระดับความเข้มของ Fas และ FasL จะนำมาเปลี่ยนเป็นตัวเลข รวมทั้ง ความเข้มของ FasL จะประเมินโดยการใช้สัดส่วนของความเข้มของ FasL: beta-actin ซึ่งจะออกมาเป็นตัวเลขเช่นเดียวกัน จากนั้น นำข้อมูลที่ได้ไปประเมินผลและวิเคราะห์ทางสถิติข้อมูลทางสถิติจะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance (PROC MIXED หรือ GLM) จากโปรแกรม SAS version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) และวิธีอื่นๆ ที่เหมาะสมตามลักษณะของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จากผู้เชี่ยวชาญทางด้านสถิติชีวภาพโดยตรง โดยค่า  $P$ -values $<0.05$  จะนำมาพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

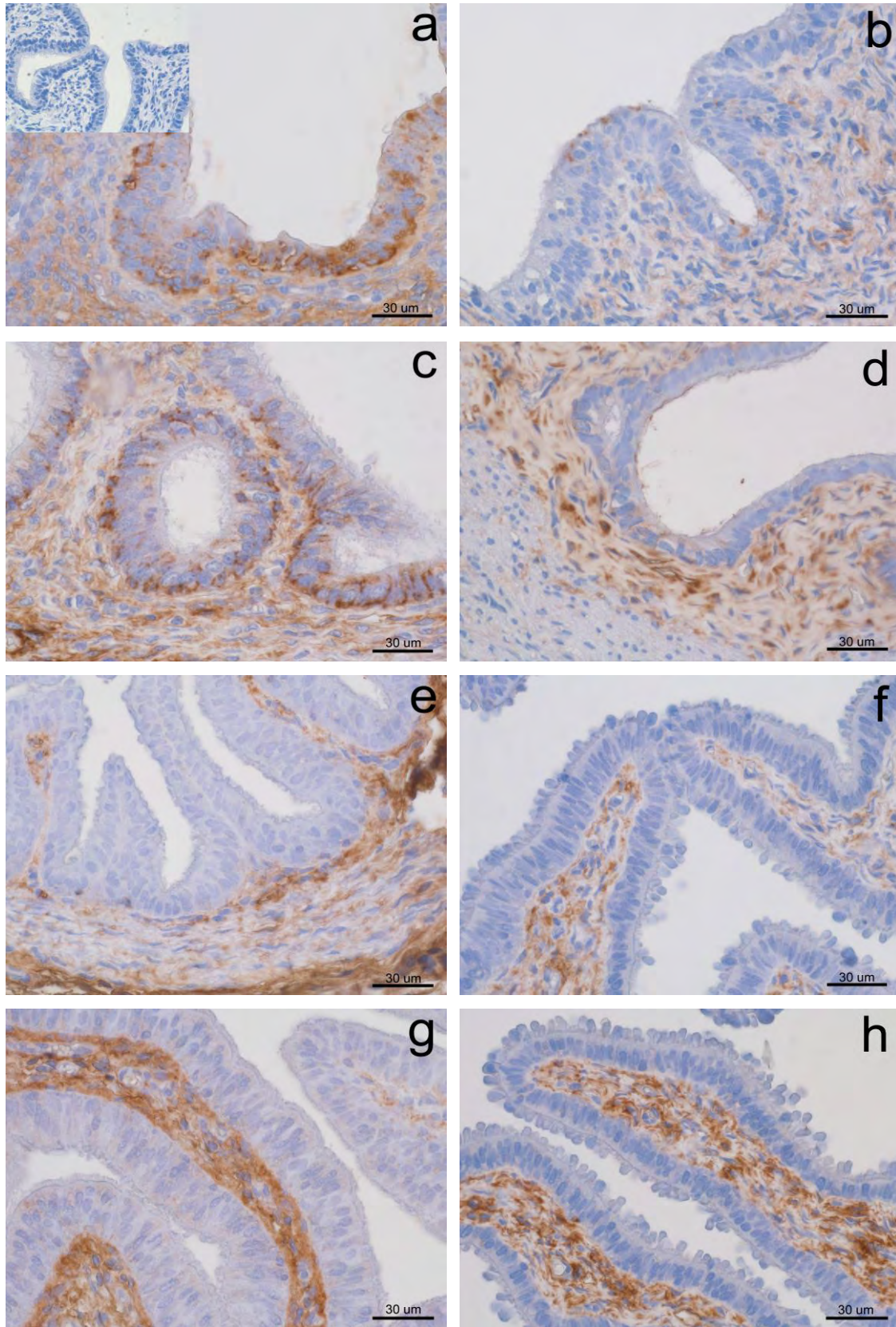
#### การปรากฏของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟตหรือไฮยาลูโรแนน (hyaluronan)

การแสดงผลของไฮยาลูโรแนนที่ปรากฏในท่อหน้าไขกระดูกกระบือปลักไทย พบว่า การติดสีบวก (น้ำตาลเข้ม) จะพบอย่างชัดเจนในชั้น lamina propria (ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวมที่อยู่ใต้เยื่อ) ในท่อหน้าไขทุกส่วนและทุกระยะของวงรอบการเป็นสัด (รูปที่ 1) โดยท่อหน้าไขส่วน UTJ ที่นำมาใช้เป็นสไลด์ควบคุมลบ ซึ่งใช้ *Streptomyces hyaluronidase* ก่อนหยดด้วย HABP ไม่พบการติดสีในทุกๆ ชั้นของท่อหน้าไข (รูปแทรกในรูปที่ 1a) ความเข้มในการติดสีบวกของไฮยาลูโรแนนในชั้นเยื่อผิวดังแสดงในตารางที่ 1 ไม่พบการติดสีบวกของไฮยาลูโรแนนปรากฏตลอดแนวของชั้นเยื่อผิวในท่อหน้าไขแอมพูลลา และอินฟันติบูลัมในทุกระยะของการเป็นสัด ขณะที่ชั้นเยื่อผิวของ UTJ และอิสรัมัส โดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์จะพบการติดสีบวกอย่างชัดเจนมากในเซลล์เยื่อผิวตรงบริเวณฐานและด้านข้าง (baso-lateral side) รวมทั้งส่วน apical part ของเซลล์ (รูปที่ 1a และ 1c) สำหรับระยะลูเทียลช่วงกลาง ท่อหน้าไขส่วน UTJ และอิสรัมัส จะพบการติดสีบวกเพียงเล็กน้อยเป็นจุดๆ ตรงบริเวณ apical part ของเซลล์เยื่อผิว โดยเฉพาะในส่วนที่เป็นร่องหลีบของท่อหน้าไขทั้ง 2 ส่วนดังกล่าว (รูปที่ 1b และ 1d) อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาการปรากฏของไฮยาลูโรแนนในครั้งนี้ ไม่อาจระบุได้อย่างชัดเจนว่า เซลล์ที่พบการติดสีบวกโดยส่วนใหญ่เป็นเซลล์ชนิดที่มีซีเลียหรือเซลล์ที่ทำหน้าที่คัดหลั่ง แต่ผลที่ได้นี้ ยืนยันการทำหน้าที่ของไฮยาลูโรแนนในท่อหน้าไขส่วน UTJ และอิสรัมัสระยะฟอลลิคูลาร์ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มในการติดสีบวกของไฮยาลูโรแนน ในบริเวณเฉพาะที่ปรากฏพบภายในเยื่อผิวท่อหน้าไขส่วนต่างๆ ของกระบือปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง

ระยะการเป็นสัด/ท่อหน้าไข	UTJ	อิสรัมัส	แอมพูลลา	อินฟันติบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	+++	+++	-	-
ลูเทียลช่วงกลาง	+	+	-	-

ความเข้มของการติดสีบวก: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)



รูปที่ 1 การปรากฏทางฮิสโตเคมีของไฮยาโลโรแนนในท่อหน้าไขกระดูกส่วน UTJ (a และ b), อิสรัมัส (c และ d), แอมพูลลา (e และ f) และอินฟันติบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูทีลช่วงกลาง (b, d, f และ h), สไลด์ควบคุมลบคือ UTJ ซึ่งไม่พบการติดสี (รูปแทรกใน a), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร



### การปรากฏของซัลเฟตไกลโคสะอะมิโนไกลแคนส์ (Syndecan-1 และ Syndecan-2)

ผลการปรากฏของซัลเฟตไกลโคสะอะมิโนไกลแคนส์ ในรูปของเฮพารันซัลเฟตโปรติโอไกลแคนส์ หรือ syndecans ซึ่งประกอบด้วย syndecan-1 และ syndecan-2 มีลักษณะของการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยพบว่าระดับการติดสีบวกของ syndecan-1 จะปรากฏเข้มข้นชัดเจนในท่อนำไขทุกส่วนและพบการปรากฏได้ ทั้ง 2 ระยะของวงรอบการเป็นสัปดาห์แสดงในตารางที่ 2 โดยลักษณะการติดสีบวกจะพบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุ และพบการติดสีกระจายทั่วไปตลอดแนวของเยื่อบุผิว ขณะที่บริเวณ lamina propria ได้ชั้นเยื่อบุผิว นั้น ไม่พบการติดสีอย่างเด่นชัด (รูปที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่า การติดสีบวกของ syndecan-1 ที่ชั้นเยื่อบุผิวของ UTJ และอิสรัมัส นอกจากจะปรากฏภายในไซโตพลาสซึมแล้ว จะพบลักษณะการติดสีน้ำตาลเข้มอยู่ที่ขอบบนของเซลล์เยื่อบุด้วย (epithelial cell surface) ขณะที่ลักษณะดังกล่าวไม่ปรากฏในท่อนำไขส่วนอื่นๆ (รูปที่ 2a-d เปรียบเทียบกับรูปที่ 2e-h) นอกจากนี้ เมื่อสังเกตเซลล์ที่ยื่นหลอดออกมา (epithelial cell protrusions) ภายในท่อนำไขส่วนแอมพูลลาและอินฟันติบูลัม จะพบการติดสีบวกที่เซลล์ดังกล่าวอย่างชัดเจน (รูปที่ 2f และ 2h)

สำหรับระดับความเข้มในการติดสีบวกของ syndecan-2 จะพบการติดสีที่บริเวณเยื่อบุผิวของท่อนำไขทุกส่วน แต่ระดับความเข้มจะปรากฏอย่างชัดเจนภายในเยื่อบุผิวของท่อนำไขทุกส่วนระยะฟอลลิคูลาร์ ขณะที่การติดสีบวกของ syndecan-2 ในท่อนำไขทุกส่วนระยะลูเทียลช่วงกลางนั้นพบได้ค่อนข้างน้อยหรือแทบไม่ติดสีเลยดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 3 b, d, f, h จะสังเกตได้ว่า ท่อนำไขส่วน UTJ และอิสรัมัส ในระยะฟอลลิคูลาร์ จะพบการติดสีบวกของ syndecan-2 ตรงบริเวณร่องหลืบอย่างชัดเจน (รูปที่ 3a และ 3c) ลักษณะการติดสีบวกของ syndecan-2 ภายในท่อนำไขส่วนแอมพูลลาและอินฟันติบูลัมจะพบตลอดแนวของเยื่อบุผิว และปรากฏอย่างชัดเจนบริเวณ apical part ของเซลล์เยื่อบุผิว (รูปที่ 3e และ 3g) อย่างไรก็ตาม ไม่พบลักษณะการติดสีบริเวณขอบบนของเซลล์เยื่อบุ สำหรับบริเวณ lamina propria ได้ชั้นเยื่อบุผิว พบการติดสีบวกเพียงเล็กน้อยหรือแทบไม่ติดสีบวกเลย

กล่าวได้ว่า การติดสีบวกของ syndecan-1 และ syndecan-2 ที่พบในชั้นเยื่อบุผิว นั้น ไม่อาจจะบ่งชี้ว่าการติดสีนั้นเกิดขึ้นภายในเซลล์ชนิดที่มีซีเลียหรือเซลล์ค้ำหลัง ในสไลด์ควบคุมลบซึ่งได้ใช้แอมพูลลาและใช้ IgG1 ทดแทนการใช้แอนติบอดีหลัก ไม่พบการติดสีเลยทั่วทุกชั้นของเนื้อเยื่อท่อนำไข (รูปแทรกในรูปที่ 2a และรูปแทรกในรูปที่ 3a)

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มในการติดสีบวกรหัสวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1 ภายในเยื่อบุผิวท่อน้ำ  
ไขส่วนต่างๆ ของกระดูกปอกในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกวาง

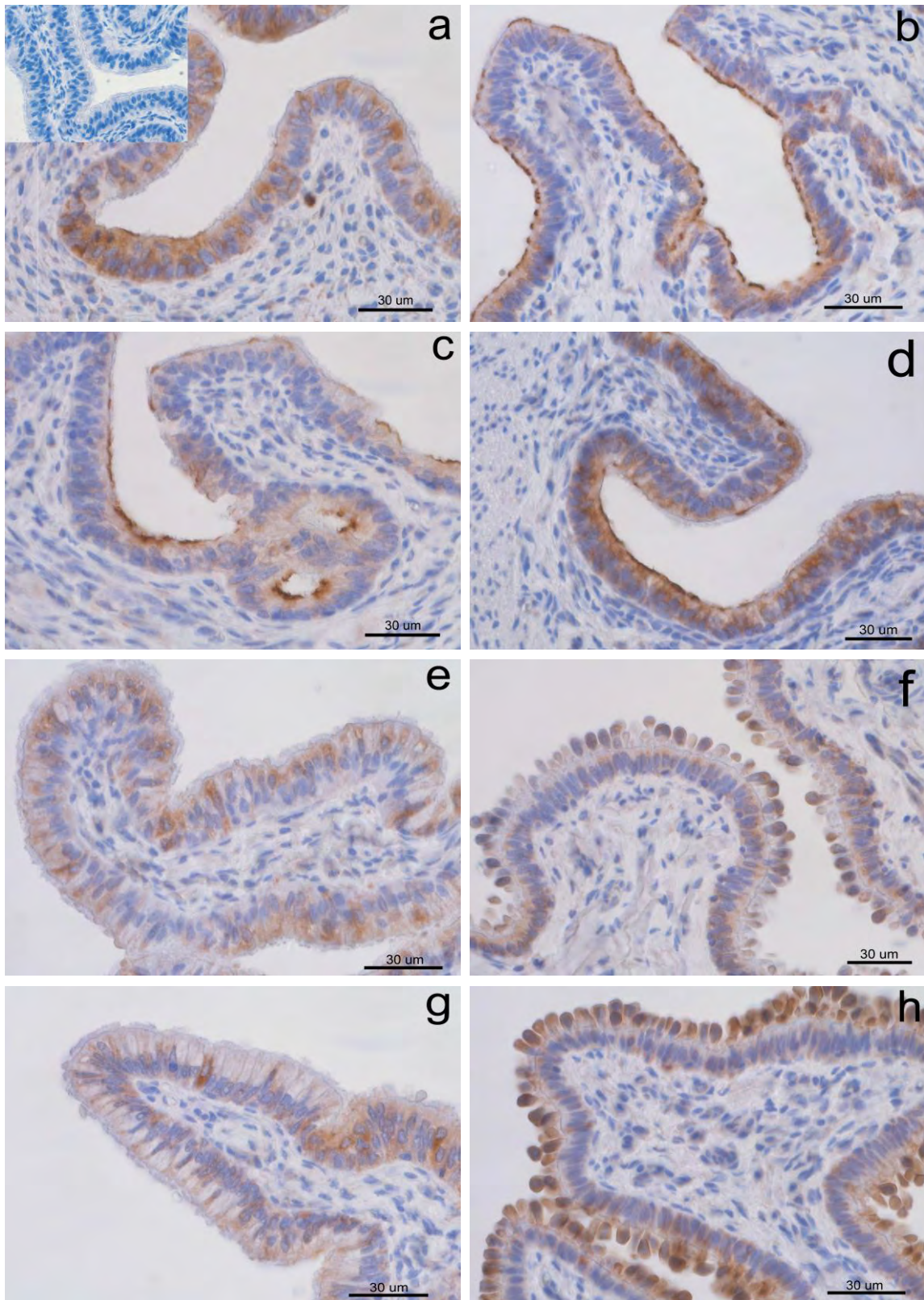
ระยะการเป็นสัด/ท่อน้ำไข	UTJ	อิสธร์มัส	แอมพูลลา	อินฟันดิบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	++/+++	++/+++	++	++
ลูเทียลช่วงกวาง	++/+++	++/+++	++	++

