

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การพัฒนาการของเอ็มบริโอระยะแรก

การพัฒนาของเอ็มบริโอระยะแรก (early embryogenesis) โดยมีจุดเริ่มต้นจากการปฏิสนธิ การเชื่อมสัมพันธ์กันของโปรนิวเคลียสเพศผู้และเพศเมีย การเปลี่ยนจากไซโกต (zygote) มาเป็นเอ็มบริโอและการยึดเกาะมดลูกของเอ็มบริโอ (ไชยณรงค์, 2550) โดยการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะแรก มีขั้นตอนที่สำคัญ 4 ขั้นตอนที่เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการยึดเกาะของเอ็มบริโอได้แก่

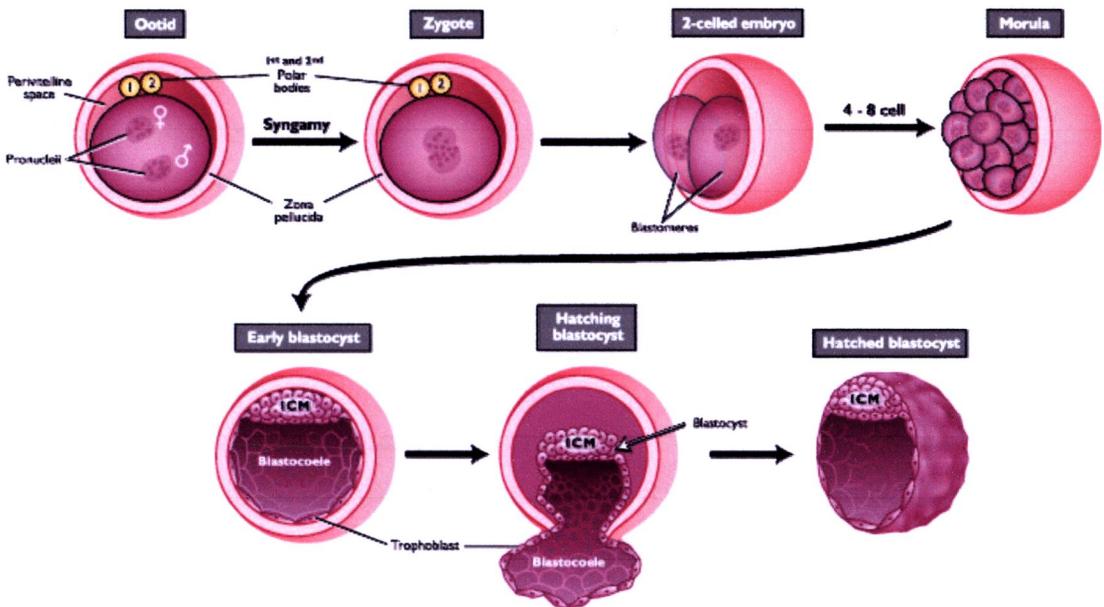
- 1) การพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองภายในชั้นโซนา เพลลูซิดา (development within the confines of the zona pellucida)
- 2) การพัฒนาการของบลาสโตซิสต์ออกจากชั้นโซนา เพลลูซิดา (hatching of the blastocyst from the zona pellucida)
- 3) การพัฒนาของโครงสร้างเมมเบรนพิเศษ (development of the extraembryonic membranes)
- 4) การยอมรับการตั้งครรภ์ (maternal recognition of pregnancy)

##### 2.1.1 การพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองภายในชั้นโซนา เพลลูซิดา

การพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองภายในชั้นโซนา เพลลูซิดา เริ่มจากการปรากฏของโปรนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียแสดงให้เห็นถึงการพัฒนาการของโอโอไซด์ หลังจากได้ปฏิสนธิ ซึ่งเซลล์นี้เรียกว่า โอโอติต (ootid) หลังจากที่มีการเชื่อมติดต่อกันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียจะได้เป็นเอ็มบริโอเซลล์เดี่ยว หรือเรียกว่า ไซโกต ซึ่งมีการพัฒนาต่อไป โดยเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหลายขั้นตอน จนกระทั่งพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอระยะสองเซลล์ หรือเรียกว่า บลาสโตเมีย (blastomere) และพัฒนาต่อไปจนกลายเป็น 4, 8 และ 16 เซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2-1) ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการพัฒนาจนกระทั่งกลายเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ เรียกคุณสมบัตินี้ว่า totipotency (Senger, 1997) ซึ่งจากคุณสมบัตินี้ทำให้นักวิจัยสามารถศึกษาองค์ความรู้ด้านการปฏิสนธิในร่างกาย การโคลนนิ่ง การคัดแยกเพศเอ็มบริโอ และเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ เป็นต้น

เมื่อเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์มากขึ้นจนไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ เรียกว่า มอรูลา (morula) โดยพบว่าจะเกิดการอัดแน่นของเซลล์ที่บริเวณตรงกลางมากกว่าด้านนอก ดังนั้นจึงสามารถแบ่งเซลล์ของระยะมอรูลาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เซลล์ด้านใน (inner cell) และด้านนอก (outer cell) การแลกเปลี่ยนหรือการเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เพื่อการส่งสัญญาณ และสาร

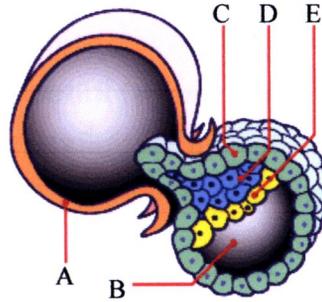
ต่างๆ ระหว่างเซลล์ จึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเอ็มบริโอ โดยบริเวณที่เซลล์ด้านในจะมีการพัฒนาโครงสร้างที่เรียกว่า gap junctions ซึ่งทำหน้าที่เป็นช่องทางเข้าออกของสารที่มีโมเลกุลเล็ก ส่วนด้านนอกจะพัฒนาโครงสร้างที่เรียกว่า tight junction หลังจากที่มีโครงสร้างทั้งสองแล้ว จะมีการสะสมของเหลวภายในช่องว่าง (cavity) ของเซลล์เอ็มบริโอ เรียกว่า บลาสโตซีส (blastocoele) และเรียกเอ็มบริโอระยะนี้ว่า บลาสโตซีส (blastocyst) ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass) พัฒนาไปเป็นอวัยวะและโทรโฟบลาส (trophoblast) พัฒนาเป็น chorion และ placenta หรือโครงสร้างของเมมเบรนพิเศษ (Senger, 1997; ไชยณรงค์, 2550)



ภาพที่ 2-1 การพัฒนาการของเอ็มบริโอภายในชั้นโซนา เฟลลูซิดา  
ที่มา: Senger (2005)

### 2.1.2 การพัฒนาการของบลาสโตซีสออกจากชั้นโซนา เฟลลูซิดา

ในการพัฒนาของบลาสโตซีสเมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสต่อไป จะก่อให้เกิดความดันภายในเซลล์ชั้นเรื่อยๆ เนื่องจากเกิดจากบีบตัวของเซลล์ ในขณะที่เดียวกันมีการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนออกมาจากโทรโฟบลาส ทำให้ชั้นโซนาหลุดออกหรือแตกออกทำให้บลาสโตซีสหลุดออกจากชั้นโซนา (hatching blastocyst) ภายนอกและลอยอยู่อย่างอิสระ (free floating embryo) ในมดลูก (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2 การพัฒนาการของบลาสโตซิสต์ออกมาจากชั้นโซนา เพลลูซิดา

- A. Pellucid zone
- B. Blastocyst cavity
- C. Trophoblast (outer cell mass)
- D. Epiblast (part of the inner cell mass)
- E. Hypoblast (part of the inner cell mass)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Rowen et al. (2009)

### 2.1.3 การพัฒนาของโครงสร้างเมมเบรนพิเศษ

ภายหลังระยะบลาสโตซิสต์หลุดออกมา การพัฒนาของเอ็มบริโอจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว กล่าวคือ การพัฒนาของโครงสร้างเมมเบรนพิเศษ ซึ่งจะประกอบเป็นโครงสร้างต่างๆ ดังนี้

- 1) yolk sac ถูกพัฒนาจากชั้นไพรมิทีฟ เอนโดเดิร์ม (primitive endoderm)
- 2) chorion เป็นเมมเบรน 2 ชั้นถูกพัฒนาจากชั้นโทรโฟบลาส และไพรมิทีฟ เอนโดเดิร์ม จะทำหน้าที่สร้างวิลโล (villi) เพื่อสร้างที่ยึดเกาะของรก (placental attachment)
- 3) amnion มีลักษณะเป็นถุงห่อหุ้ม ทำหน้าที่ป้องกันเอ็มบริโอ โดยมีของเหลวอยู่ข้างใน
- 4) allantois มีลักษณะเป็นถุง ทำหน้าที่เก็บของเสียจากเอ็มบริโอโดยถูกพัฒนาจากชั้น ectoderm

เมื่อเอ็มบริโอมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ถุง allantois จะขยายใหญ่ขึ้นและในที่สุดจะสัมผัสกับถุง amnion และจะเชื่อมกันเป็นเมมเบรนที่เรียกว่า chorioallantoic membrane ซึ่งเป็นส่วนของเอ็มบริโอในโครงสร้างของรก (placenta) และช่วยเพิ่มที่ผิวสัมผัสในการยึดเกาะเยื่อบุโพรงมดลูกชั้นเอนโดเมเทรียม (endometrium) แกสตรูเลชัน (gastrulation) จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่เอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิสต์เริ่มฝังตัวในเยื่อบุโพรงมดลูกชั้นใน (inner cell mass) ของบลาสโตซิสต์แยกตัวเป็นอีพิบลาส (epiblast) และไฮโปบลาส (hypoblast)

## 2.2 การยอมรับการตั้งครรภ์

การยอมรับการตั้งครรภ์ (maternal recognition of pregnancy) คือ การที่เยื่อบุโพรงมดลูกของแม่มีการตอบสนองจากสัญญาณที่เอ็มบริโอส่งมายังตัวรับบนผิวเยื่อบุโพรงมดลูกเพื่อการฝังตัวเข้าไปภายในผิวชั้นในของเยื่อบุโพรงมดลูกของแม่ (Roberts et al., 1997) ซึ่งการเกิดการล้มเหลวในการตั้งครรภ์ในระยะแรกมักเกิดจากสาเหตุที่เอ็มบริโอไม่แสดงการส่งสัญญาณเพื่อให้เยื่อบุโพรงมดลูกเตรียมพร้อมการฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (โค กระบือ แพะ และแกะ) พบว่าเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสมีการสร้างโปรตีน IFN- $\tau$  จากโทรโฟบลาส โดยจะทำหน้าที่ไปขัดขวางการสลายของ CL (corpus luteum) โดย CL จะทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone, P4) มีการรักษาภาวะในการตั้งครรภ์ และช่วยให้ปรับสภาพของเยื่อบุโพรงมดลูกให้เหมาะสมกับการฝังตัวของเอ็มบริโอ การตั้งครรภ์ การเกิดรก และการพัฒนาของเอ็มบริโอ (Spencer and Bazer., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Roberts et al. (2003) ที่พบว่า การเสื่อมสลายของ CL จากการทำงานของ PGF $_{2\alpha}$  (prostaglandin F $_{2\alpha}$ ) ที่สังเคราะห์จากเยื่อบุโพรงมดลูกซึ่งส่งผลให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีลดลงทำให้เยื่อบุโพรงมดลูกไม่เหมาะสมในการฝังตัวของเอ็มบริโอ (ภาพที่ 2-3)

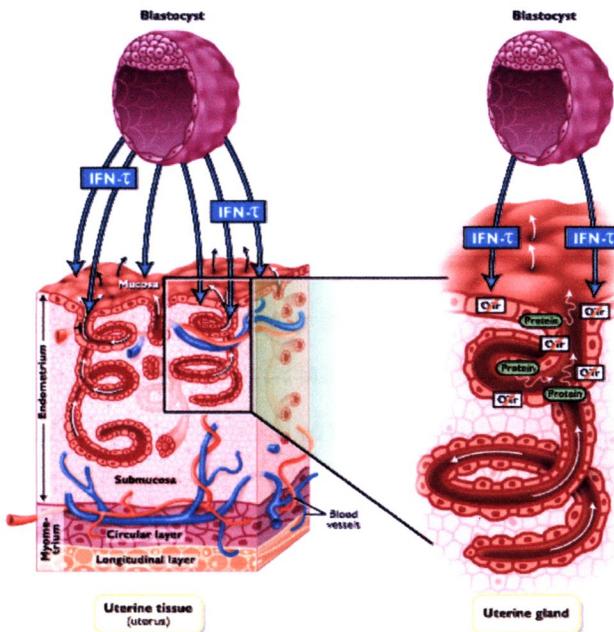
ในสัตว์เคี้ยวเอื้องเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ เยื่อบุโพรงมดลูกจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชั้นตามลักษณะการทำงาน ได้แก่ เอนโดเมเทรียม และไมโอเมเทรียม (myometrium) เซลล์ชั้นเยื่อบุโพรงมดลูกชั้นเอนโดเมเทรียมจะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ลูมินัล อีพิทีเลียล เซลล์ (luminal epithelial cells, LE) จะเป็นบริเวณที่เกิดการฝังตัวของเอ็มบริโอและแกแลนดูลาร์ อีพิทีเลียล เซลล์ (glandular epithelial cells, GE) ทำหน้าที่สร้าง หลั่ง และขนส่งสารประกอบของโปรตีนและสารอื่นๆ ที่เรียกว่า ฮิสโตรโทรฟ (histotroph) ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์ (enzyme) ฮอร์โมน (hormone) โกรทแฟคเตอร์ (growth factors) โปรตีนชนิดต่างๆ สารที่สร้างจากเซลล์ชั้นเอนโดเมเทรียม เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดและการเจริญของเอ็มบริโอ และการฝังตัวของเอ็มบริโอ และการสร้างรก มดลูกจะมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการตั้งครรภ์ (receptive state) โดยการควบคุมของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ที่สร้างจาก CL และในขณะเดียวกันการสร้างฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน โดย CL ก็จะถูกควบคุมโดยมดลูกเนื่องจากมดลูกเป็นแหล่งผลิตฮอร์โมน PGF $_{2\alpha}$  ทำหน้าที่สลาย CL (luteolysis) การที่มดลูกจะอยู่ในสภาวะที่ยอมรับการตั้งครรภ์ได้ จะต้องรักษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนให้สูงอยู่ตลอดเวลาให้วงรอบการเป็นสัดยาวนานออกไปกว่าปกติ (จาก 17 วัน เป็น 32 วัน) โดยยับยั้งขบวนการสลาย CL (Spencer et al., 2007)

ภายใน LE และ GE จะมีการสร้างตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone receptors, PR) ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors, ER) และตัวรับออกซิโตซิน (oxytocin receptors, OTR) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-ทู (cyclooxygenase 2, COX-2)

ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน  $\text{PGF}_{2\alpha}$  โดยการสลาย CL เป็นการทำงานร่วมกันของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนเอสโตรเจน และฮอร์โมนออกซีโทซิน ตามลำดับ

ในวันที่เป็นสัด (estrus) ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะกระตุ้นให้มีการสร้างตัวรับเอสโตรเจน ตัวรับโปรเจสเตอโรน และตัวรับออกซีโทซินเพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นในระยะหลังการเป็นสัด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เริ่มเพิ่มสูงขึ้นจะไปยับยั้งการสร้างตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งจะออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสร้างตัวรับออกซีโทซินด้วย แต่เมื่อถึงระยะสุดท้ายของวงรอบการเป็นสัด (diestrus) เมื่อมีการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกมาขังมดลูกนาน 8-10 วัน จะไปลดการสร้างตัวรับโปรเจสเตอโรน (down-regulation) เมื่อระดับตัวรับโปรเจสเตอโรนลดลงแล้วตัวรับเอสโตรเจน และตัวรับออกซีโทซินก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ฮอร์โมนออกซีโทซินที่สร้างจากต่อมใต้สมองส่วนหลัง และจาก CL จะไปออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับออกซีโทซินมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ทำให้มีการสังเคราะห์และหลั่ง  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ออกมา (Spencer et al., 2004)

การยับยั้งการสังเคราะห์  $\text{PGF}_{2\alpha}$  จะสามารถยืดอายุของ CL ออกไปได้จากรายงานของ Flint et al. (1992) พบว่า IFN- $\tau$  ซึ่งเป็นสารที่หลังจากโทรโฟบลาส สามารถยับยั้งการสังเคราะห์  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ได้ เมื่อ CL ไม่ถูกสลายจะทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนคงที่อยู่ระดับสูงทำให้มดลูกพร้อมที่จะเกิดการฝังตัวของเอ็มบริโอ



ภาพที่ 2-3 การส่งสัญญาณ IFN- $\tau$  ในการฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้อง  
ที่มา: Senger (2005)

### 2.3 การฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

รูปแบบการฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (โค แพะ แกะ) จะมีการฝังตัวของเอ็มบริโอเป็นแบบเดียวกัน คือ การฝังตัวของเอ็มบริโอจะเกิดขึ้นเมื่อเอ็มบริโออยู่ระยะบลาสโตซิส และจะเป็นแบบที่ไม่มีการแทรกตัวของเอ็มบริโอเข้าไปในเยื่อบุโพรงมดลูกของแม่ (non-invasive implantation) แต่จะเป็นการเกาะเกี่ยวกันระหว่างเซลล์โทรโฟบลาสกับเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกของแม่ ซึ่ง Spencer et al. (2004) ได้แบ่งระยะของการฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้องออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

#### ระยะที่ 1 Shedding of the zona pellucida

เมื่อเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส เคลื่อนที่มาจากบริเวณปีกมดลูก ในวันที่ 8-10 บลาสโตซิสจะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว (cellular hyperplasia) และจากของเหลวที่อยู่ภายในบลาสโตซิส ส่วนของโซนา เพลลูซิดา ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันไม่ให้บลาสโตซิสสัมผัสกับเซลล์เยื่อบุมดลูกโดยตรงจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่สร้างจากเอ็มบริโอ เช่น พลาสมีโนเจน (plasminogen) และพลาสมีโนเจน แอคติเวเตอร์ (plasminogen activator) และเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากมดลูกจะทำให้บลาสโตซิสหลุดออกมาจากชั้นโซนา เพลลูซิดา