ความเข้มของการติดสีบวกรหัส: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining),  
++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มในการติดสีบวกรหัสวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2 ภายในเยื่อบุผิวท่อน้ำ  
ไขส่วนต่างๆ ของกระดูกปอกในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกวาง

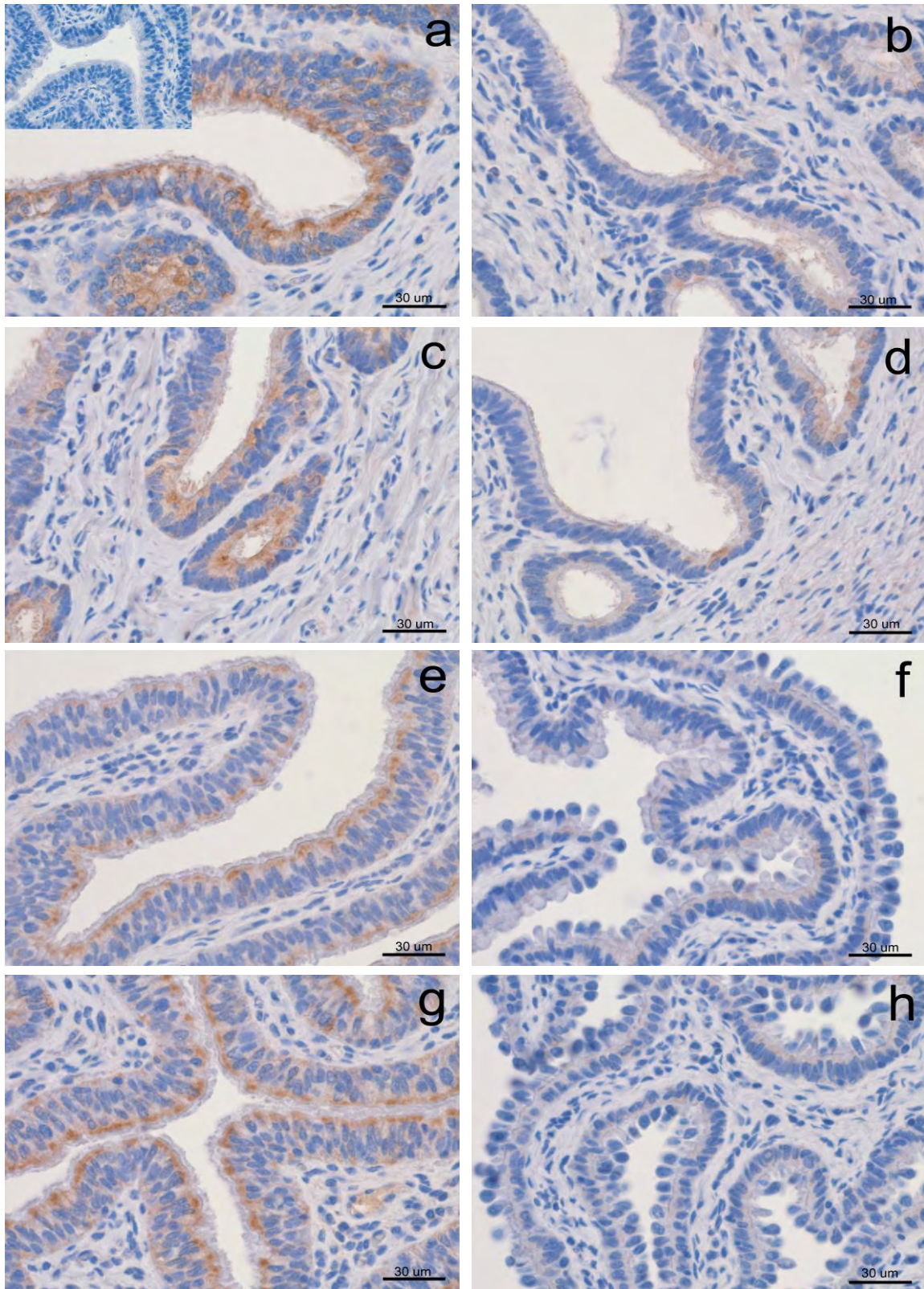
ระยะการเป็นสัด/ท่อน้ำไข	UTJ	อิสธร์มัส	แอมพูลลา	อินฟันดิบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	++/+++	++/+++	++	++
ลูเทียลช่วงกวาง	+	+	-/+	-/+

ความเข้มของการติดสีบวกรหัส: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining),  
++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)



รูปที่ 2 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-1 ในท่อหน้าไขกระดูกปลั่งส่วน UTJ (a และ b), อีสท์มัส (c และ d), แอมพลูตา (e และ f) และอินฟันดิบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูเทียลช่วงกลาง (b, d, f และ h), สไลด์ควบคุมลบคือแอมพลูตาซึ่งใช้ PBS แทนแอนติบอดี syndecan-1 (รูปแทรกใน a), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร





**รูปที่ 3** การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ syndecan-2 ในท่อหน้าไขกระบี้อปลักส่วน UTJ (a และ b), อีสุทน์มัส (c และ d), แอมพูลลา (e และ f) และอินฟันติบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูเทียลช่วงกลาง (b, d, f และ h) สไลด์ควบคุมลบคือแอมพูลลาซึ่งใช้ PBS แทนแอนติบอดี syndecan-2 (รูปแทรกใน a), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร

### การปรากฏของตัวรับไฮยาโลโรแนนหรือ CD44

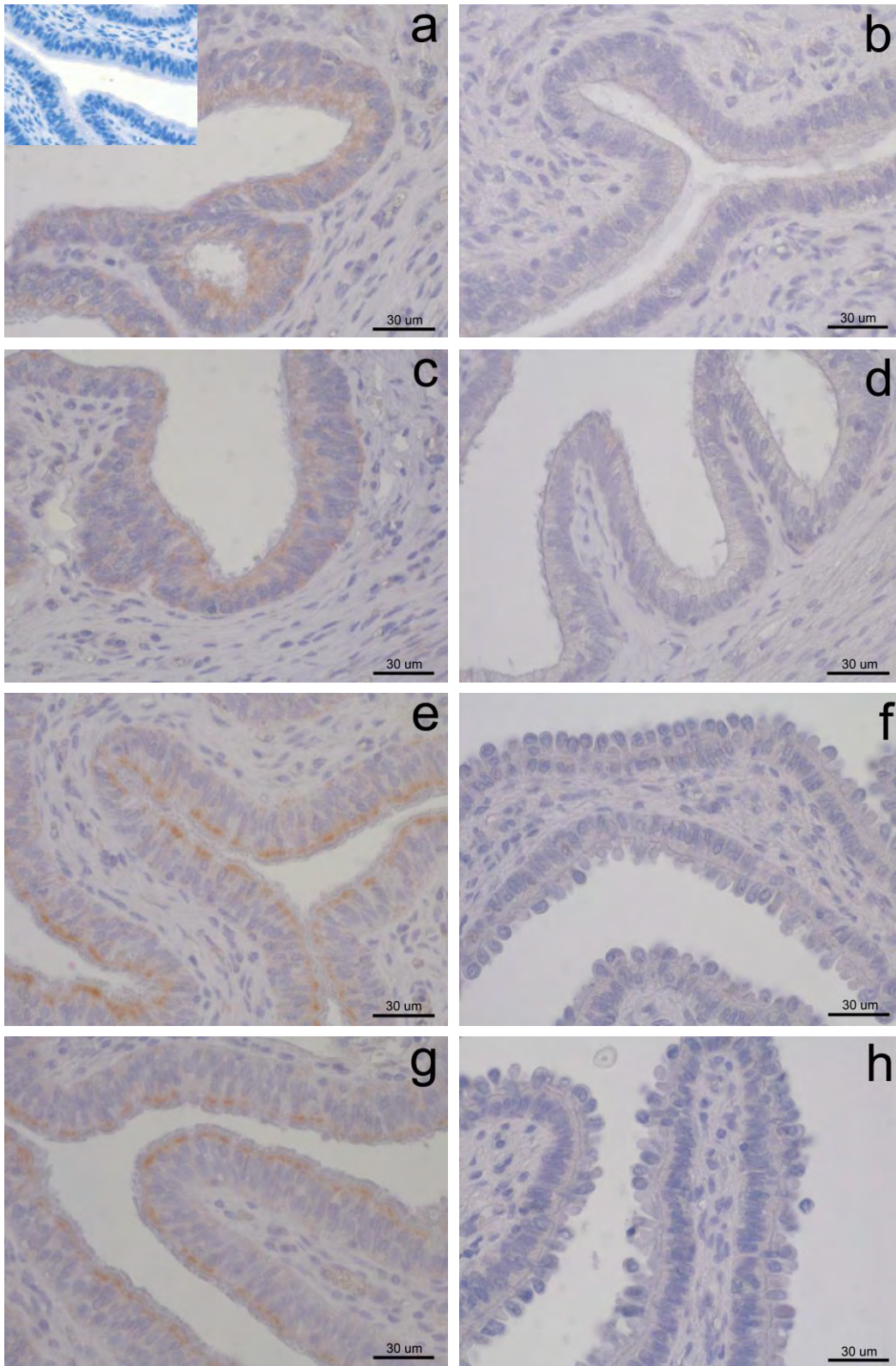
การแสดงของ CD44 ที่ปรากฏในท่อน้ำไขกระดูกไทย พบว่า จะมีการติดสีบวก (สีน้ำตาล) เฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเท่านั้น (รูปที่ 4) โดยตำแหน่งที่ปรากฏจะพบได้ที่บริเวณ supranuclear membrane ของเซลล์เยื่อหุ้มของท่อน้ำไขกระดูกส่วนและพบในระยะฟอลลิคูลาร์เท่านั้น (รูปที่ 4a, c, e, g) โดยท่อน้ำไขกระดูกส่วน ampulla ที่นำมาใช้เป็นสไลด์ควบคุมลบ ไม่พบการติดสี (รูปแทรกในรูปที่ 4a) อย่างไรก็ตาม ผลของการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44 ในการศึกษาครั้งนี้มีความแปรปรวนเป็นอย่างมาก ซึ่งพบว่า ความเข้มในการติดสีบวกของไฮยาโลโรแนนในชั้นเยื่อหุ้มตัวแสดงในตารางที่ 4 เกิดขึ้นไม่แน่นอน ระดับของการติดสีเกิดขึ้นแตกต่างกัน รวมทั้งพบการไม่ติดสีเลยเกิดขึ้นในท่อน้ำไขกระดูกบางตัวอย่างในระยะฟอลลิคูลาร์

**ตารางที่ 4** ระดับความเข้มในการติดสีบวกของ CD44 ในบริเวณเฉพาะที่ปรากฏพบภายในเยื่อหุ้มท่อน้ำไขกระดูกส่วนต่าง ๆ ของกระดูกไขกระดูกในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลช่วงกลาง

ระยะการเป็นสัด/ท่อน้ำไข	UTJ	อิสร์มัส	แอมพูลลา	อินฟันติบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	+/-	+/-	++/+/-	++/+/-
ลูทีลช่วงกลาง	-	-	-	-

ความเข้มของการติดสีบวก: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)

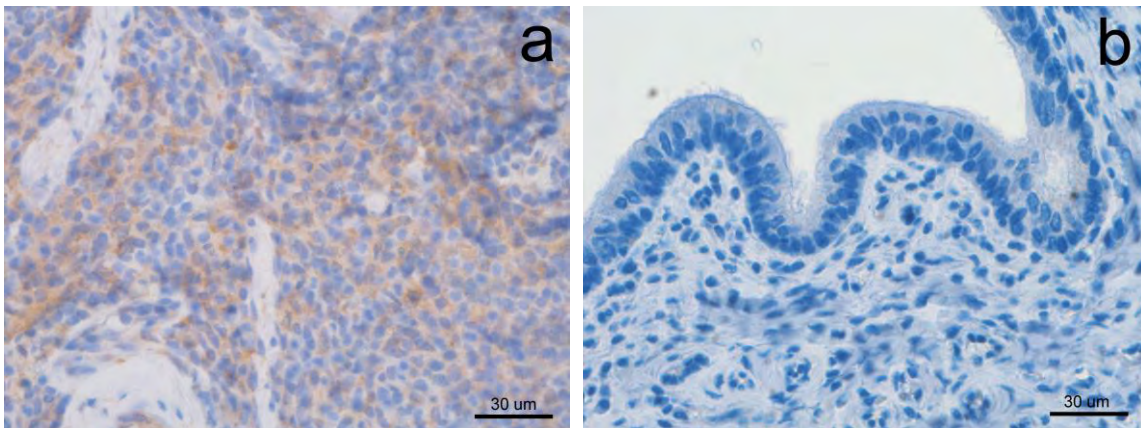




**รูปที่ 4** การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CD44 ในท่อหน้าไข่กระเปาะปลักส่วน UTJ (a และ b), อีสร์มัส (c และ d), แอมพูลลา (e และ f) และอินฟันติบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูทีลช่วงกลาง (b, d, f และ h) สไลด์ควบคุมลบคือแอมพูลลาซึ่งใช้ PBS แทนแอนติบอดี CD44 (รูปแทรกใน a), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร

### การปรากฏของโปรตีน Fas

การปรากฏของโปรตีน Fas ในต่อมน้ำเหลืองซึ่งใช้เป็นสไลด์ควบคุมบวก พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ที่กระจายอยู่ในต่อมน้ำเหลืองติดสีบวก (สีน้ำตาล) ปรากฏบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของต่อมน้ำเหลือง (รูปที่ 5a) ขณะที่สไลด์ควบคุมลบไม่พบการติดสีใดๆ (รูปที่ 5b) ในท่อไตกระเปาะปลัก การปรากฏของโปรตีน Fas ที่ติดสีบวกโดยส่วนใหญ่พบกระจายได้ทั่วไปตลอดแนวของเซลล์เยื่อบุผิว ขณะที่ภายในบริเวณ lamina propria (ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุผิว) พบการติดสีบวกกระจัดกระจายและปรากฏเพียงเล็กน้อย ลักษณะการติดสีบวกภายในเซลล์เยื่อบุผิว จะพบอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งไม่อาจระบุชนิดของเซลล์ได้ว่าเป็นเซลล์ค้ำค้ำหรือเซลล์ที่มีซีเลีย (รูปที่ 6) ระดับความเข้มในการติดสีบวกของ Fas ในท่อไตทุกส่วนที่ปรากฏทั้งสองระยะของวงรอบการเป็นสัตว์ตั้งแสดงในตารางที่ 4 พบระดับความเข้มของการติดสีบวกอยู่ในระดับปานกลาง และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) (รูปที่ 7a) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีน Fas ในท่อไตส่วนเดียวกัน ในระยะที่ต่างกัน ระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลช่วงกลางในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของระดับความเข้มของการติดสีบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ ) เช่นเดียวกัน (รูปที่ 7b)