#### ระยะที่ 2 Precontact and blastocyst orientation

ในระหว่างวันที่ 9-11 หลังจากบลาสโตซิสหลุดออกจากชั้นโซนาแล้ว ระยะนี้ โทรโฟบลาสยังไม่ได้เกาะติดกับเซลล์เยื่อบุมดลูก สามารถที่จะชะล้างเอาเอ็มบริโอออกมาได้ โดยง่ายโดยไม่ทำให้โครงสร้างของเอ็มบริโอเสียหาย การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของบลาสโตซิสจากเดิมที่เป็นทรงกลม (spherical) ก็จะมียืดยาวเป็นเส้น (filament) เริ่มขึ้นในวันที่ 13 จากบลาสโตซิส 3 มิลลิเมตร จะยืดยาวถึง 250 มิลลิเมตร ในวันที่ 18 คอนเซปตัส (conceptus หมายถึง เอ็มบริโอหรือฟัตัส กับเมมเบรนพิเศษ) ที่เดิมปรากฏอยู่ในปีกมดลูกด้านเดียวกับ CL ก็จะมียืดยาวออกไปจนถึงปีกมดลูกอีกข้างหนึ่ง และขณะที่คอนเซปตัสกำลังยืดยาวออกนั้น โทรโฟบลาสจะมีการสร้างสารที่สำคัญ ได้แก่ IFN- $\tau$  ที่จะเป็นตัวส่งสัญญาณไปให้แม่ยอมรับการตั้งท้อง ตั้งแต่ประมาณ วันที่ 12 และจะสร้างออกมามากที่สุดประมาณ วันที่ 15-25 นอกจากนี้ IFN- $\tau$  ก็ออกฤทธิ์ไปยังเซลล์ของมดลูกเพื่อยับยั้งกระบวนการสลายของ CL (antiluteolytic mechanism) โดยการการสังเคราะห์ตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน และตัวรับออกซิโตซิน ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมน PGF $_{2\alpha}$

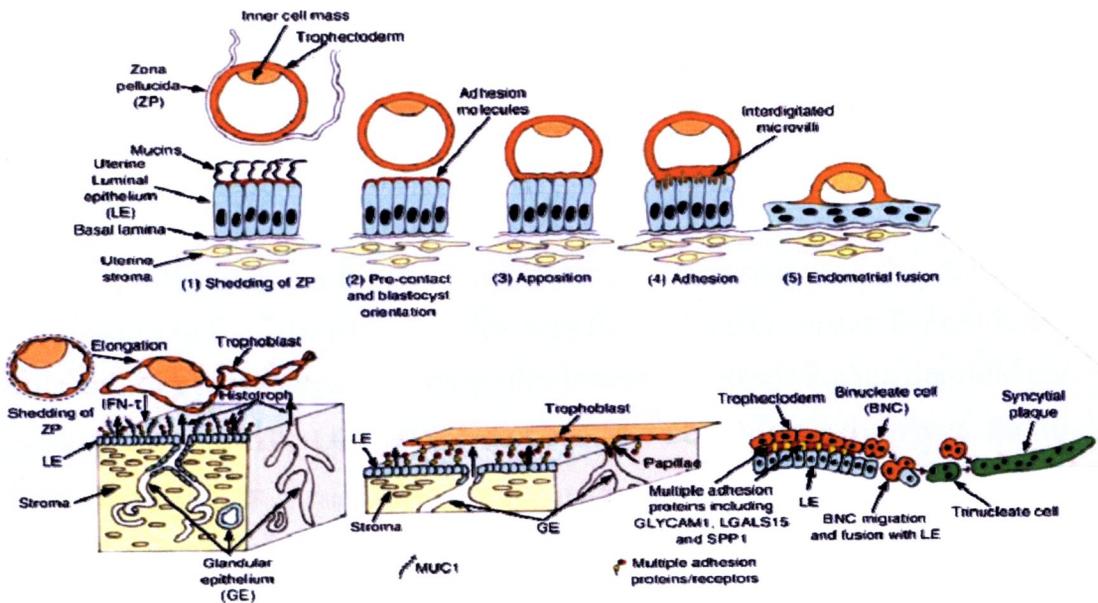
#### ระยะที่ 3 Apposition

ในระยะนี้คอนเซปตัสที่ยืดออกเป็นเส้นยาวเข้าไปชิดเยื่อบุมดลูก โดยปกติแล้วบริเวณเซลล์เยื่อบุมดลูกจะมีไกลโคโปรตีนที่ชื่อว่า มิวซิน I (Mucin I) ขวางอยู่ทำให้คอนเซปตัสไม่สามารถเข้าไปชิดกับเซลล์เยื่อบุมดลูกได้ คอนเซปตัสจะสามารถเกาะกับเยื่อบุมดลูกเมื่อระดับของ Mucin I ลดลงเท่านั้น การที่คอนเซปตัสจะเกาะกับ

เยื่อบุโพรงมดลูกได้นั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เยื่อบุโพรงมดลูกได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จากรายงานของ Spencer et al. (2004) พบว่าเมื่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สร้างจาก CL สูงประมาณ 8-10 วัน จะทำให้ตัวรับโปรเจสเตอโรนภายในเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกลดจำนวนลง (down-regulate) เมื่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่มีตัวรับก็ไม่สามารถออกฤทธิ์มากระตุ้นให้สร้าง Mucin I ออกมา เนื่องจาก Mucin I นี้จะสร้างจากเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกโดยการกระตุ้นจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เมื่อไม่มี Mucin I มาขัดขวางทำให้คอนเซปตัสสามารถเข้าไปอยู่ชิดกับเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกได้

#### ระยะที่ 4 Adhesion

ในระยะนี้โทรโพลลาสจะเกาะติดแน่นกับเยื่อบุโพรงมดลูก ทำให้การชะล้างคอนเซปตัสออกไปจะทำได้ยาก โทรโพลลาสจะมีการแบ่งเซลล์เฉพาะนิวเคลียสแต่ไม่มีการแบ่งไซโทพลาสซึม ทำให้ได้ไบนิวคลีเอทเซลล์ (binucleate cells) ซึ่งจะพบเซลล์เหล่านี้ได้ตั้งแต่วันที่ 17 ไปจนตลอดระยะเวลาของการตั้งท้องไบนิวคลีเอทเซลล์เหล่านี้จะไปรวมตัวกับเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกได้เป็นไตรนิวคลีเอทเซลล์ (trinucleate cells) และเข้าไปแทนที่ในบริเวณเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูก ไตรนิวคลีเอทเซลล์หลายๆ เซลล์จะรวมกันเป็นมัลตินิวคลีเอทเซลล์ (multinucleate cells) หรือ ซินไซเทียม (syncytium) โทรโพลลาสจะยื่นออกไปมีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (finger-like villi) เข้าไปเกาะติดแน่นกับเยื่อบุโพรงมดลูก ในโคเพคเมียเมื่อโตเต็มที่แล้วเยื่อบุโพรงมดลูกที่บริเวณปีกมดลูกจะมีตุ่มกลมนูนขึ้นมาซึ่ง เรียกว่า คาร์จเคิล (caruncles) บริเวณคาร์จเคิลจะมีเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูกชนิดที่ไม่มีต่อม (unglandular epithelial cells) ที่หลั่งออกมาสู่ภายนอกเยื่อบุโพรงมดลูก ซึ่ง Spencer et al. (2004) รายงานว่าใน แกะและโคโทรโพลลาสจะเข้าร่วมกับเยื่อบุโพรงมดลูกที่บริเวณคาร์จเคิลนี้ และจะพัฒนาต่อไปเป็นรกหรือพลาเซนโตม (placentomes) ซึ่งจะประกอบไปด้วยโทรโพลลาสในส่วนของลูก เรียกว่าคอตลีดอน (cotyledon) และเป็นทางผ่านของสารอาหารจากแม่ไปยังลูก ในขณะที่บริเวณช่องระหว่างคาร์จเคิลจะสังเคราะห์และหลั่งสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการตั้งท้อง เช่น เอนไซม์ โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เป็นต้น



ภาพที่ 2-4 ระยะของการฝังตัวของเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้อง  
ที่มา: Spencer et al. (2004)

## 2.4 อินเทอร์เฟอรอน (Interferon; IFN)

อินเทอร์เฟอรอน ถูกค้นพบในปี ค. ศ. 1957 โดย Isaacs และ Lindenmann ในระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องการรบกวนและขัดขวางกันเองระหว่างไวรัส (viral interference) คุณสมบัติของอินเทอร์เฟอรอน คือ เป็น glycoprotein สร้างโดยสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) หลายชนิด โดยมีโครงสร้างไม่เหมือนกันถ้าเกิดในสัตว์ต่างชนิดกัน ดังนั้น IFN ของสัตว์ชนิดหนึ่งจึงไม่มีผลต่อสัตว์ชนิดอื่น โดย IFN ที่พบในโครงสร้างของอวัยวะต่างๆ ที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการปกป้องอันตรายที่จะเกิดขึ้นที่เซลล์เป้าหมาย จากการสังเคราะห์เอนไซม์มาย่อยโปรตีนที่อวัยวะนั้นสร้างขึ้น

อินเทอร์เฟอรอนสามารถแยกย่อยได้โดยสามารถจำแนกได้จากลำดับกรดอะมิโน ได้แก่  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  และ  $\tau$  อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการจับกับตัวรับ (affinity) ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีความสามารถจับกับตัวรับที่บริเวณผิวเซลล์ได้สูง และนอกจากนี้ในการควบคุมการตอบสนองของจีนนั้นเหมือนกันในอินเทอร์เฟอรอน ในแต่ละประเภท ซึ่งความสามารถพิเศษเฉพาะของอินเทอร์เฟอรอน ประเภท I (IFN types I) คือ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการต่อต้านการเข้าบุกรุกของไวรัสได้ โดยมีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ ทั้งยังก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันและมีอิทธิพลในการแสดงออกในลักษณะต่างๆ ของเซลล์ โดยจะมีตัวรับที่ต่างกันไปขึ้นอยู่กับกระบวนการและการกระตุ้นของเซลล์ (Spencer et al., 2004)

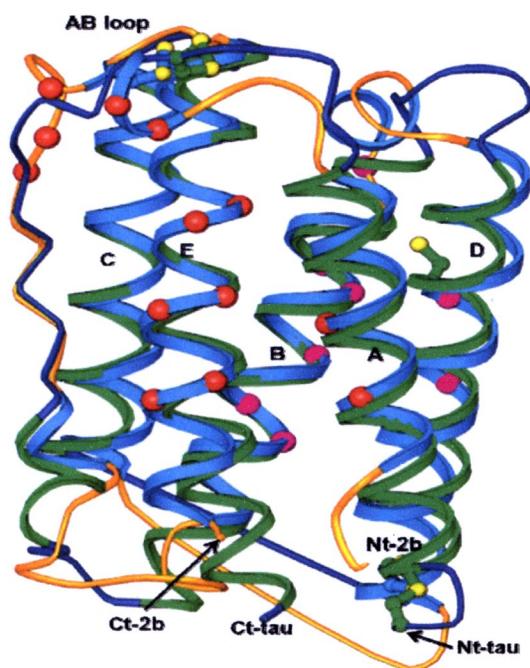
IFN- $\alpha$  นั้นเป็นลำดับเบสที่ได้จากรูปแบบของจีนที่ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมโดยได้มีการศึกษากับสัตว์หลายสปีชีส์ด้วยกัน ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ของสัตว์ ส่วน IFN- $\beta$  จะพบในมนุษย์ หนูเมาส์ เป็นต้น แต่พบในปริมาณน้อยมากในโค กระบือ และ IFN- $\omega$  เชื่อว่ามีการแสดงออกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนมาก แต่จะเห็นชัดเจนที่สุดในสุนัข และได้มีการรายงานว่าพบในหนูเมาส์ ซึ่ง IFN- $\alpha$  และ IFN- $\omega$  มีความเหมือนกันมากกว่า IFN- $\beta$  โดยเมื่อพิจารณาถึงโครงสร้าง และการแสดงออกของจีน IFN- $\tau$  มีผลในการแสดงของฮอริโมนในระหว่างที่มีการตั้งท้องของโค กระบือ แพะและแกะ ซึ่งสังเคราะห์มาจากโทรโฟบลาส และจะส่งสัญญาณไปกระตุ้นเยื่อบุโพรงมดลูกชั้นเอนโดมีเทรียมในชั้นนี้มีตัวรับสัญญาณอยู่ เช่น CXCL10, LGALS15 (Allison et al., 2006) โดยพบว่า IFN- $\tau$  มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์ PGF $_{2\alpha}$  และเป็นตัวสนับสนุนการคงอยู่ของ CL (Roberts, 2003) ซึ่ง CL จะสร้างฮอริโมนโปรเจสเทอโรน เพื่อรักษาสภาพของเยื่อบุโพรงมดลูกให้เหมาะสมต่อการฝังตัวของเอ็มบริโอ

ตารางที่ 2-1 ความแตกต่างของ IFN types I ชนิดต่าง ๆ (จำนวนนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน)

IFN	IFN types I		Sources
	Nucleotide	Amino acid	
Rabbit IFN- $\omega$ 45	99.0	99.5	Capon et al. (1985)
Ovine IFN- $\omega$ 1	75.4	60.7	Charlier et al. (1991)
Bovine IFN- $\omega$ 1	76.3	61.7	Charlier et al. (1991)
Equine IFN- $\omega$ 2	78.8	62.4	Ixaman et al. (1992)
Human IFN- $\omega$ 1	80.7	67.2	Charlier et al. (1991)
Ovine IFN- $\tau$ 1	75.3	55.3	Charlier et al. (1993)
Bovine IFN- $\tau$ 1	72.5	54.6	Hansen et al. (1991)
Bovine IFN- $\alpha$ 1	66.7	51.8	Himmler et al. (1986)
Human IFN- $\alpha$ 1	68.2	55.3	Himmler et al. (1986)
Equine IFN- $\alpha$ 2	69.5	55.4	Himmler et al. (1986)

### 2.4.1 Interferon tau (IFN- $\tau$ ) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง IFN- $\tau$  เป็นจีนที่สามารถช่วยในการสนับสนุนในการยอมรับการตั้งท้อง ซึ่ง IFN- $\tau$  เดิมมีชื่อเรียกว่า โทรโฟบลาสติน (trophoblastin) หรือ โทรโฟบลาสโปรตีน-1 (Trophoblast protein-1) เป็นโปรตีนที่มีการสังเคราะห์และหลั่งมาจากเอ็มบริโอ (Bazer et al., 1997) โดยในชนิด bovine IFN- $\tau$  และ ovine IFN- $\tau$  มักพบในสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม IFN- $\tau$  ก็มีความแตกต่างกันระหว่างโปรตีนที่แสดงออกในสัตว์ต่างชนิดกัน โดย IFN- $\tau$  เป็นสารประกอบโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรต มีโครงสร้างเชื่อมกันโดย N-linked oligosaccharides ส่วน ovine IFN- $\tau$  ไม่มีองค์ประกอบโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรต (Demmers et al., 2001) ดังภาพที่ 2-5 แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของโครงสร้างในโดะแกรมของ human IFN- $\alpha$ 2b (โครงสร้าง  $\alpha$ - helices สีฟ้า น้ำทะเล, loops สีทอง) และ ovine IFN- $\tau$   $\alpha$ 2b (โครงสร้าง  $\alpha$ - helices สีเขียว, loops สีฟ้า) เชื่อมต่อกันโดยพันธะไดซัลไฟด์ เป็นรูปโครงสร้างอะตอมสี่เหลี่ยม ที่ปลายมีหมู่ carboxyl (Ct) และ amino (Nt) มาเกาะทั้งสองโครงสร้าง แต่โครงสร้างของ IFN- $\tau$  ส่วนปลายที่มีหมู่ carboxyl มาเกาะยาวกว่า 6 ตัว โดยมีองค์ประกอบของ IFNAR2 และ IFNAR1 ซึ่งทำงานร่วมกัน (รูปทรงกลม สีแดง และสีม่วง ตามลำดับ) โดยจะเห็นได้ว่าโครงสร้างทั้งสองจะมีความเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ปลายด้านหมู่คาร์บอกซีซี (carboxy)



ภาพที่ 2-5 เปรียบเทียบโครงสร้างของ human IFN- $\alpha$ 2b และ ovine IFN- $\tau$   
ที่มา : Roberts (2003)



ห้องสมุดงานวิจัย  
วันที่..... 12 ส.ค. 2556  
เลขทะเบียน..... 209130  
เลขเรียกหนังสือ.....

ปริมาณ mRNA ของจีน IFN- $\tau$  นั้นมีความแตกต่างจาก IFN ชนิดอื่น ประการแรก IFN- $\tau$  ไม่ได้แสดงออกโดยการกระตุ้นของไวรัส (Guesdon et al., 1996) ถึงแม้ว่า IFN- $\tau$  จะสามารถยับยั้งการทำงานของไวรัสได้ ประการที่สอง การแสดงออกของจีน IFN- $\tau$  มีจำกัดที่เอ็มบริโอ ที่สังเคราะห์จากโทรเฟคโทเดิร์ม (trophectoderm) แต่ IFN สามารถพบในเนื้อเยื่อของเซลล์หลายชนิด Demmers et al. (2001) รายงานว่า IFN- $\tau$  สังเคราะห์และหลั่งจากโมนิวเคลียส เซลล์ (mononuclear cells) บริเวณโทรเฟคโทเดิร์มของเอ็มบริโอ ระหว่างวันที่ 14-16 (Bazer et al., 1997, Roberts et al., 1997) ในโค IFN- $\tau$  จะพบในระหว่างวันที่ 16-24 ของช่วงเริ่มตั้งท้อง (Demmers et al., 2001) โดยพบมากที่สุดในวันที่ 17 (Bartol et al., 1985) โดยมีผลในการส่งสัญญาณไปยังเซลล์ข้างเคียง ทำให้เกิดการยอมรับการฝังตัวของเอ็มบริโอ และยังสามารถส่งผลไปถึงกระบวนการพัฒนาของ luteolytic

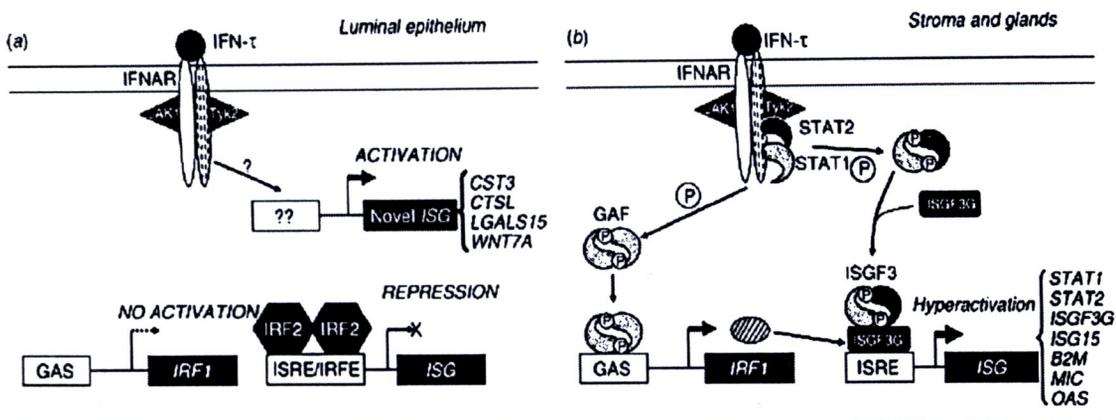
นอกจากนี้ IFN- $\tau$  ยังสามารถยับยั้งการทำงานของไวรัส (antiviral)ต่อต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็ว (antiproliferative) ต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง (antitumor) สร้างเสริมภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) และในการรักษาโรค (therapeutic properties) (Pontzer et al., 1990; Roberts, 1996)