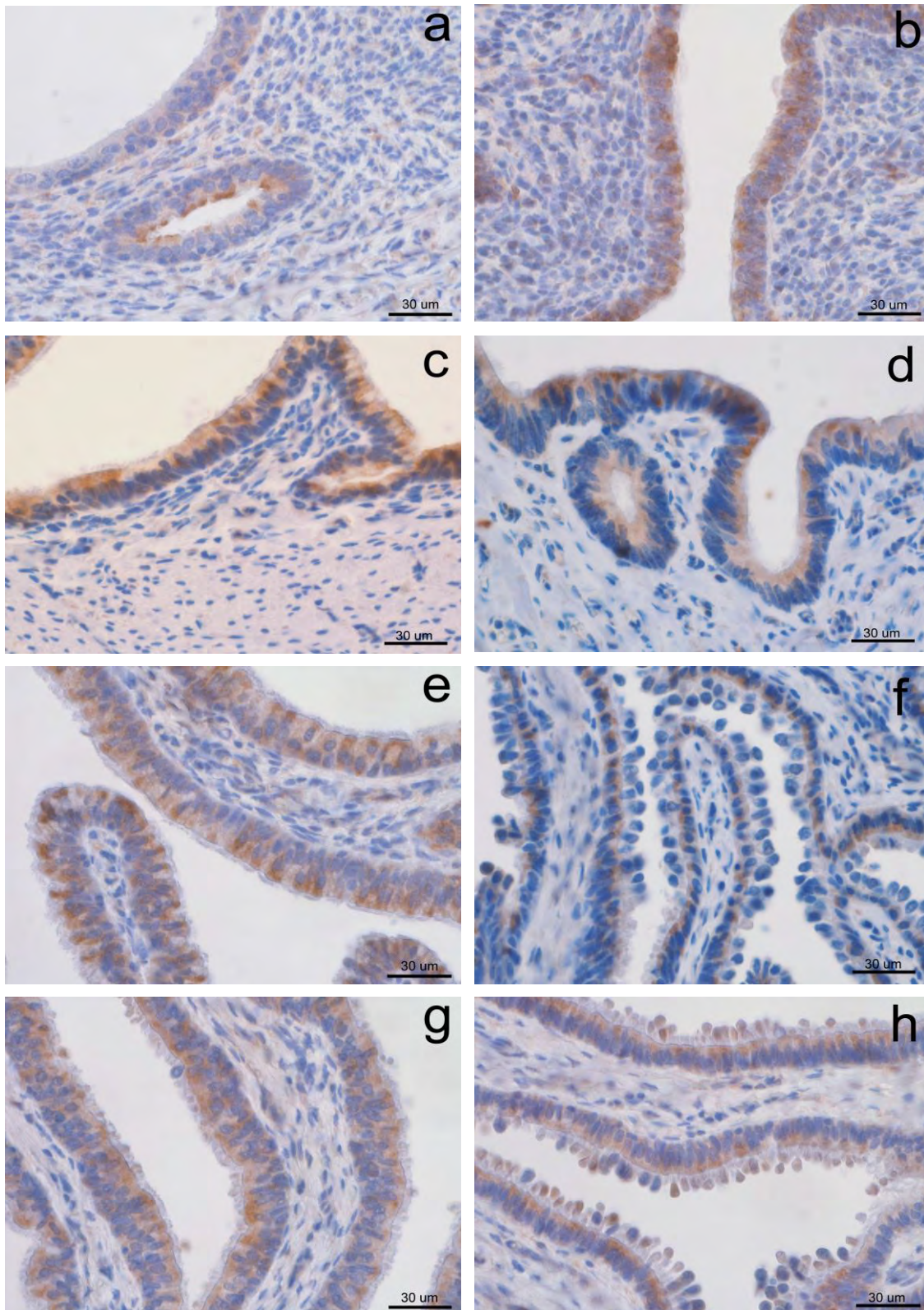
รูปที่ 5 การติดสีบวกของโปรตีน Fas ในสไลด์ควบคุมบวกโดยใช้ต่อมน้ำเหลือง (a) และ UTJ ซึ่งใช้ mouse IgM ทดแทนการใช้แอนติบอดี Fas เป็นสไลด์ควบคุมลบ (b), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร

ตารางที่ 5 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ภายในเยื่อบุผิวท่อไตส่วนต่างๆ ของกระเปาะปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลช่วงกลาง

ระยะการเป็นสัตว์/ท่อไต	UTJ	อิสร์มีส	แอมพูลลา	อินฟันติบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++
ลูทีลช่วงกลาง	++/+++	++/+++	++	++

ความเข้มของการติดสีบวก: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)

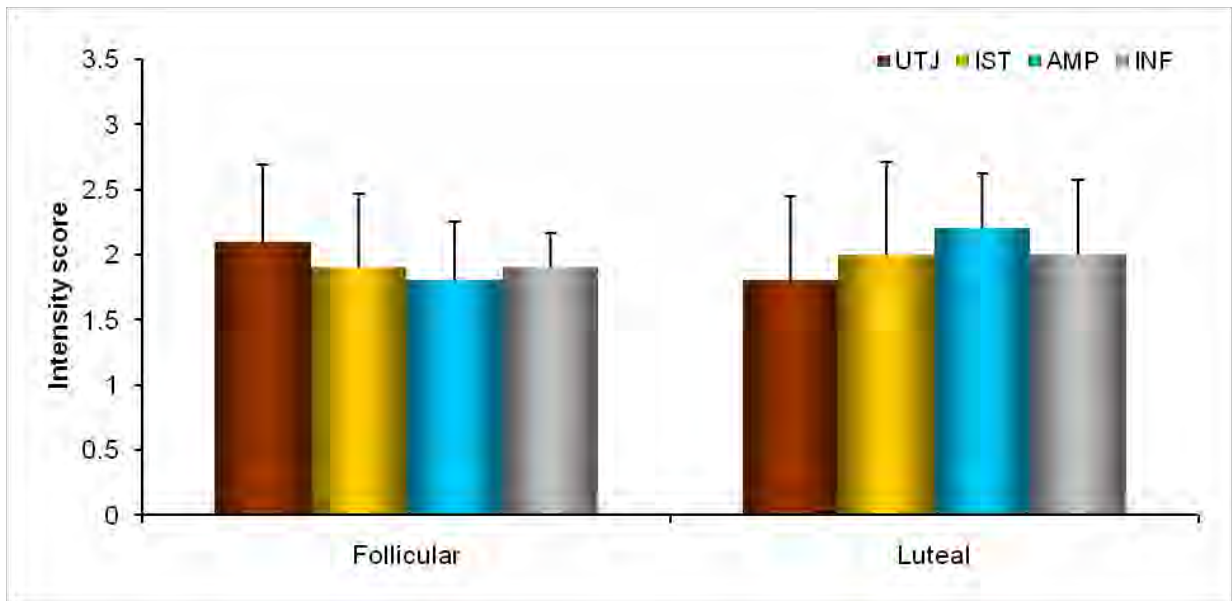




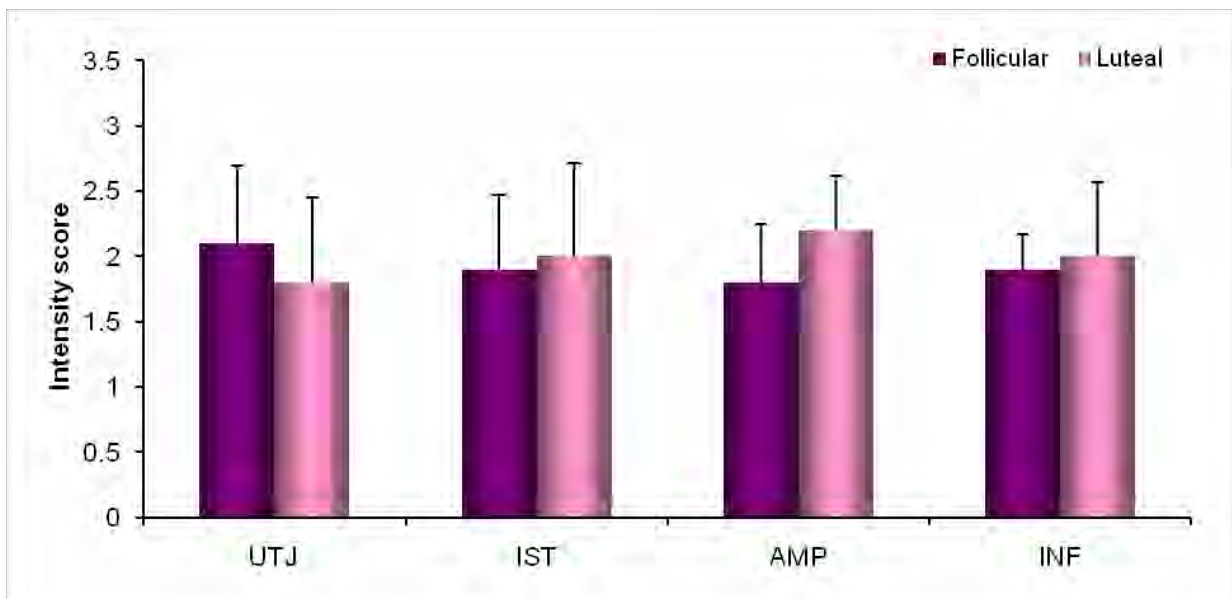
รูปที่ 6 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Fas ในท่อนำไข่กระเปาะปลักส่วน UTJ (a และ b), อีส์มัส (c และ d), แอมพูลลา (e และ f) และอินฟันติบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูทีลช่วงกลาง (b, d, f และ h) ของวงรอบการเป็นสัด, สังเกตการติดสีบวกระบายอยู่ภายในชั้นเยื่อบุผิวของท่อนำไข่, แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร



a



b

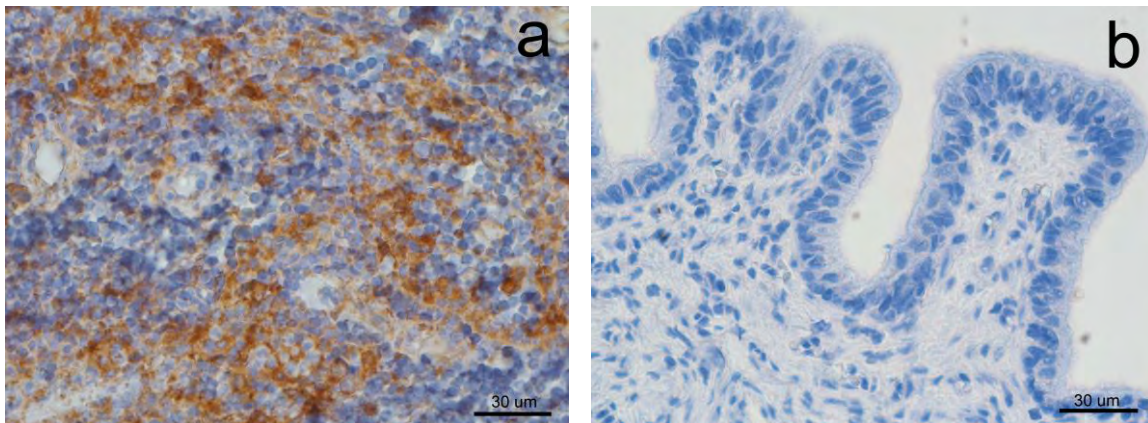


รูปที่ 7 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน Fas เมื่อเปรียบเทียบในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระบอกปลัดในระยะเดียวกัน (a) และระดับความเข้มในการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบในท่อนำไข่ส่วนเดียวกันในระยะที่แตกต่างกัน (b)

### การปรากฏของโปรตีน FasL

ในต่อมหน้าเหลืองซึ่งใช้เป็นสไลด์ควบคุมบวก พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ที่กระจายอยู่ในต่อมหน้าเหลืองมีการติดสีบวกของโปรตีน FasL โดยการติดสีปรากฏที่เยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 8a) ในขณะที่สไลด์ควบคุมลบไม่พบการแสดงออกของโปรตีน FasL (รูปที่ 8b)

การแสดงออกของโปรตีน FasL ในต่อมไข้ ปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนภายในเซลล์เยื่อบุผิว แต่การติดสีปรากฏเพียงเล็กน้อยในเซลล์ที่กระจายอยู่ภายในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุ ลักษณะการติดสีบวกของ FasL ปรากฏชัดเจนในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งการติดสีไม่พบในเซลล์เยื่อบุผิวทุกเซลล์ และเซลล์ที่ติดสีบวกไม่สามารถระบุชนิดของเซลล์ได้ว่าเป็นเซลล์ค้ำหลังหรือเซลล์ที่มีซีเลีย (รูปที่ 9) ในต่อมไข้ทุกๆ ระยะฟอลลิคูลาร์พบการติดสีบวกตลอดแนวของเยื่อบุผิวต่อมไข้ (รูปที่ 9a, c, e, g) เมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มในการติดสี พบว่า ระดับความเข้มในการติดสีบวกของโปรตีน FasL ในต่อมไข้ส่วน UTJ และอิสร်มัส์ ระยะฟอลลิคูลาร์จะอยู่ในระดับเข้มมาก ขณะที่ระดับความเข้มในการติดสีบวกภายในเยื่อบุของต่อมไข้ส่วนแอมพูลลาและอินฟันติบูลัมระยะฟอลลิคูลาร์อยู่ในระดับปานกลาง ระดับความเข้มของการติดสีบวกในต่อมไข้ทุกส่วนที่พบในระยะลูทีลช่วงกลาง อยู่ในระดับอ่อนถึงปานกลาง (ตารางที่ 6) เมื่อตรวจสอบระดับความเข้มโดยใช้ค่าทางสถิติ พบว่า ความเข้มในการติดสีบวกของโปรตีน FasL มีความแตกต่างเกิดขึ้นในต่อมไข้แต่ละส่วนเมื่อเปรียบเทียบในระยะฟอลลิคูลาร์ (รูปที่ 10a) โดยพบว่า ความเข้มของการติดสีบวกใน UTJ และอิสร်มัส์อยู่ในระดับเข้มมาก และทั้งสองส่วนนี้มีความเข้มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) เมื่อพิจารณาความเข้มในการติดสีบวกของต่อมไข้ในส่วนเดียวกันในระยะที่แตกต่างกัน พบว่า ความเข้มของการติดสีบวกของโปรตีน FasL ที่พบในต่อมไข้ส่วน UTJ และอิสร်มัส์ในระยะฟอลลิคูลาร์ มีความเข้มมากกว่าระยะลูทีลช่วงกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) (รูปที่ 10b)