#### 2.4.2 กลไกการส่งสัญญาณของจีน IFN- $\tau$

โปรตีน IFN- $\tau$  สามารถใช้ช่องทางผ่านระหว่างเซลล์บริเวณที่มี JAK-STAT อยู่ตามความสามารถของ IFN types I ทุกชนิด โดยเยื่อบุโพรงมดลูกชั้นเอนโดเมเทรียมจะพบว่ามีตัวรับ IFN $\alpha$  receptor 1 (IFNAR1) และ IFN $\alpha$  receptor 2 (IFNAR2) ที่บริเวณ uterine LE ซึ่งเอนไซม์ Janus kinase 1 (JAK1) และ tyrosine kinase 2 (TYK2) เป็นองค์ประกอบหลักของ IFNAR1 และ IFNAR2 ภายในไซโตพลาสซึม หลังจากนั้นเกิดกระบวนการ phosphorylation ของสัญญาณที่ส่งผ่านเข้ามายังเซลล์ และเกิดปฏิกิริยา transcription (STAT) 1 และ 2 โดยเป็นโครงสร้างของ STAT1 (GAF) และโครงสร้างสองส่วนประกอบกันอยู่ของ STAT1 และ STAT2 ซึ่งสามารถเคลื่อนผ่านชั้นของนิวเคลียสได้ เมื่อ GAF จับกับ gamma activation sequence (GAS)

จากภาพที่ 2-6 การควบคุมของ IFN regulatory factor 1 (IRF1) ทำให้โครงสร้างทั้งสองส่วนของ STAT1 และ STAT2 ไปจับกับ IRF9 ที่มาจาก ISGF3 IFN และ stimulated response elements (ISRE) ที่ประกอบด้วย STAT1, STAT2, IRF9, B2M, ISG15, MHC และ OAS (Johnson et al., 2000; Choi et al., 2001) IFN-stimulated genes (ISGs) จะยังไม่สามารถแสดงออกด้วยตัวของมันเอง โดย ISGs แต่ละชนิด (B2M, GBP2, IFI27, IFIT1, ISG15, IRF9, MIC, OAS, RSAD2, STAT1 และ STAT2) จะถูกกระตุ้น หรือควบคุมโดย IFN- $\tau$  ในชั้นของ GE และ stroma หรือที่เรียกว่า "interferonomedin" แต่ไม่มีใน

เยื่อบุโพรงมดลูกชั้น LE and superficial GE (sGE) เนื่องจากช่องทางระหว่างเซลล์ JAK-STAT จะถูกยับยั้งด้วย IRF2 ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง (repressor) การ transcription ซึ่งพบในเยื่อบุโพรงมดลูกชั้น LE และ superficial GE (sGE) (Choi et al., 2001)



ภาพที่ 2-6 กลไกการส่งสัญญาณของ IFN- $\gamma$  ในชั้นเยื่อบุโพรงมดลูกชั้น luminal epithelium และชั้น stroma และ glands  
ที่มา : Spencer et al. (2007)

อย่างไรก็ตามมีบางจिनที่ถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำโดย IFN- $\gamma$  ในเยื่อบุโพรงมดลูกชั้น LE และ sGE เช่น WNT7A, LGALS15, CTSL, และ CST3 ของเยื่อบุโพรงมดลูกทำให้ ISGs ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการตอบสนองของช่องทางผ่านของสัญญาณ และเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตั้งท้องของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งขึ้นอยู่กับช่วงเวลานั้น โดยพบว่า ras-related C3 botulinum substrate 1 (RAC1), p38/mitogen activated protein kinase (p38 MAPK), insulin receptor substrate (IRS), the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) cascade, และ v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like (CRKL) จำพวกของเอนไซม์ CDC2 related kinase สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของช่องทางผ่านสัญญาณโดยการกระตุ้นของ IFN- $\gamma$  ได้ (Bekisz et al., 2004) โดยการสนับสนุนให้ cytokine signaling (SOCS1-3) เป็นเหมือนกับการถูกกระตุ้นในเยื่อบุโพรงมดลูกในระยะตั้งท้องและ IFN- $\gamma$  (Sandra et al., 2005) การควบคุมของ IFN regulatory factor 1 บริเวณเยื่อบุโพรงมดลูกในระยะตั้งท้องของโค ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 การควบคุมของ IFN regulatory factor 1 บริเวณเยื่อโพรงมดลูกในระยะตั้งท้องของโค

Endometrial cell	Day of pregnancy					Sources
	10-12	12-13	14-15	16-17	18-20	
Luminal Epithelium (LE)						
IRF 2	+	++	+++	+++	+++	Allison et al. (2005)
CST3	-	++	+++	+++	+++	Binelli et al. (2001)
ISG15	++	+	-	-	-	Choi et al. (2001)
IF16	-	-	-	+++	+++	Johnson et al. (2000)
MUC1	+	+++	++	+	-	Bekisz et al. (2004)
Glandular Epithelium (GE)						
STAT 1, STAT 2	-	-	++	+++	+++	Binelli et al. (2001)
IRF 1, IRF 9	-	-	++	+++	+++	Choi et al. (2001)
CST3	-	-	++	+++	+++	Roberts et al. (1997)
IFIH1	-	+	++	+	-	Johnson et al. (2000)
GBP2	-	-	++	++	++	Bekisz et al. (2004)
Stroma (ST)						
STAT 1, STAT 2	-	-	++	+++	+++	Asselin et al. (1997)
IRF 1, IRF 9	-	-	++	+++	+++	Choi et al. (2001)
ISG15	-	-	++	+++	+++	Binelli et al. (2001)
IFIH1	-	+	+++	++	+	Johnson et al. (2000)
RSAD2	-	+	++	+++	+++	Bekisz et al. (2004)

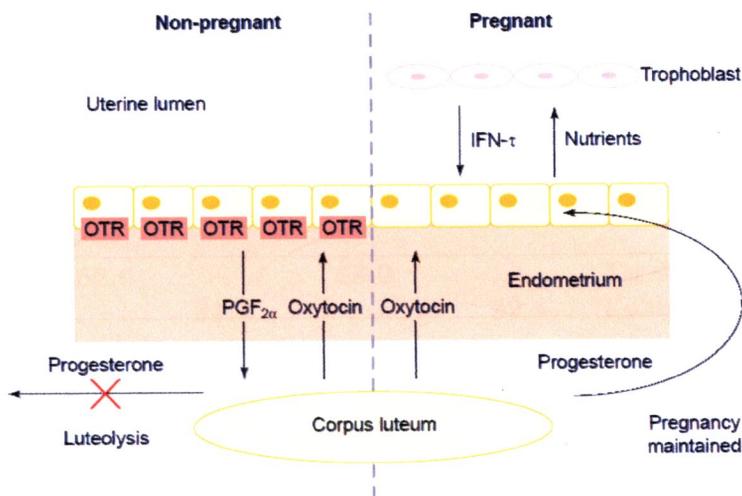
#### 2.4.3 กลไกทางชีววิทยาของ IFN- $\tau$ ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ในสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสัตว์ที่มีวงรอบการตกไข่ตามวงรอบการเป็นสัด โดยเมื่อมีการสลายของ CL และจากนั้นจึงมีการเริ่มวงรอบการเป็นสัดวิใหม่ (Spencer et al., 2004) ในระหว่างช่วงสุดท้ายของการเป็นสัด diestrus (วันที่ 13-15 post-estrus ในแกะ วันที่ 17-20 post-estrus ในโค) จะเกิดการหลั่งของฮอร์โมนออกซิโทซินโดยอาศัยความถี่ของ PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ CL (Flint et al., 1992) โดยฮอร์โมนออกซิโทซินถูกสร้างและเก็บใน CL

และตอบสนองต่อการกระตุ้นของ  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ด้วยเหตุนี้ในแต่ละครั้งของการหลั่ง  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ใน luminal และ superficial glandular epithelium จึงเป็นแหล่งของ  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ในระหว่างเกิดการเสื่อมสลายของ CL และ ฮอร์โมนออกซิโตซินจะสามารถตอบสนองต่อเซลล์เป้าหมายโดยการจับกับตัวรับที่บริเวณพลาสมา เมมเบรน (plasma membrane) ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ CL (Spencer et al., 2004)

ประการแรกของ  $\text{IFN-}\tau$  ในช่วงเริ่มแรกของการตั้งท้องจะทำการยับยั้งการหลั่งของฮอร์โมนออกซิโตซินจากเซลล์ในเยื่อบุโพรงมดลูกระหว่างการตั้งท้องตัวรับออกซิโตซินในเยื่อบุโพรงมดลูกชั้น LE และ GE ทำให้ไม่มีการเกิด luteolysis (Spencer et al., 1997) ทำให้การหลั่งของ  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ลดลงอย่างมาก ในโคที่มีการตั้งท้อง  $\text{IFN-}\tau$  สามารถเหนี่ยวนำให้การทำงานของตัวรับออกซิโตซินและการทำงานของตัวรับออกซิโตซินให้ลดลงอย่างมาก (Robinson et al., 1999; Robinson et al., 2001) เพราะฉะนั้นอิทธิพล  $\text{IFN-}\tau$  จึงมีความสามารถในการลดการทำงานของตัวรับออกซิโตซินภายในเยื่อบุโพรงมดลูกให้ลดลง

ประการที่สอง  $\text{IFN-}\tau$  จะช่วยในการสนับสนุนการทำงานของ luteal ในเยื่อบุโพรงมดลูกโดยทำให้ไม่ถูกสลายไปโดยฮอร์โมน prostaglandins โดยจะควบคุมปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน  $\text{PGF}_{2\alpha}$  บริเวณหลอดเลือดที่มาเลี้ยงบริเวณเยื่อบุโพรงมดลูก (Pratt et al., 1977) ซึ่งพบว่า  $\text{IFN-}\tau$  ซึ่งเป็นโปรตีนที่หลั่งจากโทรโพลลาสสามารถยับยั้งการสังเคราะห์  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ได้ เมื่อ CL ไม่ถูกสลายจะทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนคงที่อยู่ระดับสูงทำให้มดลูกพร้อมที่จะเกิดการฝังตัวของเอ็มบริโอ (Pratt et al., 1979; Kristina et al., 2001) ดังแสดงในภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 ความสัมพันธ์ระหว่างมดลูก ฮอร์โมน และการส่งสัญญาณ  $\text{IFN-}\tau$  ในการยอมรับการตั้งท้อง