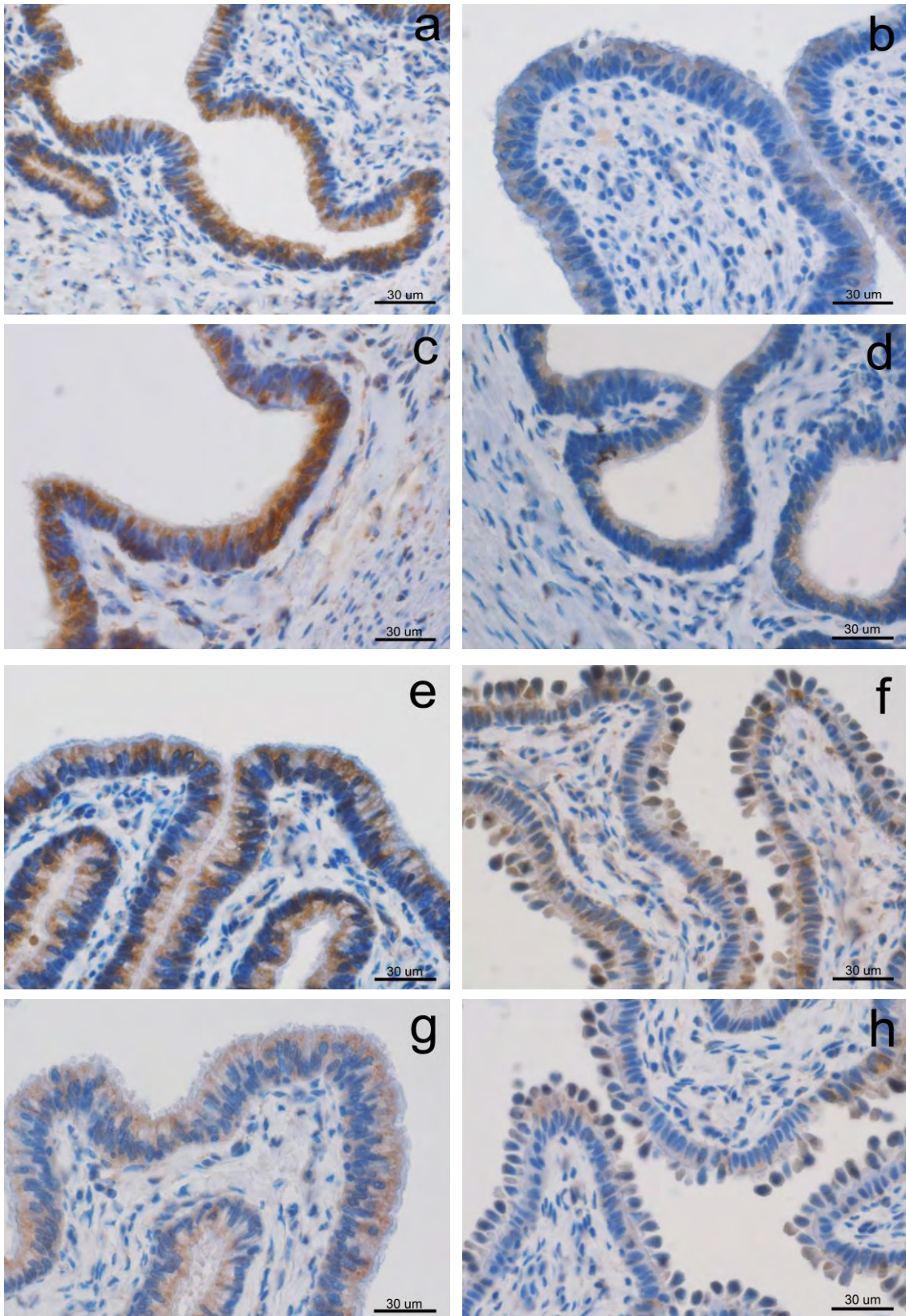


รูปที่ 8 การติดสีบวกโดยปรากฏเห็นเป็นสีน้ำตาลของโปรตีน Fas Ligand (FasL) ในสไลด์ควบคุมบวกโดยใช้เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (a) และท่อหายใจส่วน UTJ ซึ่งใช้ mouse IgG1 แทนการใช้แอนติบอดี FasL เป็นสไลด์ควบคุมลบ (b), แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร

ตารางที่ 6 ระดับความเข้มในการติดสีบวกโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ภายในเยื่อบุผิวท่อหายใจส่วนต่างๆ ของกระป๋องปลักในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง

ระยะการเป็นสัด/ท่อหายใจ	UTJ	อิสร์มัส	แอมพูลลา	อินฟันติบูลัม
ฟอลลิคูลาร์	+++	+++	++	++
ลูเทียลช่วงกลาง	+ / +++	+ / ++	+ / ++	- / ++

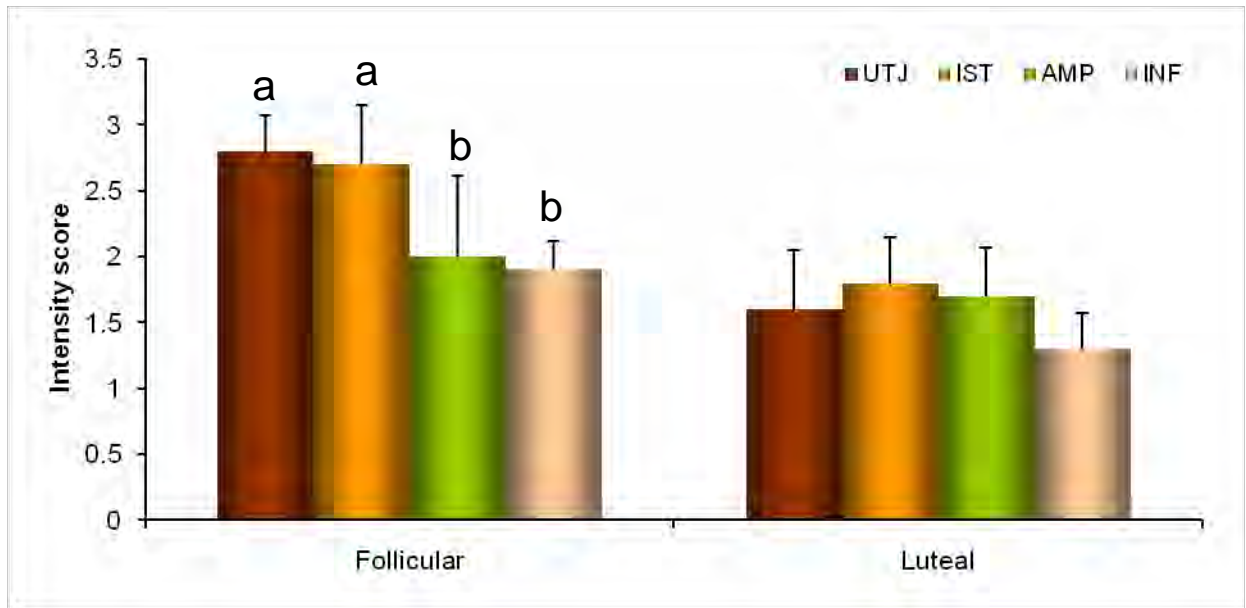
ความเข้มของการติดสีบวก: - = ไม่พบการติดสี (negative staining), เกรด + = ติดสีอ่อน (weak staining), ++ = ติดสีปานกลาง (moderate staining), +++ = ติดสีเข้ม (strong staining)



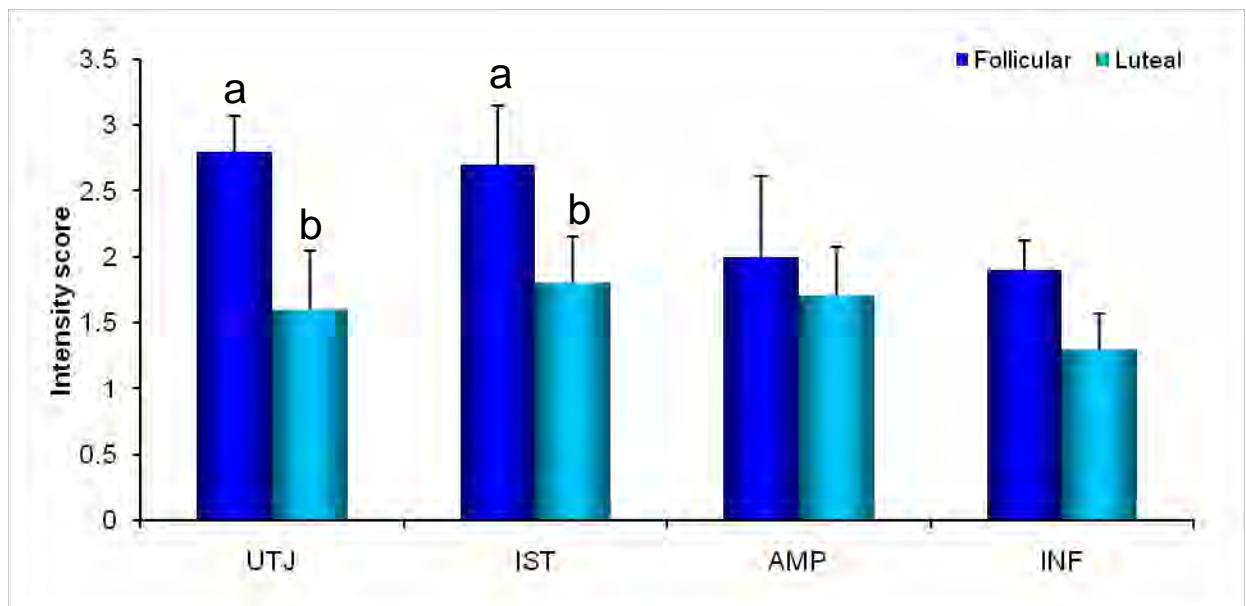
รูปที่ 9 การปรากฏทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของโปรตีน FasL ในท่อนำไขกระบี้อปลั๊กส่วน UTJ (a และ b), อีสร์มัส (c และ d), แอมพูลลา (e และ f) และอินฟันติบูลัม (g และ h) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (a, c, e และ g) และระยะลูทีลช่วงกลาง (b, d, f และ h), สังเกตการติดสีบวกกระจายชัดเจนอยู่ภายในชั้นเยื่อหุ้มของท่อนำไขกระบี้อปลั๊กส่วน UTJ, แถบมาตราส่วน = 30 ไมโครเมตร



a



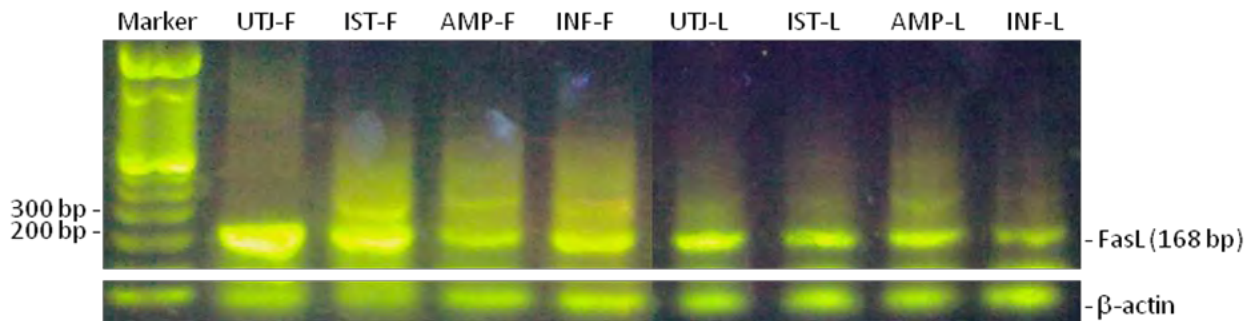
b



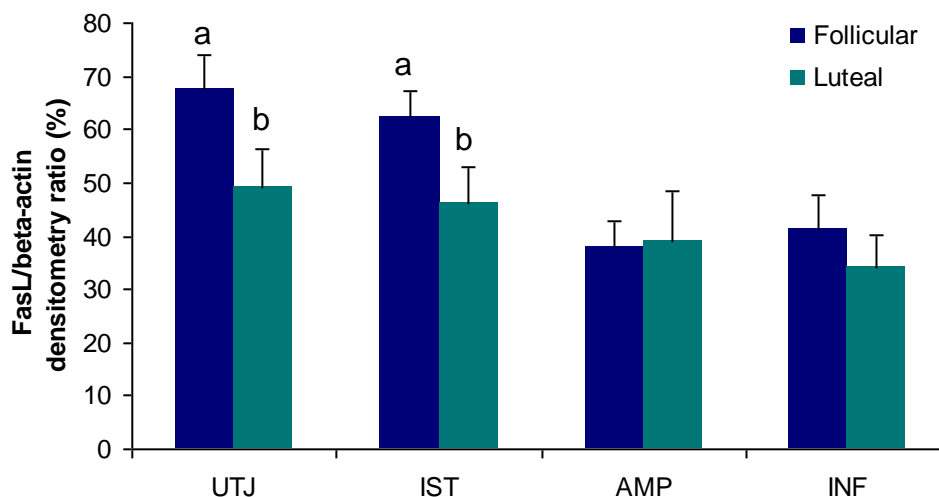
รูปที่ 10 ระดับความเข้ม (intensity score, ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD) ในการติดสีบวกของโปรตีน FasL เมื่อเปรียบเทียบในท่อนำไข่ส่วนต่างๆ ของกระเปาะปลักในระยะเดียวกัน (a) และระดับความเข้มในการติดสีบวกเมื่อเปรียบเทียบในท่อนำไข่ส่วนเดียวกันในระยะที่แตกต่างกัน (b); ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ปรากฏแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

### การแสดงผลของ FasL mRNA ด้วยวิธี RT-PCR

จากการตรวจสอบการแสดงผลของ FasL mRNA ในท่อนำไข่กระปือปลักพบว่า FasL สามารถตรวจพบได้ภายในท่อนำไข่ทุกส่วน ซึ่งพบได้ทั้งในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด โดย FasL mRNA ที่พบมีขนาด 168 bp (รูปที่ 11) การแสดงผลของ FasL mRNA ในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสร์มีสในระยะฟอลลิคูลาร์ มีอัตราส่วนของความเข้มปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนและพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสร์มีสโดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ส่วนเดียวกันในระยะลูเทียลช่วงกลาง (รูปที่ 12)



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ในการแสดงผลของ FasL mRNA โดยวิธี RT-PCR ในชั้นเยื่อบุของท่อนำไข่กระปือปลักส่วนรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (UTJ), อิสร์มีส (IST), แอมพูลลา (AMP) และอินฟันติบูลัม (INF) ในระยะฟอลลิคูลาร์ (F) และระยะลูเทียลช่วงกลาง (L) ต่อการแสดงผลของ  $\beta$ -actin ที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวกภายใน (internal positive control)



รูปที่ 12 อัตราส่วน (%) ของระดับความเข้มในการแสดงผลของ FasL:  $\beta$ -actin ที่ปรากฏในท่อนำไข่กระปือปลักส่วนต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง โดยวิธี RT-PCR; รอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (UTJ), อิสร์มีส (IST), แอมพูลลา (AMP) และอินฟันติบูลัม (INF), ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ปรากฏแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสารชนิดต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งตัวอ่อนในระยะแรก มีความจำเป็นอย่างมากที่จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้นสำหรับกลไกในกระบวนการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ และข้อมูลที่ได้อ้างกล่าว จะทำให้ทราบถึงความผิดปกติที่อาจพบได้ภายในท่อนำไข่ซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะผสมไม่ติด ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องข้องในการรักษาการมีชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์ การขนส่งเซลล์สืบพันธุ์ การคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิ การปฏิสนธิ รวมทั้งการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกที่เกิดขึ้นภายในของเหลวและเซลล์เยื่อหุ้มของท่อนำไข่กระบือปลักไทย

รายงานการวิจัยที่ผ่านมาจำนวนมาก ได้มีการนำเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พร้อมกับการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์อสุจิที่ได้สัมผัสกับผิวของเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่ พบว่า กลุ่มของเซลล์อสุจิที่จะมีประสิทธิภาพเพียงพอในการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ได้ต้องมีการยึดติดกับเซลล์เยื่อหุ้มของท่อนำไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์เยื่อหุ้มของท่อนำไข่ในส่วนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจินั้นคือ บริเวณรอยต่อของปีกมดลูกและท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) และส่วนท้ายของอัสสัม (Pollard et al., 1991; Lefebvre et al., 1995) นอกจากนี้ ยังมีการนำของเหลวที่เก็บได้จากท่อนำไข่ไปผสมในน้ำยาที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์อสุจิโค ซึ่งมีผลทำให้เซลล์อสุจิดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีขึ้นในการปฏิสนธิ (Parrish et al., 1989) แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องข้องในการกระตุ้นให้เซลล์อสุจิมีประสิทธิภาพดีขึ้น ประกอบด้วย การยึดติดบริเวณผิวของเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่ และการสัมผัสกับของเหลวภายในท่อนำไข่ ซึ่งของเหลวดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่มีการคัดหลั่งมาจากเซลล์เยื่อหุ้มของท่อนำไข่ รายงานการวิจัยที่ผ่านมาระบุว่า ส่วนประกอบหลักที่พบภายในของเหลวของท่อนำไข่ประกอบด้วย “ไฮยาลูโรแนน” ซึ่งเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต สามารถพบได้ในท่อนำไข่สุกร (Tienthai et al., 2000) และท่อนำไข่โค (Bergqvist et al., 2005a) โดยไฮยาลูโรแนน มีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นสารคัดเลือกเซลล์อสุจิที่สามารถพิสูจน์ได้ในห้องปฏิบัติการ (Shamsuddin et al., 1993) อย่างไรก็ตาม ไกลโคสะมิโนไกลแคนส์กลุ่มที่มีซัลเฟต ก็ยังสามารถตรวจพบได้ในท่อนำไข่ของสุกร (Tienthai et al., 2000) และโค (Bergqvist and Rodriguez-Martinez et al., 2006) ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น สารประกอบดังกล่าวทั้งสองกลุ่มจึงน่าจะมีส่วนร่วมต่อเซลล์สืบพันธุ์ และการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนในรูปแบบหรือลักษณะที่แตกต่างกันไปภายในท่อนำไข่สุกรและโค แน่หนอนว่า ยังไม่ได้มีรายงานการศึกษาวิจัยใดๆ ในการศึกษาสารทั้งสองชนิดนี้ในกระบือปลักไทย

การปรากฏของไกลโคสะมิโนไกลแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต หรือที่เรียกว่าไฮยาลูโรแนน ในท่อนำไข่ของกระบือปลักของการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีการแสดงออกของไฮยาลูโรแนนอย่างชัดเจนภายในชั้นใต้เซลล์เยื่อหรือ lamina propria ของท่อนำไข่กระบือปลักทุกส่วน ซึ่งพบได้ทั้งสองระยะของวงรอบการเป็นสัด เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมาในโค (Ulbrich et al., 2004; Bergqvist et al., 2005a) และสุกร (Tienthai et al., 2000) โดยทั่วไปนั้น การปรากฏของไฮยาลูโรแนนสามารถตรวจพบได้ชัดเจนใน extracellular matrix ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวม (loose connective tissue) ของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย (Laurent and Fraser, 1992) ซึ่งเนื้อเยื่อใต้เยื่อคือ lamina propria เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหลวม จึงไม่น่าแปลกใจที่จะพบไฮยาลูโรแนนอย่างชัดเจนในชั้นดังกล่าวนี้ของท่อนำไข่กระบือปลัก แต่ที่สำคัญคือ การปรากฏของไฮยาลูโรแนนภายในชั้นเซลล์เยื่อหุ้มและ/หรือบนขอบชั้นบนของเซลล์เยื่อ ในการศึกษานี้จะพบไฮยาลูโรแนนได้

เด่นชัดใน UTJ และอิสร์มัส โดยเฉพาะระยะฟอลลิคูลาร์ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในท่อนำไข่สุกร (Tienthai et al., 2000) และในท่อนำไข่โค (Bergqvist et al., 2005a) ขณะที่ Ulbrich และคณะ (2004) ไม่พบการปรากฏของไฮยาลูโรแนนในชั้นเยื่อท่อนำไข่โคทุกส่วน ความแตกต่างที่พบดังกล่าวนี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการใช้น้ำยาตอง (fixative) ในการเก็บรักษาท่อนำไข่ก่อนดำเนินการทดลอง ตามที่ Lin และคณะ (1997) ได้ระบุว่าการศึกษาของไฮยาลูโรแนน โดยเฉพาะในเยื่อฝูวนั้นมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสารที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเมื่อนำมาใช้กับ biotinylated HABP สำหรับผลการศึกษาค้นคว้าที่พบการปรากฏของไฮยาลูโรแนนในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ อาจบ่งบอกถึงหน้าที่ที่สำคัญบางประการของสารดังกล่าวนี้ต่อการทำหน้าที่ของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการเดินทางของเซลล์อสุจิเข้ามา ถ้าสัตว์นั้นได้รับการผสมพันธุ์ เป็นที่ทราบดีว่า การปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์จะประสบความสำเร็จได้เป็นอย่างดี ต่อเมื่อเซลล์อสุจิต้องอยู่ท่ามกลางสิ่งแวดล้อม ที่สามารถเก็บรักษาการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์อสุจิภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ จนกระทั่งถึงช่วงเวลาของการตกไข่ (Rodriguez-Martinez et al., 2005) นอกจากนี้ หน้าที่หลักอย่างอื่นที่อาจพบบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจียังประกอบด้วย การควบคุมกลไกการคาปาซิเตชัน และการควบคุมการปลดปล่อยเซลล์อสุจิเพียงจำนวนหนึ่งให้เคลื่อนที่ขึ้นไปถึงบริเวณท่อนำไข่ส่วนแอมพูลลา ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิเพื่อป้องกันการเกิด polyspermic fertilization (Hunter and Rodriguez-Martinez, 2004) แน่นนอนว่า มีเซลล์อสุจิเพียงจำนวนเล็กน้อยเท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านอิสร์มัสไปได้ จนถึงส่วนแอมพูลลาในระยะตกไข่ เปรียบเทียบกับเซลล์อสุจิจำนวนมากที่ใช้ในการผสมพันธุ์ทั้งผสมเทียมและผสมโดยใช้พ่อพันธุ์ รายงานการวิจัยระบุว่า ของเหลวที่คัดหลั่งมาจากท่อนำไข่มีสารหรือปัจจัยที่ช่วยคัดเลือกเซลล์อสุจิโคให้เคลื่อนที่ต่อเนื่องในกระบวนการปฏิสนธิ (Parrish et al., 1989; Grippo et al., 1995) ยังมีรายงานอื่นๆ สนับสนุนอีกว่า สภาพการยึดติดกันของเซลล์อสุจิกับเซลล์เยื่อฝูวนำไข่ นั้น เป็นตำแหน่งที่มีการคัดเลือกเซลล์อสุจิ (sperm selection) เกิดขึ้น (Lefevbre et al., 1995) ผลการศึกษาค้นคว้า ระบุได้ถึงการศึกษาของไฮยาลูโรแนนว่า ไม่เพียงแต่จะพบอย่างชัดเจนในชั้น lamina propria ได้เยื่อเท่านั้น แต่ยังปรากฏพบได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะในร่องหรือหลืบ (crypt) ของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิจึงคือ UTJ และ อิสร์มัส อีกด้วย ข้อมูลที่ได้ดังกล่าวนี้ กล่าวได้ว่า ไฮยาลูโรแนนอาจมีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นสารที่คัดเลือกเซลล์อสุจิ (sperm selector) ตามธรรมชาติภายในท่อนำไข่ ซึ่งมีรายงานจำนวนหนึ่ง ระบุถึงประสิทธิภาพที่ดีของไฮยาลูโรแนน ซึ่งผสมในน้ำยาที่ใช้คัดเลือกเซลล์อสุจิในกระบวนการปฏิสนธิในอกร่างกาย (*in vitro* fertilization, IVF) (Huszar et al., 1990; Shamsuddin et al., 1993) นอกจากนี้ การปรากฏของไฮยาลูโรแนนในเซลล์เยื่อฝูวนำไข่กระป๋องปลัก อาจมีการสังเคราะห์มาจาก hyaluronan synthesizing enzymes (HAS) ภายในเซลล์เยื่อฝูวนำไข่ได้เอง เช่นเดียวกับท่อนำไข่สุกรที่มีการตรวจพบ HAS ภายในเซลล์เยื่อฝูวนำไข่สุกร (Tienthai et al., 2003a) ซึ่งการศึกษาหาการแสดงออกของเอ็นไซม์ HAS ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไฮยาลูโรแนน จึงจะทำให้ทราบถึงที่มาของไฮยาลูโรแนนภายในท่อนำไข่กระป๋องปลักได้เป็นอย่างดี

การศึกษาถึงการทำหน้าที่ของไฮยาลูโรแนนภายในท่อนำไข่กระป๋องปลักไทยอย่างสมบูรณ์แบบนั้น มีความจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับตัวรับของไฮยาลูโรแนน โดยไฮยาลูโรแนนจะการทำงานได้โดยผ่านตัวรับที่ปรากฏอยู่ที่ผนังของเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์ ซึ่งตัวรับดังกล่าวประกอบด้วย RHAMM, PH-20, HARE และ CD44 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญของไฮยาลูโรแนน (Alho and Underhill, 1989; Stojkovic et al., 2003) โดยพบว่า CD44 มีส่วนร่วมกับไฮยาลูโรแนนในการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์อย่างกว้างขวาง เช่น การส่งสัญญาณของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเซลล์หรือระหว่างเซลล์กับสารที่อยู่รอบๆ เซลล์ การเคลื่อนย้ายของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ รวมทั้ง กลไกในการเพิ่มขึ้นและ



การลดลงของไฮยาลูโรแนน (Underhill, 1992) พบว่าไฮยาลูโรแนนต้องเข้าจับกับ CD44 ซึ่งทำให้เกิดการ endocytosis ส่งผลให้มีการย่อยสลายไฮยาลูโรแนนโดยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) เพื่อการนำไฮยาลูโรแนนกลับเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ใหม่ (Culty et al., 1990) ในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้ศึกษาการปรากฏของ CD44 โดยผลการวิจัยพบว่า การปรากฏของ CD44 ภายในท่อนำไขว้ของกระป๋องปลั๊กซึ่งพบที่บริเวณ supranuclear domain ของเซลล์เยื่อหุ้ม มีลักษณะใกล้เคียงกับการปรากฏของ CD44 ในท่อนำไขว้ของสุกร (Tienthai et al., 2003b) และท่อนำไขว้ของโค (Bergqvist et al., 2005b) โดยผลดังกล่าวอาจจะนำไปสู่ถึงการ endocytosis ของไฮยาลูโรแนนโดยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเพื่อการนำไฮยาลูโรแนนกลับเข้าสู่ร่างกายและนำไปใช้ใหม่ ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น เนื่องจากบริเวณที่พบการติดสียวคือ supranuclear domain เป็นบริเวณที่พบออร์แกเนลล์คือ Golgi apparatus และเป็นบริเวณที่พบ lysosomes ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายภายในเซลล์ (Culty et al., 1990) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในกระป๋องปลั๊กครั้งนี้ มีความแปรปรวนของการติดสียวเป็นอย่างมาก โดยพบว่า ท่อนำไขว้ในระยะเดียวกันบางตัวอย่างมีการติดสียว ขณะที่บางตัวอย่างไม่พบการติดสียว โดยเฉพาะท่อนำไขว้ส่วนรอยต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไขว้ และอิสรัมัสในระยะฟอลลิคูลาร์ ซึ่งคาดหวังว่าจะพบการติดสียวอย่างชัดเจน แต่การติดสียวอยู่ในระดับอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับ การติดสียวที่เกิดขึ้นในท่อนำไขว้ส่วนแอมพูลลาและอินฟิมูบลัม รวมทั้ง ไม่พบการติดสียวในระดับเข้มเลยในท่อนำไขว้ทุกส่วนและทุกระยะ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ CD44 แอนติบอดีในระดับ 1:50 ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่า ชนิดของ CD44 แอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจยังไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้กับท่อนำไขว้กระป๋องปลั๊ก หรืออาจเป็นไปได้ว่า CD44 ที่ปรากฏภายในเซลล์เยื่อหุ้มของอวัยวะต่างๆ นั้นมีอยู่หลากหลาย isoform (Terpe et al., 2004) ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับตัวรับของไฮยาลูโรแนนภายในท่อนำไขว้กระป๋องปลั๊กนั้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนชนิดของ CD44 แอนติบอดีให้เหมาะสมกับชนิดของสัตว์และ isoform รวมทั้งจะต้องศึกษาถึงตัวรับชนิดอื่นๆ ของไฮยาลูโรแนนในอนาคตต่อไป

สำหรับการปรากฏของไกลโคสโอมิโนไกลแคนชนิดที่มีซัลเฟตในการศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจการ แสดงออกของ “เฮพารินซัลเฟตโปรตีโอไกลแคนส์ หรือ syndecans” ซึ่งประกอบด้วย syndecan-1 และ syndecan-2 ผลการศึกษาพบว่า syndecans ทั้งสองชนิดจะปรากฏตลอดแนวของเยื่อหุ้มท่อนำไขว้ทุกส่วน ของกระป๋องปลั๊กไทย โดยไม่พบความแตกต่างของความเข้มในการติดสียวในการปรากฏของ syndecan-1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลาง ขณะที่การปรากฏของ syndecan-2 ซึ่งตรวจพบได้ตลอดแนวความยาวของท่อนำไขว้เช่นเดียวกัน แต่กลับพบว่า ความเข้มในการติดสียวจะเห็นได้ชัดเจนมากในระยะฟอลลิคูลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูเทียลช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด การศึกษาในครั้งนี้เกี่ยวกับการปรากฏของ syndecan-1 และ syndecan-2 นี้ มีทั้งความสอดคล้องและแตกต่างกับการศึกษาในท่อนำไขว้ของโค (Bergqvist and Rodriguez-Martinez, 2006) กล่าวคือ การปรากฏของ syndecan-1 ติดสียวตลอดแนวของเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไขว้ ซึ่งพบได้ทั้งในไซโตพลาสซึมและบริเวณขอบด้านบนของผิวเซลล์ โดยเฉพาะในส่วน UTJ และอิสรัมัส โดยไม่พบความแตกต่างของระดับความเข้มในการติดสียวระหว่างระยะของวงรอบการเป็นสัด ขณะที่การปรากฏของ syndecan-2 ในท่อนำไขว้กระป๋องปลั๊กของการศึกษานี้มีความแตกต่างโดยพบเด่นชัดในท่อนำไขว้ทุกส่วน โดยเฉพาะในส่วน UTJ และอิสรัมัส และมีความแตกต่างระหว่างระยะของวงรอบการเป็นสัด โดยความแตกต่างนี้ไม่ปรากฏพบในท่อนำไขว้ของโค ความแตกต่างเบื้องต้นของการศึกษานี้ในท่อนำไขว้กระป๋องปลั๊ก และการศึกษาที่ผ่านมาในท่อนำไขว้คือแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา โดยการวิจัยครั้งนี้ใช้ syndecans ชนิด monoclonal mouse anti-human antibody ทั้ง syndecan-1 และ syndecan-2 ในขณะที่ การศึกษาวิจัยในโคโดย Bergqvist และ Rodriguez-Martinez (2006) ใช้ rabbit anti-human และ rabbit anti-rat polyclonal antibody ดังนั้น ผลของการศึกษาในท่อนำไขว้

กระบือปลักครั้งนี้ จึงมีความแตกต่างกัน และมีความน่าเชื่อถือมากกว่าเนื่องจากการใช้ polyclonal antibody จะให้ผลในการติดสีกับแอนติเจนชนิดที่ไม่จำเพาะได้

เมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นในการปรากฏของ syndecan-1 ในเยื่อผิวของท่อหน้าไขกระดูก ซึ่งไม่พบความแตกต่างในแต่ละระยะของวงจรการเป็นสัตว์ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏของ syndecan-1 ไม่ได้ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของฮอร์โมนเพศเมียที่ผลิตมาจากรังไข่ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดช่วงของวงจรการเป็นสัตว์ สอดคล้องกับการศึกษาการปรากฏของ syndecans-1 ในท่อทางเดินของระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์ ที่มีความผันแปรในความเข้มข้นของการติดสีที่ไม่แน่นอน มีรายงานการวิจัยถึงระดับการแสดงออกของ syndecan-1 ในเยื่อผิวของปากมดลูกมีระดับของความเข้มข้นที่ไม่แตกต่างกันระหว่างรอบเดือน (Inki et al., 1994) ขณะที่การปรากฏที่พบในเยื่อช่องคลอดที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาของรอบเดือน (Inki, 1997) ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ระบุว่า การปรากฏของ syndecan-1 ที่เกิดขึ้นในระบบสืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของ growth factors มากกว่าอิทธิพลในการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเพศเมีย (Inki, 1997; Subramanian et al., 1997) และเป็นไปได้ว่าปริมาณของ growth factors ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีความแตกต่างกัน โดยท่อหน้าไขกระดูกนั้นจะมีปริมาณ growth factors ที่จะไปกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ syndecan-1 เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับท่อทางเดินสืบพันธุ์ส่วนอื่นๆ ซึ่งชนิดของ growth factors ที่มีความสัมพันธ์กับ syndecan-1 ในท่อหน้าไขกระดูกจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต ในทางตรงกันข้าม การปรากฏของ syndecan-2 ซึ่งพบได้ชัดเจนบริเวณ apical part ของเซลล์เยื่อ โดยกระจายตลอดแนวของเยื่อผิวท่อหน้าไขกระดูก โดยเฉพาะในส่วนที่ทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิ และมีความเข้มข้นที่ชัดเจนมากในระยะฟอลลิคูลาร์ ระบุถึงอิทธิพลของฮอร์โมนเพศเมียคือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ syndecan-2 อย่างแน่นอน สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาเร็วๆ นี้ ของ Kousidou และคณะ (2008) ที่ระบุว่าเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ syndecan-2 ภายในเนื้อเยื่อของต่อมน้ำนมได้ ถึงแม้ว่า โครงสร้างเคมีที่เรียกว่า ectodomain ของ syndecan-1 และ syndecan-2 จะมีความแตกต่างกันและมีรูปแบบในการปรากฏในท่อหน้าไขกระดูกที่แตกต่างกัน แต่การปรากฏของ syndecans ทั้งสองชนิดในท่อหน้าไขกระดูกบ่งบอกถึงหน้าที่ที่สำคัญบางประการที่เกี่ยวข้องกับเซลล์สืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ขณะที่มีการเคลื่อนที่เพียงชั่วคราวภายในท่อหน้าไข ดังที่กล่าวแล้วว่า ซินติแคนส์หรือเฮพารันซัลเฟตโปรติโอไกลแคนส์ คือไกลโคสอุมิโนไกลโคแคนส์ชนิดที่มีซัลเฟตซึ่งไปจับกับโปรตีน (Kjellen and Lindahl, 1991) โดยพบว่าเฮพารันซัลเฟตและซัลเฟตไกลโคสอุมิโนไกลโคแคนส์นั้น มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการคาปาซิเตชันของเซลล์อสุจิในโค (Parrish et al., 1989; Bergqvist et al., 2007) นอกจากนี้ Talevi และ Gualtieri (2001) ระบุว่าความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นของซัลเฟตไกลโคสอุมิโนไกลโคแคนส์มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยเซลล์อสุจิ ให้หลุดออกจากการยึดเกาะจากเยื่อของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ และตามที่มีการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของเฮพารันซัลเฟตจากของเหลวภายในท่อหน้าไขกระดูกต่างๆ ของโค พบว่า ของเหลวที่ผลิตมาจากท่อหน้าไขกระดูกมีเฮพารันซัลเฟต เป็นส่วนประกอบอยู่ในอัตราความเข้มข้นที่สูงอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะในระยะเอสตรัส เมื่อเปรียบเทียบกับระยะไดเอสตรัส (Bergqvist and Rodriguez-Martinez, 2006) จากข้อมูลดังกล่าวเบื้องต้นนี้ บ่งชี้ถึงการทำหน้าที่ของเฮพารันซัลเฟตในการเหนี่ยวนำกระบวนการคาปาซิเตชัน รวมทั้งการปลดปล่อยเซลล์อสุจิให้หลุดออกจากการยึดเกาะบนผิวของเซลล์เยื่อท่อหน้าไข ในส่วนที่ทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิที่สามารถเกิดขึ้นได้ในท่อหน้าไขกระดูก อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจหาอัตราความเข้มข้นของทั้งไกลโคสอุมิโนไกลโคแคนส์ชนิดที่ไม่มีซัลเฟต (ไฮยาลูโรแนน) และชนิดที่มีซัลเฟต (เช่น เฮพารันซัลเฟต) ในของเหลวที่เก็บได้จากท่อหน้าไขกระดูกต่อไป

เนื่องจากเซลล์อสุจิและตัวอ่อนระยะแรก จะประกอบไปด้วยโปรตีนแปลกปลอมต่อระบบภูมิคุ้มกันของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และเป็นไปได้ว่าการปรากฏของสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวนี้จะไปกระตุ้นทำให้ท่อนำไข่มีกิลไกในการตอบสนองเกิดขึ้นเช่นเดียวกับที่เกิดภายในมดลูก เช่นในกรณีที่มีการเคลื่อนที่เข้าไปของเซลล์อสุจิภายหลังจากการหลั่งน้ำเชื้อ เซลล์อสุจิจะไปกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear leukocytes เคลื่อนที่เข้ามาที่เยื่อบุผิว ซึ่งพบได้ในมดลูกสุกร (Rodriguez-Martinez et al., 1990) และมดลูกม้า (Katila, 2001) อย่างไรก็ตาม พบว่า การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวในมดลูกกลับไม่พบในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิในท่อนำไข่สุกร (Rodriguez-Martinez et al., 1990) และโค (Hunter, 1995) ข้อมูลที่ได้นี้ สนับสนุนว่าท่อนำไข่อาจมีกิลไกพิเศษในการเลือกกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นไปได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของระบบ Fas-FasL อาจทำให้เกิดกลไกดังกล่าวนี้ โดยกลไกของระบบ Fas-FasL จะไปกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด cytotoxic T lymphocytes และ Natural killer (NK) cells ภายในท่อนำไข่ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดจะมีตัวรับ Fas ปรากฏอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์อย่างชัดเจน เพื่อไม่ให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้เข้ามาเก็บกินหรือทำลายเซลล์อสุจิหรือตัวอ่อนระยะแรก การแสดงออกของระบบ Fas-FasL ภายในท่อนำไข่กระป๋องปลักในการศึกษานี้ จัดเป็นข้อมูลใหม่ที่สำคัญ ที่จะทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานภายในท่อนำไข่ในระหว่างการปฏิสนธิได้เป็นอย่างดี

ผลการศึกษาด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีในการวิจัยครั้งนี้ ระบุว่าโปรตีน Fas และ FasL ปรากฏในเซลล์เยื่อบุของท่อนำไข่กระป๋องปลักไทย โดยความเข้มของโปรตีน Fas ปรากฏให้เห็นได้ชัดเจนในท่อนำไข่ทุกส่วน และไม่พบความแตกต่างในระดับความเข้มระหว่างส่วนต่างๆ ของท่อนำไข่ และระยะของวงรอบการเป็นสัด ขณะที่ การปรากฏของโปรตีน FasL ปรากฏได้อย่างชัดเจนมากในส่วนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจินั้นคือ UTJ และท่อนำไข่ส่วนอิสร์มัส โดยเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์ซึ่งเป็นช่วงก่อนการตกไข่ (pre-ovulatory stage) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบการปรากฏของ FasL ตลอดแนวของท่อนำไข่โค ในระยะเอสตรัส (estrous stage) ของวงรอบการเป็นสัด (Bergqvist et al., 2005c) ที่สำคัญ การปรากฏของโปรตีน FasL สัมพันธ์กับการแสดงออกของ FasL mRNA โดยใช้วิธี RT-PCR โดยการศึกษาพบการแสดงออกของ FasL mRNA ในท่อนำไข่ทุกส่วน แต่สัดส่วนความเข้มที่สูงขึ้นอย่างเด่นชัดจะพบโดยเฉพาะในส่วนที่ทำหน้าที่กักเก็บเซลล์อสุจิในระยะฟอลลิคูลาร์ ซึ่งเป็นระยะที่มีการสะสมของเซลล์อสุจิถ้ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น ดังนั้น การปรากฏของ FasL ในท่อนำไข่ ทั้งวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และวิธี RT-PCR ระบุได้เป็นอย่างดีว่า นอกจากการทำหน้าที่ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเลือกกำจัดเซลล์เม็ดเลือดขาว cytotoxic T lymphocytes และ NK cells แล้ว บทบาทของระบบ Fas-FasL อาจมีส่วนในการกระตุ้นให้มีการเสื่อมตาย (apoptosis) ของเซลล์เยื่อบุผิว ที่มีการผลัดเปลี่ยนสัดส่วนระหว่างเซลล์คัตหลังและเซลล์ที่มีชีวิตให้เหมาะสมสำหรับการทำหน้าที่จำเพาะ ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนตลอดวงรอบการเป็นสัด อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของระบบ Fas-FasL และการเสื่อมตายของเซลล์เยื่อบุผิวโดยใช้วิธี TUNEL analysis (ผลการศึกษาเบื้องต้นที่ยังไม่ได้รายงานผล) ไม่พบความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL ในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเทียลช่วงกลางในการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ได้พบในมดลูกของมนุษย์ ซึ่งระบุว่า การปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL ตลอดวงรอบของการมีประจำเดือน (Yamashita et al., 1999) และท่อนำไข่ของโค (Bergqvist et al., 2005c) ซึ่งปรากฏเด่นชัดมากบริเวณเซลล์เยื่อบุ แต่ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เยื่อบุ จะพบได้น้อยมาก งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ภายในต่อมำน้ำเหลืองของมนุษย์พบการแสดงออกของโปรตีน Fas (Xerri et al., 1997) และ FasL (Verbeke et al., 1999) สอดคล้องกับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ในต่อมำน้ำเหลืองที่ใช้เป็นสไลด์

ควบคุมบวก การแสดงออกของโปรตีน FasL ในท่อนำไข่กระปือปลัก มีลักษณะที่สำคัญคือ ตำแหน่งของการติดสีจะพบบริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อ (apical part of epithelial cells) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาภายในมดลูกและท่อนำไข่ของหนู ที่พบการแสดงออกในลักษณะคล้าย granules บริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อ บุกผิว 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 เมื่อปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน และสามารถเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการเสื่อมตายได้ (Andreola et al., 2002) พบว่านิวโทรฟิลและแมโครฟาจต่างมีการแสดงออกของโปรตีน FasL ซึ่งมีความไวต่อการเกิดการเสื่อมตายของเซลล์ที่เกิดจากการจับกับโปรตีน FasL โดยเฉพาะอย่างยิ่งนิวโทรฟิล จะมีความไวรับมากเป็นพิเศษ (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) ระบุได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีกลไกการควบคุมจำนวนด้วยตนเองโดยอาศัยการทำงานของระบบ Fas-FasL นอกจากนี้ พบว่า T-cell ที่มีการแสดงออกของ FasL จะทำหน้าที่กำจัดแมโครฟาจบางส่วนที่อยู่ภายในผนังเยื่อช่องท้องที่มีการแสดงออกของโปรตีน Fas (Ashany et al., 1995) และการควบคุมเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำงานของระบบ Fas-FasL ของ T-cell สามารถพบได้ใน B-cell ด้วยเช่นกัน โดยการส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีน Fas ที่อยู่บน B-cell ภายในไขกระดูก ต่อมมน้ำเหลืองและม้าม (Ju et al., 1994)

ผลการศึกษาในส่วนของการปรากฏของโปรตีน FasL และการแสดงออกของ FasL mRNA ที่ปรากฏเด่นชัดในระยะฟอลลิคูลาร์นั้น อาจมีความเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของฮอร์โมนจากรังไข่ เป็นที่ทราบดีว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนทำหน้าที่หลักในระยะฟอลลิคูลาร์ และมีการศึกษาพบว่า เอสโตรเจนส่งผลกระทบต่อปรากฏของโปรตีน FasL โดยเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้ stromal cells และ glandular cells ทำให้มีการปรากฏของ FasL มากขึ้น ในขณะที่โปรเจสเตอโรนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน FasL ได้เช่นกัน แต่จะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อยกว่าเอสโตรเจน (Selam et al., 2001) มีการศึกษาในเซลล์พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนกระตุ้นให้โมโนไซต์ให้มีการปรากฏของโปรตีน FasL และมีการแสดงออกของ FasL mRNA มากขึ้น (Mor et al., 2003) รวมทั้งใน osteoblast (Krum et al., 2008), human coronary artery endothelial cells (Seli et al., 2006) และเซลล์ในเนื้อเยื่อของเต้านม (Mor et al., 2000) นอกจากนี้ ในเซลล์เยื่อของรังไข่ (ovarian epithelial cells) พบการปรากฏของโปรตีน FasL ในระยะที่เป็นสัดหรือเอสโตรส มากกว่าในระยะเมทเอสโตรส และค่อยๆ ลดลงในระยะไดเอสโตรส (Sapi et al., 2002) ดังนั้น การปรากฏของโปรตีน FasL และการแสดงออกของ FasL mRNA ที่มากขึ้น จึงอาจเกิดขึ้นจากการอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลระหว่างการเสื่อมตายของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Soong et al., 2002; Havelka et al., 2005) สอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาที่ผ่านมาในรกและมดลูกพบว่า การทำงานของระบบ Fas-FasL มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของตัวอ่อนในช่วงตั้งท้อง ซึ่งทำหน้าที่ปกป้องตัวอ่อนโดยการทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อช่วยให้การตั้งท้องมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้น (Hunt et al., 1997; Kauma et al., 1999) การอธิบายดังกล่าวข้างต้นนี้สัมพันธ์กับการศึกษาที่เกี่ยวกับการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวภายใน endometrium ของมดลูกมีจำนวนลดลงในช่วงแรกของการตั้งท้อง (Pace et al., 1991)

ในขณะที่การปรากฏของ FasL ในช่วงที่ไม่มีการตั้งท้องพบว่า มีการเสื่อมตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นทันทีที่มีการแทรกซึมเข้าสู่ภายในเนื้อเยื่อมดลูก (Imarai et al., 2005) ดังนั้น การแสดงออกของโปรตีน FasL ที่เกิดขึ้นในท่อนำไข่ อาจเกี่ยวข้องกับการทำงานในร่างกายแบบ immune privilege โดยผ่านทางการทำงานของระบบ Fas-FasL เพื่อช่วยทำหน้าที่ในการจำกัดขอบเขตความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำให้เกิดการเสื่อมตายของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน (Ferguson et al., 2002) การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสร์มัส พบการแสดงออกของโปรตีน FasL และ FasL mRNA อย่างเด่นชัดในระยะฟอลลิคูลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูทีอัลช่วงกลางและเปรียบเทียบกับแอมพูลลาและอินฟินิติบูลิม จึงบ่งบอกได้ว่า ระบบ Fas-FasL มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำหน้าที่เป็น immune privilege organ ของบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ นั่นคือในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิคือ UTJ และอิสร์มัส โดยการทำหน้าที่ดังกล่าวจะเกิดขึ้นเฉพาะในระยะฟอลลิคูลาร์เท่านั้น