ที่มา: Kristina et al. (2001)

#### 2.4.4 อิทธิพลของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอและการแสดงออกของจีน IFN- $\tau$

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแบบภายนอกตัวสัตว์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์การพัฒนาของเอ็มบริโอและการแสดงออกของจีน IFN- $\tau$  โดยการเพาะเลี้ยงโอโอไซตในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ ก๊าซคาร์บอน ความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้เพาะเลี้ยง จากการรายงานของ Mann and Lamming (2001) ได้ทดลองโดยเสริม recombinant bovine IFN- $\tau$  (rbIFN- $\tau$ ) (100 ng/ml) ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอโดยเสริม 0.3% BSA และ 10% FBS เพื่อดูการพัฒนาของเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยง และการสังเคราะห์โปรตีน IFN- $\tau$  จากการศึกษาปริมาณในเนื้อเยื่อ พบว่าการใช้ชนิดของ serum ทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kubisch et al. (2001) พบว่าเมื่อทำการเสริม rbIFN- $\tau$  ที่ระดับ 100 ng/ml พบว่าการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิส มีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ที่ระดับ 50 ng/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการเสริม rbIFN- $\tau$  มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิส โดยทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิส มีแนวโน้มสูงขึ้น

ตารางที่ 2-3 ผลของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการแสดงออกทางสรีรวิทยาในระยะเวลากการ พัฒนาของเอ็มบริโอ

Items	TCM199 เสริม 0.3% BSA		TCM199 เสริม 10% FBS		References
	rbIFN- $\tau$ (ng/ml)		rbIFN- $\tau$ (ng/ml)		
	100	50	100	50	
Percentage Blastocyst	50.0	-	50.6	-	Mann and Lamming (2001) Kubisch et al. (2001)
	-	24.0	-	29.6	
Percentage hatching	52.0	-	69.0	-	Takahashi et al. (2003) Kubisch et al. (2001)
	-	31.1	-	39.4	
Blastocyst diameter ( $\mu\text{m}$ )	200.0 <sup>a</sup>	130.0 <sup>b</sup>	-	-	Caroline et al. (2002)
Trophoblast area ( $10^6 \mu\text{m}^2$ )	-	-	165-170 <sup>a</sup>	85-90 <sup>b</sup>	Stojkovic et al. (1995)
IFN- $\tau$ secretion (ng/ml)	-	-	61.6 <sup>a</sup>	14.8 <sup>b</sup>	Kubisch et al. (2001) Caroline et al. (2002)
	30.0 <sup>a</sup>	17.0 <sup>b</sup>	-	-	

เมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มของขนาด โดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอ็มบริโอ ระยะบลาสโตซิส พบว่าเมื่อเอ็มบริโอได้รับการเสริม rbIFN- $\tau$  ที่ระดับความเข้มข้นที่ 100 ng/ml และ 50 ng/ml เอ็มบริโอมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 130.0  $\mu\text{m}$  และ 200.0  $\mu\text{m}$  ตามลำดับ (Caroline et al. 2002) โดยพบว่าระดับการเสริม rbIFN- $\tau$  มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ เอ็มบริโอ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอ็มบริโอที่ระดับ 100 ng/ml มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอ็มบริโอที่สูงกว่าการเสริม rbIFN- $\tau$  ที่ระดับ 50 ng/ml นอกจากนี้ Stojkovic et al. (1995) รายงานผลการวัดพื้นที่ผิวเซลล์ของโทรโฟบลาส พบว่าเมื่อเอ็มบริโอ ได้รับการเสริม rbIFN- $\tau$  ที่ระดับความเข้มข้นที่ 100 ng/ml และ 50 ng/ml เอ็มบริโอมีขนาด พื้นที่ผิวเซลล์ของโทรโฟบลาส มีค่าเท่ากับ 165-170 ( $10^6 \mu\text{m}^2$ ) และ 85-90 ( $10^6 \mu\text{m}^2$ ) โดย พบว่ามีความแตกต่างกัน

ส่วนการแสดงออกของจีน IFN- $\tau$  จากโทรโฟบลาสโดยการเพาะเลี้ยงโอโอไซต ในตู้เพาะเลี้ยง จากการทดลองของ Kubisch et al. (2001) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ เป็นเวลาจนถึงวันที่ 7 มี trophoblastic vesicles เมื่อการพัฒนามาถึงวันที่ 9 จากนั้นมีการ เสื่อมสภาพไป โดยพบว่าการสังเคราะห์ IFN- $\tau$  สูงสุดที่วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณอยู่ ระหว่าง 17-30 ng/ml นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณการสังเคราะห์โปรตีน IFN- $\tau$  จาก โทรโฟบลาสจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซตในตู้เพาะเลี้ยง ในวันที่ 7 อยู่ระหว่าง 61.6-14.8 ng/ml

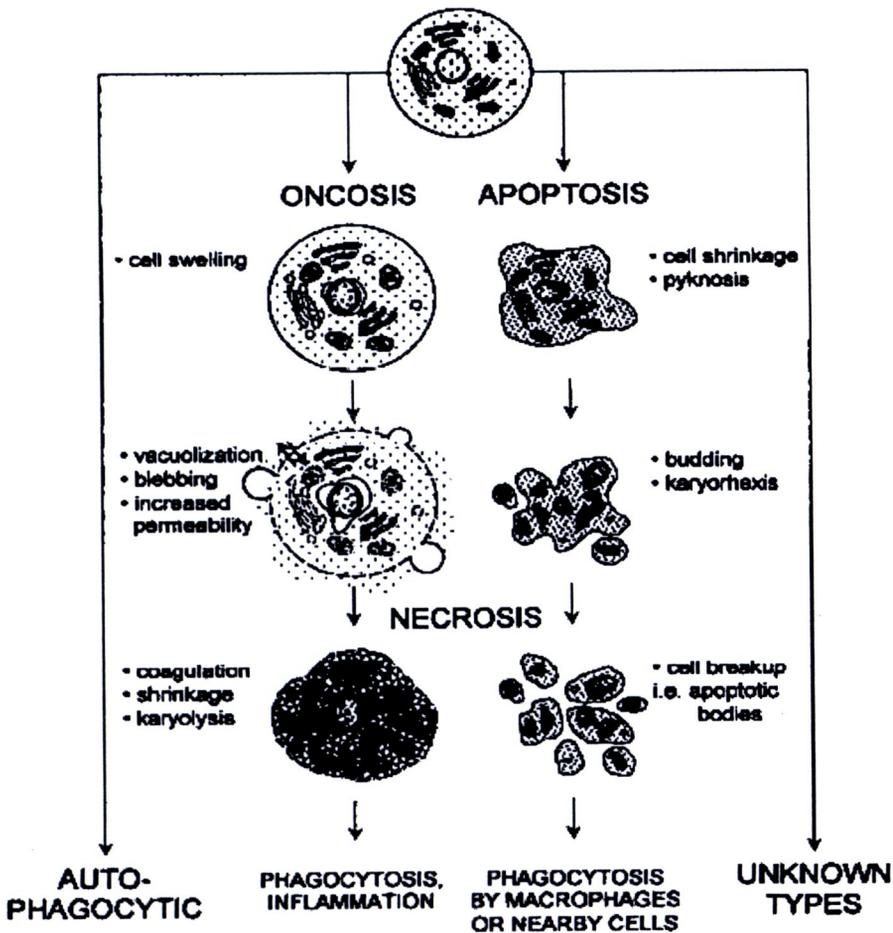
## 2.5 การตายของเซลล์ (Cell death)

การศึกษาและได้มีการอธิบายรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่มีการตายของเซลล์ ไว้เมื่อกว่า ร้อยปีที่ผ่านมาและเรียกว่า “chromatolysis” และหลังจากนั้นก็มีการรายงานออกมาเรื่อยๆ ส่วน ใหญ่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของทารกในครรภ์ (embryogenesis) แต่ยังไม่มีการศึกษาอย่าง จริงจัง จนกระทั่งในปี 1972 Kerr และคณะ ได้รายงานว่าพบเซลล์ที่ตายและมีลักษณะดังกล่าว ทั้งในเนื้อเยื่อที่มีพยาธิสภาพและเนื้อเยื่อปกติและได้ตั้งชื่อว่า อะพอพอโทซิส หรือ apoptotic cells โดยเขาได้สังเกตปฏิกิริยาของเซลล์จากตับหนูที่เกิด ischemic injury และพบปรากฏการณ์การ ตายของเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ นิโครซิส (necrosis) และอะพอพอโทซิส (apoptosis)

### 2.5.1 การตายของเซลล์แบบนี้โครซิส

ปรากฏการณ์นี้โครซิสเซลล์จะบวมขึ้น ผนังเซลล์จะสูญเสียหน้าที่ นิวเคลียส (nucleus) และออร์แกเนลล์ (organelles) บวม เซลล์จะเกิดการแตกสลายทำให้เอนไซม์ไหลออก จากเซลล์ และมีปฏิกิริยาทำอันตรายกับเซลล์ข้างเคียงและเนื้อเยื่อข้างเคียงก่อให้เกิดการอักเสบใน บริเวณนั้น ส่วนอะพอพอโทซิส นั้นเป็นการตายของเซลล์ที่มีการตั้งโปรแกรมไว้ล่วงหน้าแล้ว

(programmed cell death หรือ cell suicide) เป็นกลไกในการกำจัดเซลล์ที่ตายตามกำหนดการตายแบบอะพอพโทซิสนี้เป็นกลไกทางสรีรวิทยาที่สำคัญของร่างกายในการกำจัดเซลล์ที่หมดอายุ โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ใกล้เคียงโดยมีกลไกที่เกี่ยวข้อง คือ มีการแสดงออกของจิ้นควบคุมกับการเปลี่ยนแปลงในเซลล์อะพอพโทซิส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นี้จะถูกร่างกายกำจัดออกไป อะพอพโทซิสมีลักษณะทางด้านทางสัณฐานวิทยา คือ มีการอัดแน่นของโครมาติน อยู่ขอบของนิวเคลียสหรือเป็นก้อนทึบที่มีรูปร่างและขนาดต่างๆ กัน เซลล์อะพอพโทซิสมีขนาดเล็ก กลมรูปร่างกลมและหดตัว ไซโตพลาสซึมอัดแน่น ไมโครวิลไลที่ผิวของเซลล์หายไป และมี cytoplasmic blebs เกิดขึ้น cytoplasmic organelles อัดแน่นเซลล์กลายเป็นเสี้ยวๆ เซลล์เสียการปะติดปะต่อกับเซลล์ข้างเคียง แต่ไม่มีการอักเสบมาเกี่ยวข้อง เซลล์ตายจะถูกกำจัดโดยวิธีการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) ดังแสดงในภาพที่ 2-8

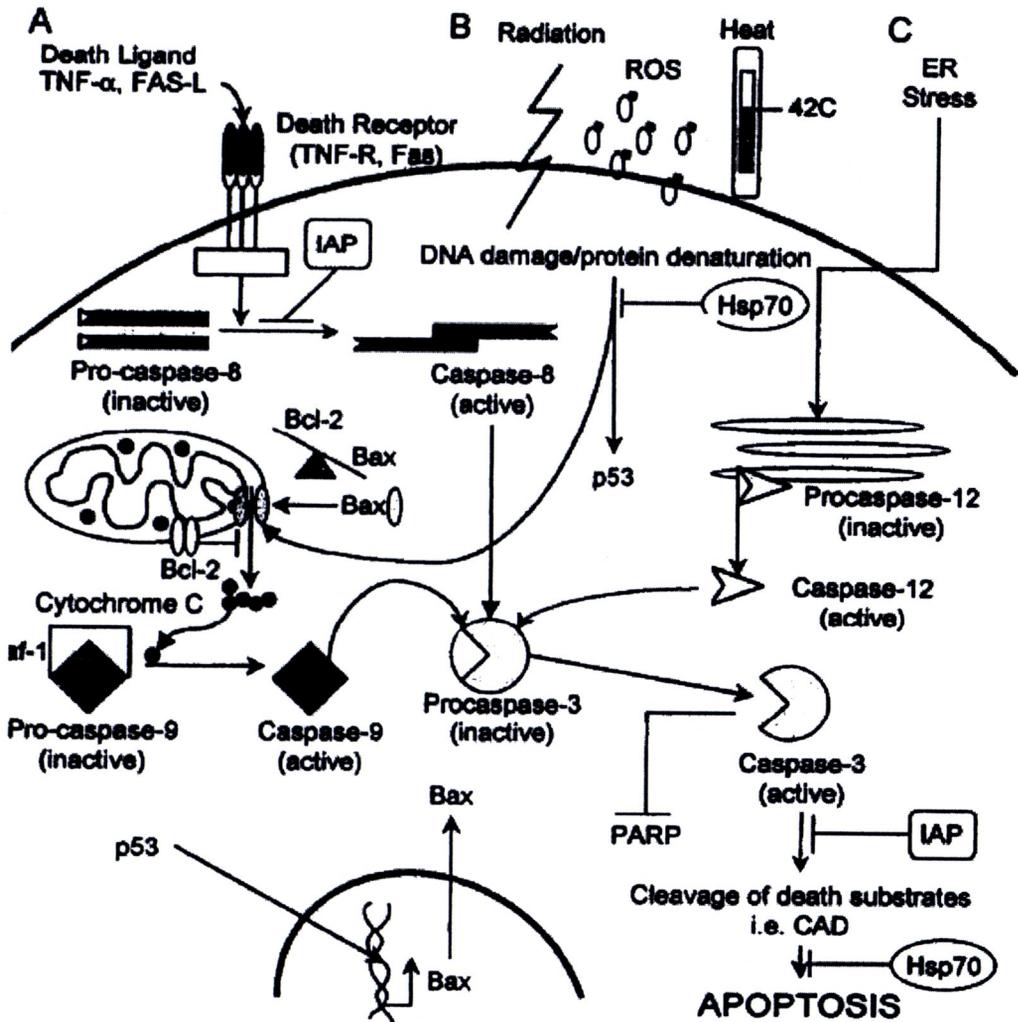


ภาพที่ 2-8 ลักษณะการตายของเซลล์แบบนีโครซิส และอะพอพโทซิส  
ที่มา: Bett and King (2001)



## 2.5.2 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

ในเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน การเกิดอะพอพโทซิสเกิดจากการรับสัญญาณกระตุ้นจากรีเซพเตอร์บนผิวเซลล์ เช่น Fas (CD95) ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ชนิด homotrimeric ต่อไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด tumor necrotic factor เมื่อ ligand ของ Fas (FasI) จับกับ Fas เกิดการจับกลุ่มของ Fas ส่วนที่เชื่อมต่อกับไซโตรพลาสมิซึมของเซลล์ที่เรียกว่า death domain ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของโปรตีน FADD (Fas associated death domain) ภายหลัง FADD จับกัน จะไปกระตุ้น procaspase ชนิดหนึ่งคือ procaspase-8 ซึ่งจะจับรวมกับ FADD เกิดเป็นกลุ่มของโมเลกุลระหว่าง FADD และ procaspase-8 แล้วเกิดการย่อยสลายของโมเลกุลกลุ่มนี้ทำให้ procaspase-8 กลายเป็นโมเลกุล caspase-8 ที่ active ซึ่งจะไปกระตุ้น caspase-3 และ caspase ชนิดอื่นๆ ต่อไปในกระบวนการอะพอพโทซิส สำหรับปัจจัยภายในเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอพโทซิส นั้นไมโทคอนเดรียมีส่วนสำคัญเป็นอย่างมาก แต่มีกลไกการเกิดต่างจากการเกิดของ death domain ที่มีการ procaspase-8 เป็นหลัก ปัจจัยไมโทคอนเดรียที่นำออคัย caspase-9 เป็นหลัก โดยพบว่าโปรตีน CED-4 ที่เรียกว่า Apaf-1 (apoptosis protease factor) ทำหน้าที่เกิดการจับกลุ่มของโมเลกุล procaspase-9 เกิดการย่อยสลายของ procaspase-9 โดยมี CARD (caspase recruitment domain) ซึ่งปกติจะยังไม่ทำงาน จะทำงานก็ต่อเมื่อมีสัญญาณภายในเซลล์ที่เรียกว่า death signals เช่น cytochrome C ที่เป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญในการสร้างพลังงาน ATP ภายในไมโทคอนเดรียเมื่อเกิดหลุดออกจากไมโทคอนเดรีย พลังงาน ATP และ cytochrome C จะไปกระตุ้น Apaf-1 และ caspase-3 ในการรวมกัน ทำให้ procaspase-9 รวมกลุ่มเข้าด้วยกัน เกิดเป็น caspase-9 ที่ active ไปกระตุ้น caspase-3 ในการเกิดอะพอพโทซิส กระบวนการรวมกลุ่มของ CARD-Apaf-1 และ procaspase-9 ทำให้เกิดการ active caspase ตามมานั้นซับซ้อนมาก มีปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้องกันมากมาย เช่น Ced-3, Ced-4, Apaf-1 และปัจจัยยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส (Bett and King., 2001) เช่น CED-9, BCL-2 รวมเรียก anti-apoptosis protein จัดอยู่ในกลุ่ม BCL-2 hemology (BH) BCL-2 เป็นโปรตีนสร้างจาก oncogen (BCL-2) ชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิด B-cell lymphoma การเกิดโปรตีน BCL-2 และ CED-9 ทำให้ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิสได้โดยโปรตีน BCL-2 จะคอยป้องกันไม่ให้ cytochrome C หลุดออก แม้ว่าจะจับกับ Apaf-1 และจับกับ procaspase-9 ได้ แต่ไม่เกิด caspase-9 ที่ active ทั้งนี้เพราะมี BCL-2 ไปจับรวมกับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า BAX ซึ่งเป็นโปรตีน pro-apoptotic ทำให้ Apaf-1 เป็นอิสระ จากการจับตัวกับ BCL-2 เกิดการรวมตัวของ Apaf-1 และ CARD และ procaspase-9 ตามมาในที่สุด โดยกลไกการเกิดอะพอพโทซิส แสดงในภาพที่ 2-9