นอกจากนี้ ยังมีประเด็นที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การปรากฏของ Fas ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับที่สามารถพบได้ในเซลล์ต่างๆ ไป จึงสามารถปรากฏได้โดยไม่จำเพาะเจาะจง ขณะที่การปรากฏของ FasL ต้องอาศัยสภาพจำเพาะมากกว่าและจะปรากฏในรูปแบบที่จำกัดภายในเซลล์บางชนิดเท่านั้น เช่น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และที่สำคัญคือเซลล์ภายในอวัยวะที่มีการทำงานแบบ immune privilege (Lettau et al., 2008) เช่น รก (Kauma et al., 1999) กระจกตา (Stuart et al., 1997) และอวัยวะ (Lee et al., 1997) การปรากฏของ FasL ดังกล่าว เป็นการแสดงออกเพื่อส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ดังนั้น การปรากฏของโปรตีน FasL ที่เด่นชัดในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสร์มัสของกระบี้อปลักในครั้งนี้ อาจเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของระบบ Fas-FasL เพื่อช่วยสนับสนุนการอยู่รอดของเซลล์อสุจิในช่วงที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิเกิดขึ้น เป็นที่ทราบดีว่า ท่อนำไข่เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สำคัญมากมาย เช่น การเดินทางของเซลล์อสุจิ (Suarez and Pacey, 2006) การคาปาซิเตชัน (Rodriguez-Martinez, 2007) การกักเก็บเซลล์อสุจิ (Suarez, 2002) จนกระทั่งปฏิสนธิกับโอโอไซต์ แต่การที่เซลล์อสุจิซึ่งบรรจุโปรตีนแปลกล้อมจากภายนอก (โดยเฉพาะจาก seminal plasma) ได้รูกล้ำเข้ามาภายในท่อนำไข่เดินทางเข้ามาสัมผัสกับเซลล์อสุจิทำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้น มีการศึกษาพบว่าเซลล์อสุจิที่เดินทางเข้ามาสัมผัสกับเซลล์อสุจิภายในมดลูก โดยกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามาทำลายเซลล์อสุจิ (Katila, 2001) การศึกษาภายในชั้นเยื่อของมดลูกสุกรเกี่ยวกับการกระจายตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัตว์ โดยพบว่า ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ มีปริมาณมากที่สุดในระยะโปรเอสตราสและระยะเอสตราส (Kaeket et al., 2002) และลิมโฟไซต์โดยเฉพาะ T-cell มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากที่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น (Tunon et al., 1999) โดยเซลล์ทั้งหมดนี้ มีการแสดงออกของโปรตีน Fas อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Iwai et al., 1994) ในทางตรงกันข้าม การศึกษาภายในท่อนำไข่ส่วน UTJ และอิสร์มัส ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการกักเก็บเซลล์อสุจิลบพบว่า การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวเกิดขึ้นน้อยมากในท่อนำไข่ทั้งสองส่วนนี้ โดยไม่พบปรากฏของนิวโทรฟิลภายใน UTJ และอิสร์มัสหลังการผสมพันธุ์ (Rodriguez-Martinez et al., 1990) นอกจากนี้ ยังพบว่า เซลล์อสุจิที่รอดพ้นจากการถูกเก็บกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในมดลูก มีความเสียหายเกิดขึ้นมากที่บริเวณ plasma membrane ในขณะที่เซลล์อสุจิส่วนใหญ่ภายใน UTJ อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (Rodriguez-Martinez et al., 1990)

สอดคล้องกับการศึกษาในท่อนำไขของสุกรในช่วงหลังการตกไข่หลังการผสมพันธุ์ ที่ไม่พบการปรากฏของนิวโทรฟิลเลยในเนื้อเยื่อทุกชั้นของท่อนำไขส่วนอิสรัมัส (Jiwakanon et al., 2006) ขณะที่ภายในท่อนำไขส่วนแอมพูลลาและอินฟันติบูลัมในระยะโปรเอสตรัสและเอสตรัส พบจำนวนนิวโทรฟิลและลิมโฟไซต์เป็นจำนวนมาก (Jiwakanon et al., 2005) แสดงให้เห็นว่าภายในท่อนำไขส่วน UTJ ซึ่งอยู่ติดกับท่อนำไขส่วนอิสรัมัส อาจมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างจากมดลูกและท่อนำไขส่วนแอมพูลลาและอินฟันติบูลัม ซึ่งอาจใช้โปรตีน FasL ในการควบคุมปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดขาว คล้ายกับการทำงานที่พบในลำไส้ส่วน colon ที่มีการปรากฏของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน FasL เพื่อเหนี่ยวนำให้ T-cell เกิดการเสื่อมตายและสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (Zhang et al., 2005) ดังนั้น การทำงานของโปรตีน FasL ภายในท่อนำไขจะทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อช่วยเพิ่มโอกาสในการปฏิสนธิ นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับการกักเก็บเซลล์อสุจิพบว่า เซลล์อสุจิจะเข้าไปยึดติดกับเยื่อภายในท่อนำไขส่วน UTJ และอิสรัมัส ในช่วงก่อนการตกไข่โดยเฉพาะบริเวณหลังของ UTJ และอิสรัมัส (Suarez, 1987) ซึ่งการแสดงออกโปรตีน FasL บริเวณด้านบนของเซลล์เยื่อ อาจเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อให้เซลล์อสุจิสามารถเข้ามายึดจับกับเยื่อของท่อนำไขได้

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า โปรตีน Fas เป็นโปรตีนตัวรับที่มีอยู่ตลอดเวลาในการส่งสัญญาณให้เกิดการเสื่อมตายในบริเวณที่มีการแสดงออก เพื่อการรักษาสมดุลระหว่างการเสื่อมตายของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในช่วงของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นในปีกมดลูกแต่อาจไม่มีการแสดงออกชัดเจนนักภายในท่อนำไข สำหรับโปรตีน FasL จะมีความสำคัญมากกว่า เนื่องจากจะมีการแสดงออกที่จำเพาะเจาะจงกว่าทั้งปริมาณและช่วงเวลาปรากฏในวงรอบการเป็นสัด ซึ่งแตกต่างกันระหว่างระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลช่วงกลาง โดยเฉพาะในท่อนำไขกระป๋องปลักในบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ ซึ่งเป็นการทำหน้าที่ภายในร่างกายแบบ immune privilege จึงเป็นไปได้ว่า การปรากฏของโปรตีน FasL มีส่วนทำหน้าที่ในการช่วยเหลือไม่ให้เซลล์อสุจิถูกทำลายและมีชีวิตรอด ก่อนที่เซลล์อสุจิจะเคลื่อนที่ไปยังท่อนำไขบริเวณที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น และสนับสนุนการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับกลไกดังกล่าว อย่างไรก็ตาม มีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อค้นหาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของระบบ Fas-FasL ที่มีต่อการเสื่อมตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวภายในท่อนำไข ที่อาจมีผลต่อความสำเร็จของกลไกการกักเก็บเซลล์อสุจิในอนาคตต่อไป

#### จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า

-ไฮยาลูโรแนน พบได้ในเยื่อผิวของท่อนำไขกระป๋องปลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วน UTJ และ อิสรัมัส ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณกักเก็บเซลล์อสุจิ (sperm reservoir) ในระยะฟอลลิคูลาร์ ระบุถึงการทำหน้าที่ของไฮยาลูโรแนนในการรักษาการมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิในช่วงก่อนการตกไข่ รวมทั้งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการคาปาซิเตชันและการปลดปล่อยของเซลล์อสุจิในขณะที่มีการตกไข่เกิดขึ้น

-ซัลเฟตไกลโคสอะมิโนไกลแคนส์ในการศึกษานี้คือ syndecan-1 และ syndecan-2 สามารถตรวจพบได้ในท่อนำไขกระป๋องปลักทุกส่วนเช่นเดียวกับไฮยาลูโรแนน แต่มีข้อสังเกตว่า เฉพาะ syndecan-2 เท่านั้นที่พบได้เด่นชัดในระยะฟอลลิคูลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับระยะลูทีลช่วงกลาง ระบุว่า syndecan-2 อาจเป็น

ปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการคาปาซิเตชันและการปลดปล่อยของเซลล์อสุจิเช่นกัน แต่ syndecan-1 อาจมีบทบาทอย่างอื่นที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของท่อนำไขกระดูก

-พบการปรากฏของ CD44 ซึ่งเป็นตัวรับชนิดหนึ่งของไฮยาลูโรแนน ระบุได้ว่าไฮยาลูโรแนนอาจมีการจับกับ CD44 เพื่อให้มีปฏิสัมพันธ์ในการทำหน้าที่ต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไขกระดูก โดยเฉพาะการทำหน้าที่ภายในบริเวณที่กักเก็บเซลล์อสุจิ แต่เนื่องจากการปรากฏของ CD44 มีความแปรปรวนเกิดขึ้น จึงจำเป็นต้องมีศึกษาต่อไป

-พบการปรากฏของโปรตีน Fas และ FasL โดยวิธีอิมมูโนโพรบและแสดงออกของ FasL mRNA โดยวิธี RT-PCR ในเยื่อหุ้มท่อนำไขกระดูกทุกส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในท่อนำไขที่ทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิในระยะฟอลลิคูลาร์ การค้นพบการปรากฏของ Fas-FasL ในท่อนำไขกระดูก ระบุได้ว่าท่อนำไขกระดูกอาจจัดเป็นอวัยวะที่อยู่ในกลุ่ม immune privileged organ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลาก่อนการตกไข่ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อสุจิเดินทางมาสะสมรวมกันกัน เพื่อรอการเคลื่อนที่ขึ้นไปปฏิสนธิหลังมีการตกไข่

### ข้อเสนอแนะที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

-การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ทั้งชนิดที่มีซัลเฟตและไม่มีซัลเฟต มีความจำเป็นที่จะต้องเก็บของเหลวที่หลั่งออกมาอย่างต่อเนื่องภายในท่อนำไขกระดูกของกระป๋องปัสสาวะในแต่ละช่วงของวงจรการเป็นสัด เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่อาจมีความแตกต่างกันตลอดช่วงของวงจรการเป็นสัด และเป็นการสนับสนุนยืนยันถึงการสร้างสารไกลโคสโอมิโนไกลแคนส์ภายในท่อนำไขที่อาจเกิดขึ้นจากเซลล์เยื่อหุ้ม

-เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจพบการปรากฏของไฮยาลูโรแนนอย่างชัดเจนในท่อนำไขที่ทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บเซลล์อสุจิ ดังนั้น เพื่อเป็นการพิสูจน์ถึงการทำงานของเซลล์เยื่อหุ้มในการสร้างหรือผลิตสารดังกล่าว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสอบหาเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารดังกล่าว โดยเฉพาะในส่วนของไฮยาลูโรแนนซึ่งมีเอ็นไซม์ที่ชื่อว่า hyaluronan synthase-1, -2 และ -3 (HAS-1, HAS-2, HAS-3) โดยการวิเคราะห์ตรวจหา HAS-1, HAS-2, HAS-3 mRNA ด้วยวิธี RT-PCR รวมทั้ง การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวรับที่จำเพาะอื่นๆ ของไฮยาลูโรแนน เช่น RHAMM และ PH-20 เป็นต้น

-เพื่อที่จะทำให้การศึกษาถึงระบบการทำงานของ Fas-FasL สมบูรณ์แบบมากขึ้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบการเสื่อมตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไขส่วนต่างๆ ของกระป๋องปัสสาวะโดยเปรียบเทียบในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีล เพื่อที่จะได้ทราบถึงชนิดของเซลล์ที่เกิดการเสื่อมตาย และอัตราการเสื่อมตายที่เกิดขึ้นภายในท่อนำไขกระดูก

## เอกสารอ้างอิง

- Abe, H. and Oikawa, T. 1993. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. *Anat. Rec.* 235(3): 399-410.
- 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.
- Alho, A.M. and Underhill, C.B. 1989. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell Biol.* 108(4): 1557-1565.
- 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(3): 214-218.
- 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.
- Arck, P.C., Gilhar, A., Bienenstock, J. and Paus, R. 2008. The alchemy of immune privilege explored from a neuroimmunological perspective. *Pharmacology* 8(4): 480-489.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 11225-11229.
- Ball, G.D., Bellin, M.E., Ax, R.L. and First, N.L. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell Endocrinol.* 28(1): 113-122.
- Behzad, F., Seif, M.W., Campbell, S. and Aplin, J.D. 1994. Expression of two isoforms of CD44 in human endometrium. *Biol. Reprod.* 51(4): 739-747.
- Bergqvist, A.S., Yokoo, M., Heldin, P., Frenidin, J., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2005a. Hyaluronan and its binding proteins in the epithelium and intraluminal fluid of the bovine oviduct. *Zygote* 12(3): 207-218.
- Bergqvist, A.S., Yokoo, M., Bage, R., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2005b. Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductal epithelium. *J. Reprod. Dev.* 51(4): 445-453.
- Bergqvist, A.S., Killian, G., Erikson, D., Hoshino, Y., Bage, R., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2005c. Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 86(1-2): 71-88.
- Bergqvist, A.S. and Rodriguez-Martinez H. 2006. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 93(1-2): 46-60.
- Bergqvist, A.S., Ballester, J., Johannisson, A., Lundeheim, N. and Rodriguez-Martinez, H. 2007. Heparin and dermatan sulphate induce capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa measured by merocyanine-540. *Zygote* 15(3): 225-232.
- Brackett, B.G., Oh, Y.K., Evans, J.F. and Donawick, W.J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol. Reprod.* 23(1): 189-205.



- Bureau, M., Bailey, J.L. and Sirard, M.A. 2000. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote* 8(2): 139-144.
- Cao, L.C., Boeve, E.R., de Bruijn, W.C., Kok, D.J., de Water, R., Deng, G. and Schroder, F.H. 1997. Glycosaminoglycans and semisynthetic sulfated polysaccharides: an overview of their potential application in treatment of patients with urolithiasis. *Urology* 50(2): 173-183.
- Cardenas, H., Corvalan, L. and Imarai, M. 1998. Is there a mucosal immune system associated with the mammalian oviduct? *Biol. Res.* 31(4): 329-338.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4): 505-512.
- Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Sikorski, E., Butcher, E.C., Underhill, C. 1990. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111(6): 2765-2774.
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations), FAOSTAT Agriculture Data, 2003. <http://www.fao.org/dad.it>.
- Fazeli, A., Duncan, A.E., Watson, P.F. and Holt, W.V. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.* 60(4): 879-886.
- Ferguson, A.T., Green, D.R. and Griffith, T.S. 2002. Cell death and immune privilege. *Intern. Rev. Immunol.* 21: 153-172.
- Flechon, J.E. and Hunter, R.H.F. 1981. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 13(1): 127-139.
- 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: 2692-2700.
- Furnus, C.C., de Matos, D.G. and Martínez, A.G. 1998. Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 49(8): 1489-1499.
- Furnus, C.C., Valcarcel, A., Dulout, F.N. and Errecalde, A.L. 2003. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 60(9): 1633-1644.
- Gallagher, J.T., Lyon, M., Steward, W.P. 1986. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.* 236(2): 313-325.
- Gardner, D.K., Rodriguez-Martinez, H. and Lane, M. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* 14(10): 2575-2580.
- Gasparini, B. 2002. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57(1): 237-256.
- Goldberg, J.M., Miller, F.A., Friedman, C.I., Dodds, W.G. and Kims, M.H. 1991. Effect of baseline

- ovarian cysts on *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Fertil. Steril.* 55(2): 319-323.
- Green, D.R. and Ferguson, T.A. 2001. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2(12): 917-924.
- Grippo, A.A., Way, A.L. and Killian, G.J. 1995. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 105(1): 57-64.
- 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.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M. and Linhardt, R.J. 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioassays* 20(2): 156-167.
- 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 (CD95) 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(9): 4122-4128.
- Hunter, R.H.F. and Leglise, P.C. 1971. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *J. Reprod. Fertil.* 24(2): 233-246.
- 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(5): 641-656.
- Hunter, R.H.F. 1995. Significance of the epithelial crypts at the bovine utero-tubal junction in the pre-ovulatory phase of sperm regulation. *Acta. Vet. Scand.* 36(4): 413-421.
- Hunter, R.H.F., Petersen, H.H. and Greve, T. 1999. Ovarian follicular fluid, progesterone and  $Ca^{2+}$  ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir. *Mol. Reprod. Dev.* 54(3): 283-291.
- Hunter, R.H.F. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol. Reprod. Dev.* 67(2): 243-250.
- Huszar, G., Willetts, M. and Corrales, M. 1990. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil. Steril.* 54(6): 1127-1134.
- Inki, P. 1994. Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 3(4): 299-305.
- Inki, P., Stenback, F., Grenman, F. and Jalkanen, M. 1997. Immunohistochemical localization of syndecan-1 in normal and pathological human uterine cervix. *J. Pathol.* 172(4): 349-355.
- 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.
- 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(4): 897-904.
- 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.
- Jansen, R.P. 1978. Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science* 201(4353): 349-351.
- 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.
- Johannisson, M., Tienthai, P. and Rodriguez-Martinez, H., 2000. Histochemistry and ultrastructure of the intraluminal mucus in the sperm reservoir of the pig oviduct. *J. Reprod. Dev.* 46: 183-192.
- 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.
- 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. Endocrinol. Metab.* 84: 2188-2194.
- Kawakami, E., Arai, T., Oishi, T., Hori, T. and Tsutsui, T. 2000. Induction of dog sperm capacitation by glycosaminoglycans and glycosaminoglycan amounts of oviductal and uterine fluids in bitches. *J. Vet. Med. Sci.* 62(1): 65-68.
- Kim, S.H., Kim, C.H., Suh, C.S., Moon, S.Y., Lee, J.Y. and Chang, Y.S. 1996 Simultaneous program of natural-cycle *in vitro* fertilization and cryopreserved-thawed embryo transfer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13(9) 716-721.
- Kittiyant, Y., Saikhun, J., Chaisalee, B., White, K.L. and Pavasuthipaisit, K. 2001. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus Bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 3(3): 97-104.
- Kjellen, L. and Lindahl, U. 1991. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.*

60: 443-475.

- Koji, T., Hishikawa, Y., Ando, H., Nakanishi, Y. and Kobayashi, N. 2001. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biol. Reprod.* 64(3): 946-954.
- Kousidou, O.Ch., Berdiaki, A., Kletsas, D., Zafiroopoulos, A., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N. and Karamanos, N.K. 2008. Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* 2(3): 223-232.
- 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.
- Kumaresan, A., Ansari, M.R., Garg, A. and Kataria, M. 2006. Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 93(3-4): 246-257.
- Larsson, B. and Larsson, K. 1985. Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. *Acta. Vet. Scand.* 26(3): 385-395.
- Laurent, T.C. and Fraser, J.R. 1992. Hyaluronan. *FASEB.* 6(7): 2397-2404.
- Lee, C.N. and Ax, R.L. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy. Sci.* 67(9): 2006-2009.
- Lee, C.N., Clayton, M.K., Bushmeyer, S.M., First, N.L. and Ax, R.L. 1986. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 63(3): 861-867.
- 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(5): 2081-2088.
- Lefebvre, R., Chenoweth, P.J., Drost, M., LeClear, C.T., Maccubbin, M., Dutton, J.T. and Suarez, S.S. 1995. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol. Reprod.* 53: 1066-1074.
- Lefebvre, R. and Suarez, S.S. 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 54(3): 575-582.
- 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.
- Lin, W., Shuster, S., Maibach, H.I. and Stern, R. 1997. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 45(8): 1157-1563.
- Martin, S.J. and Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82(3): 349-352.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. Flice is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO. J.* 16(10): 2794-2804.
- Miyoshi, K., Umezumi, M. and Sato, E. 1999. Effect of hyaluronic acid on the development of porcine 1-cell embryos produced by a conventional or new *in vitro* maturation/fertilization system.

- Theriogenology 51(4): 777-784.
- 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.
- Murray, M.K. 1997. Morphological features of epithelial cells in the sheep isthmus oviduct during early pregnancy. *Anat. Rec.* 247(3): 368-378.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.
- Nanda, A.S., Brar, P.S. and Prabhakar, S. 2003. Enhancing reproductive performance in dairy buffalo: major constraints and achievements. *Reproduction Suppl.* 61: 1-10.
- 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.
- Nandi, S., Ravindranatha, B.M., Gupta, P.S., Raghu, H.M. and Sarma, P.V. 2003. Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. *Theriogenology* 60(9): 1621-1631.
- Oconnell, J.O. 2001. Role of Fas-FasL in inflammatory disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2001: 1-18.
- 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., Winer, M.A. and First, M.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38(5): 1171-1180.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J. and First, M.L. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 41(4): 683-699.
- Pentikainen, V., Erkkila, K. and Dunkel, L. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 276(2): 310-316.
- Perera, B.M. 2008. Reproduction in domestic buffalo. *Reprod. Domest. Anim.* 43(suppl. 2): 200-206.
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J. and Suarez, S.S. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 44: 102-107.
- Ponta, H., Wainwright, D. and Herrlich, P. 1998. The CD44 protein family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30(3): 299-305.
- 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 alpha and cycloheximide. *Endocrinology* 139: 4860-4869.
- Robertson, S.A. 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 322(1): 43-52.
- Rodriguez-Martinez, H., Nicander, L., Viring, S., Einarsson, S. and Larsson, K. 1990. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat. Histol. Embryol.* 19(1): 16-36.
- Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B. and Pertoft, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fertil. Dev.* 9(3): 297-308.

- 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(2): 514-535.
- Rodriguez-Martinez, H., 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*. 68: 138-146.
- Rubio Pomar, F.P., Roelen, B.A., Slot, K., van Tol, H.T., Colanbrander, B. and Teerds, K.J. 2004. Role of Fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 71(3): 790-796.
- Sansone, G., Nastri, M.J. and Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3): 55-76.
- 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.
- Schmidt, A., Mavrogianis, P.A., O'Day-Bowman, M.B. and Verhage, H.G. 1997. Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 46(2): 201-207.
- 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.
- Shamsuddin, M. Rodriguez-Martinez, H. and Larsson, B. 1993. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium. *Reprod. Fertil. Dev.* 5(3): 307-315.
- Singh, J., Nanda, A.S. and Adams, G.P. 2000. The reproductive efficiency of female buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 693-604.
- Smith, T.T. 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 58(5): 1102-1104.
- 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.
- Stein-Streilein, J. 2008. Immune regulation and the eye. *Trends Immunol.* 29(11): 548-554.
- Stojkovic, M., Krebs, O., Kollé, S., Prella, K., Assmann, V., Zakhartchenko, V., Sinowatz, F. and Wolf, E. 2003. Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early bovine embryos. *Biol. Reprod.* 68: 60-66.
- 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.S., Brockman, K. and Lefebvre, R. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 56(2): 447-453.
- Suarez, S.S. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol. Reprod.* 58(5): 1105-1107.
- Suarez, S.S. 2001. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs* 168(1-2): 105-112.
- Suarez, S.S. 2002. Formation of the reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Domest. Anim.* 37(3): 140-143.
- Suarez, S.S. and Pacey, A.A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update.* 12: 23-27.
- Subramanian, S.V., Fitzgerald, M.L. and Bernfield, M. 1997. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 272(23): 14713-14720.
- Talevi, R. and Gualtieri, R. 2001. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium *in vitro*. *Biol. Reprod.* 64(2): 491-498.
- Techakumphu, M., Sukavong, Y., Intaramongkol, S. and Intaramongkol, J. 2001. The effect of gonadotropin releasing hormone on superovulation in elite swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *J. Vet. Med. Sci.* 63(8): 853-857.
- Terpe, H.J., Stark, H., Prehm, P. and Gunthert, U. 1994. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochem.* 101: 79-89.
- 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(3-4): 173-82.
- Tienthai, P., Kimura, N., Heldin, P., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2003a. Expression of hyaluronan synthase-3 in porcine oviductal epithelium during estrus. *Reprod. Fertil. Dev.* 15(1-2): 99-105.
- Tienthai, P., Yokoo, M., Kimura, N., Heldin, P., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2003b. Immunohistochemical localization and expression of the hyaluronan receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. *Reproduction* 125(1): 119-132.
- Tienthai, P., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 80(1-2): 131-146.
- Tienthai, P., Sajjarengpong, K. and Techakumphu, M. 2008. Histological changes in the epithelium of Thai swamp buffalo oviduct at follicular and luteal phases. *Thai J. Vet. Med.* 38(1): 27-37.
- Toole, B.P. 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer.* 4(7): 528-539.
- 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.
- Ulbrich, S.E., Schoenfelder, M., Thoene, S. and Einspanier, R. 2004. Hyaluronan in the bovine oviduct: modulation of synthases and receptors during the estrous cycle. *Mol. Cell Endocrinol.* 214(1-2): 9-18.
- Underhill, C. 1992. CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* 103(2): 293-298.
- Varner, D.D., Forrest, D.W., Fuentes, F., Taylor, T.S., Hooper, R.N., Brinsko, S.P. and Blanchard, T.L. 1991. Measurements of glycosaminoglycans in follicular, oviductal and uterine fluids of mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44: 297-306.
- Verbeke, C. S., Wenthe, U. and Zentgraf, H. 1999. Fas ligand expression in the germinal centre. *J. Pathol.* 189: 155-160.
- 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.
- Yaniz, J.L., Lopez-Gatius, F., Santaolaria, P. and Mullins, K.J. 2000. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat. Rec.* 260(3): 268-278.
- Yokoo, M., Tienthai, P., Kimura, N., Niwa, K., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2002. Localisation of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Zygote* 10(4): 317-326.
- 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.



## การเผยแพร่งานวิจัย

ผลการวิจัยในส่วนที่ได้ดำเนินการช่วงแรก ได้นำมาเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์ ในงานประชุมทางวิชาการทางสัตวแพทย์ ประจำปี 2553 ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้ตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติ The Thai Journal of Veterinary Medicine (TJVM) ดังนี้

Chivachareern, P. and **Tienthai, P.** 2010. Fas-L immunolocalization in Thai swamp buffalo oviduct. Proceedings of the 9<sup>th</sup> Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Thai J. Vet. Med. 40(1): 113.

สำหรับผลงานการวิจัยที่ได้ทั้งหมด จะนำมาเรียบเรียงและเขียนอีกครั้งเป็นภาษาอังกฤษ ซึ่งมีทั้งหมด 2 เรื่อง โดยเรื่องแรกได้ยอมรับให้ตีพิมพ์ลงในวารสารระดับนานาชาติคือ The Thai Journal of Veterinary Medicine (TJVM) (Impact factor: 0.118) และเรื่องที่ 2 จะส่งลงตีพิมพ์ในวารสาร Reproduction in Domestic Animals (impact factor: 1.606) โดยมีหัวข้อดังต่อไปนี้

1. **Tienthai, P.**, Chivachareern, P., Sajjarengpong, K. and Assavacheep, P. 2011. Fas ligand in swamp buffalo oviduct during follicular and luteal phases. Thai J. Vet. Med. 41(1): 21-29.
2. **Tienthai, P.** 2011. Hyaluronan and sulphated glycosaminoglycans in Thai swamp buffalo oviduct at follicular and luteal phases. Reprod. Demest. Anim. (writing manuscript)

ตารางแสดงรายละเอียดการใช้งบประมาณ

ครั้งที่ 1 ระหว่าง 1 ตุลาคม 2552 ถึง 1 มีนาคม 2553

**1. หมวดค่าใช้สอย**

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ/ ใบสำคัญรับเงิน	วันเดือนปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	บก. 111/1	1 ก.ย.-16 ก.ย. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,680.00	
2	บก. 111/2	17 ก.ย.-24 ก.ย. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,740.00	
3	บก. 111/3	28 ก.ย.-1 ต.ค. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,700.00	
4	บก. 111/4	5 ต.ค.-13 ต.ค. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,660.00	
5	บก. 111/5	14 ต.ค.-20 ต.ค. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,690.00	
6	บก. 111/6	6 พ.ย.-20 พ.ย. 52	ค่าเดินทางเก็บตัวอย่าง	1,520.00	
7	3427	28 ม.ค. 53	ค่าพิมพ์โปสเตอร์	700.00	
<b>รวม</b>				<b>10,690.00</b>	

**2. หมวดค่าวัสดุ**

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ/ ใบสำคัญรับเงิน	วันเดือนปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	85577	30 พ.ย. 52	- Vectastain Elite - Normal Horse Serum - Normal Goat Serum	55,725.60	
2	86784	20 ธ.ค. 52	- Biotinylated Anti-Rabbit - DAB substrate	24,460.00	
3	42111	14 ม.ค. 53	- Fas Ligand antibody	36,050.00	
4	5580	24 ม.ค. 53	- Fas antibody	42,800.00	

			- Syndecan-1		
5	52-01831	25 ม.ค. 53	- Polysine slides	3,852.00	
6	200911	28 ม.ค. 53	- Gelatine powder	1,030.00	
7	52-01842	30 ม.ค. 53	- Microwave plastic box	1,386.00	
<b>รวม</b>				<b>163,917.60</b>	

สรุป: ได้รับเงินงบประมาณงวดแรก 189,600.00 บาท ใช้ไป 10690.00 + 163,917.60 = 174,607.60 บาท

เหลือเงินเพื่อใช้ในงวดที่ 2 จำนวน 189,600.00 – 174,607.60 = 14,992.40 บาท

**ครั้งที่ 2 (งวดสุดท้าย) ระหว่าง 1 เมษายน 2553 ถึง 30 กันยายน 2553**

**1. หมวดค่าใช้จ่าย**

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ/ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	A09076	24 ส.ค. 53	ค่าพิมพ์รายงาน	1000.00	
<b>รวม</b>				<b>1000.00</b>	

**3. หมวดค่าวัสดุ**

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ/ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	5300091	22 มิ.ย. 53	- Fas ligand (N-20)	21,400.00	
2	5301449	23 มิ.ย. 53	- Biotinylated HABP	38,520.00	
3	5301055	23 มิ.ย. 53	- Syndecan-2	21,400.00	
4	8555987	4 ส.ค. 53	-สารเคมีในการสกัด RNA	33,410.00	
5	421119	11 ส.ค. 53	-อุปกรณ์ในการทำ RT-PCR	31,000.00	
6	451903	30 ก.ย. 53	-CD44 แอนติบอดี	19,902.00	
<b>รวม</b>				<b>165,632.00</b>	

**สรุปการใช้งบประมาณกองทุนวิจัยตากิษะกสมโภชทั้งหมด**

1. งบประมาณที่ได้ทั้งหมด 189,600.00 + 126,400.00 = **316,000.00** บาท

2. งบประมาณงวดที่ 1: **189,600.00** บาท ใช้ไป **174,607.60** บาท

เหลือเงิน 189,600.00 – 174,607.60 = **14,992.40** บาท

3. งบประมาณงวดที่ 2: **126,400.00** + 14,992.40 = **141,392.40** บาท ใช้ไป **166,632.00** บาท

ใช้เงิน 141,392.40 – 166,632.00 **เกินกว่าเงินงบประมาณที่ได้รับ = 25,239.60** บาท