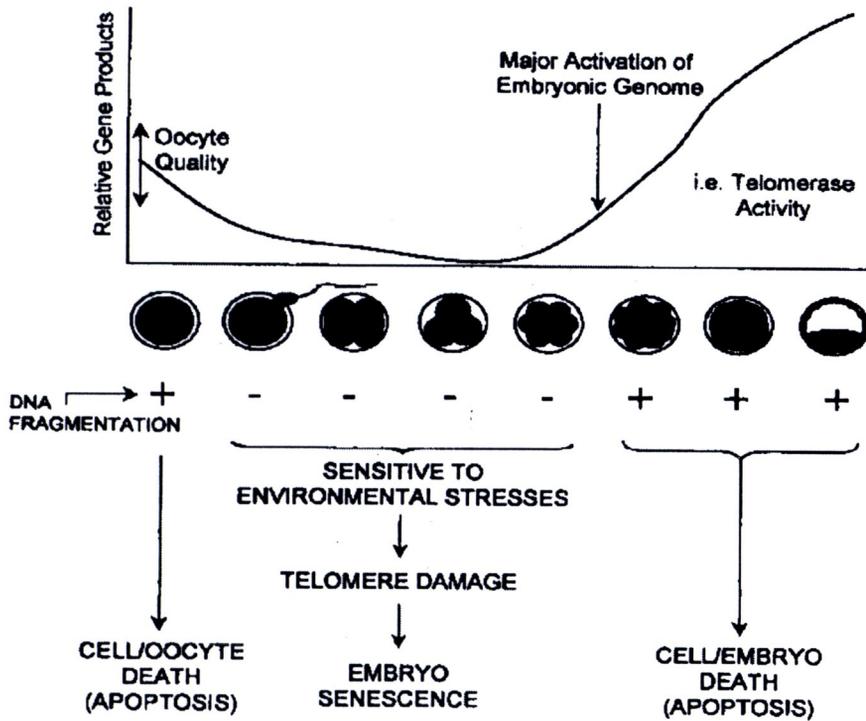


ภาพที่ 2-9 กลไกการเกิดการตายของเซลล์  
ที่มา: Bett and King (2001)

## 2.6 การตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์เอ็มบริโอที่พัฒนา

ในเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาในระยะที่มีการเจริญเติบโตในสภาพการเลี้ยงภายนอกร่างกาย โดยทั่วไปจะมีการเจริญและพัฒนาโดยมีความจำเพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งในระยะที่มีการพัฒนาในชั้นตอนดังกล่าว จะมีกระบวนการในการ transcription โดยเป็นกระบวนการหลักในการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะแรก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการทำการเลี้ยงเอ็มบริโอภายใต้สภาวะที่อยู่ภายนอกตัวสัตว์มักจะเกิดการ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นได้ โดยการเกิดสภาวะล้มเหลวในชั้นตอนดังกล่าวสามารถเป็นสาเหตุในการเกิดการตายของเซลล์ได้ เมื่อมีการพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะที่มีการแบ่งเป็น 8 เซลล์จนถึงการพัฒนาระยะ permanent diapause พบว่ามีการตายแบบอะพอโทซิสและนีโครซิส โดยเมื่อมีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอซึ่งเป็นลักษณะการตายของ

เซลล์ที่เกิดจากกลไกในการเกิดการตายของเซลล์ที่เกิดตามอายุของเซลล์ ในระยะเอ็มบริโอมีการพัฒนาจากระยะมอรูลา-ระยะบลาสโตซิส นั้นการตายของเซลล์นั้นสามารถเกิดการทํางานของ telomerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดที่เป็นสัญญาณให้เกิดการตายของเซลล์ ในลักษณะการตายของเซลล์แสดงในภาพที่ 2-10



ภาพที่ 2-10 แสดงสภาวะที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เอ็มบริโอที่พัฒนา  
ที่มา: Bett and King (2001)

## 2.7 โปรตีน BCL-2

โปรตีน BCL-2 เป็นโปรตีนสร้างจากองโคจีน (oncogen) ชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิด B-cell lymphoma โมเลกุลโครงสร้างมีน้ำหนัก 25-26 kDa โดย BCL-2 family ของโปรตีนมีจำนวนมาก ได้มีการแบ่งโดยใช้โครงสร้างและหน้าที่ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 Prosurvival protein

กลุ่มที่ 2 Proapoptotic proteins

กลุ่มที่ 3 Proapoptotic protein BCL-3 subfamily

## ตารางที่ 2-4 การจำแนกกลุ่มของโปรตีน BCL-2

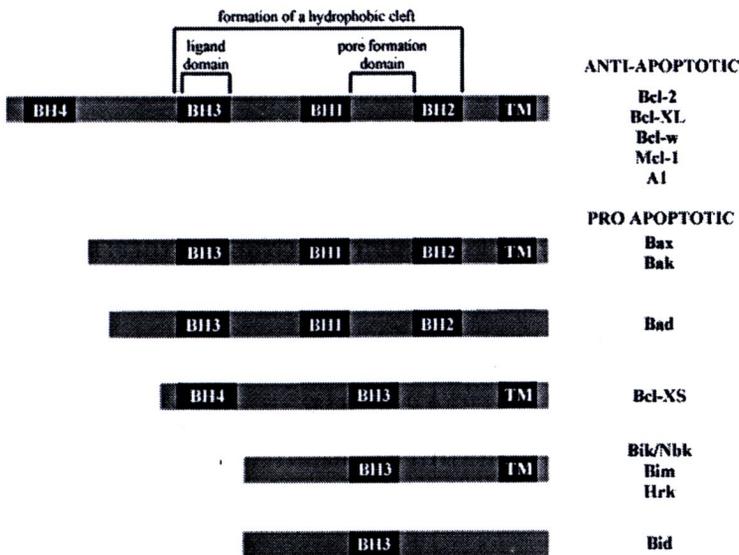
Items	Membrane anchor	Pore-forming ability
<b>Group I Prosurvival protein</b>		
BCL-2	yes	yes
BCL-XL	yes	yes
BCL-W	yes	yes
<b>Group II Proapoptotic proteins</b>		
BAX	yes	yes
BAK	yes	yes
BOK	yes	yes
<b>Group III Proapoptotic protein BCL 3 subfamily</b>		
BIK	no	no
BLK	no	no
HRK	no	no
BAD	no	no
BID	no	no

ที่มา: Gross et al. (1999)

โปรตีน BCL-2 ควบคุมความอยู่รอดของเซลล์ได้หลายวิธี คือ directly alter mitochondrial function ของ permeability transition (PT) pores ที่ไมโทคอนเดรียทำให้มีการหลั่งของ apoptosis-promoting substances เช่น proapoptotic C ดังแสดงในภาพที่ 2-10 ซึ่งจะถูกยับยั้งโดย prosurvival proteins (Group I BCL-2 proteins) และถูกกระตุ้นโดย proapoptotic protein (Group II, III BCL-2 protein) ดังนั้นการที่เซลล์จะมีชีวิตอยู่หรือตาย (survived or death) จากอะพอพโทซิสส่วนหนึ่งต้องอาศัยความสมดุลของ prosurvival และ proapoptotic BCL-2 family members ภายหลังจากการหลั่งของ cytochrome C เข้าไปใน cytosol จะเกิดเป็น complex ที่เรียกว่า apoptosome ซึ่งจะไปกระตุ้น caspase แล้วเกิดนีโครซิส โดย cleaving specific cell proteins

การศึกษาและใช้การเพิ่มการแสดงออกของ BCL-2 ในเซลล์จากการทำงานของไมโทคอนเดรีย จากการศึกษาพบว่า mitochondrial membrane potential และการแสดงออกของฟอสฟาติลเซอรีนถูกยับยั้งโดย BCL-2 ในขณะที่การแตกออกของดีเอ็นเอและการทำงานของเอ็นไซม์ caspase-3 ไม่ถูกยับยั้งใดๆ และเมื่อศึกษาถึงกลไกการแสดงออกของฟอสฟาติลเซอรีน พบว่าระดับของ ATP ภายในเซลล์ที่เพิ่มการแสดงออกด้วย BCL-2 มีระดับสูงขึ้นและถูกรักษาให้คงที่ทั้งที่กระตุ้นให้เกิดการตายด้วย anti-Fas antibodies การเพิ่มขึ้นของ ATP นี้ พบว่าเกิดขึ้นจากการทำงานของไมโทคอนเดรียเนื่องจากสามารถลดระดับลงได้ด้วย

ตัวที่ยังที่จำเพาะต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย ระดับของพลังงานที่ถูกรักษาไว้ในเซลล์ที่เพิ่มการแสดงออกของ BCL-2 นี้ อาจเป็นไปได้ว่าเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ aminophospholipid translocase ที่ทำหน้าที่ขนส่งฟอสฟาติดีลเซอรินจากเยื่อผิวด้านนอกเข้ามาที่เยื่อผิวด้านใน ระดับฟอสฟาติดีลเซอรินที่ลดลงนี้ยังส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการกำจัดเซลล์ที่ตายลดลงจากทั้ง เซลล์ฟาโกไซโทซิสที่ได้จากคน และที่ได้จากหนู โดยที่เซลล์ที่ตายนี้มีลักษณะของการแตกออกของดีเอ็นเอและมีการทำงานของเอ็นไซม์ caspase-3 แล้วก็ตาม จากผลดังกล่าวบ่งบอกว่าการแสดงออกของฟอสฟาติดีลเซอริน มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการกำจัดเซลล์ที่ตายโดยกระบวนการอะพอพโทซิส และยังสามารถสรุปได้ว่าการแสดงออกของฟอสฟาติดีลเซอริน และการจดจำโดยเซลล์ฟาโกไซโทซิสในเซลล์นี้เป็นกระบวนการที่อาจเกิดขึ้นนานหรือแยกออกจากลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิส ชนิดอื่น ๆ ได้



ภาพที่ 2-11 BCL-2 family

ที่มา: Byrne et al. (2005)

## 2.8 ผลของโปรตีน BCL-2 ต่อการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส สามารถค้นพบสาเหตุของการเกิดได้จากเซลล์ชนิดที่ต่างกันได้ 3 ประเภท ได้แก่ โอโอไซต์ (oocytes) แกรนโลซาเซลล์ (granulosa cells) และลูทีลเซลล์ (luteal cells) จากการศึกษาพบว่า การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เกิดขึ้นที่โอโอไซต์ โดยจะพบว่ามีแสดงออกมากที่สุด โดยในระหว่างเอ็มบริโอที่มีการพัฒนา ปริมาณการแสดงออกในเซลล์โอโอไซต์ ที่มีปริมาณสูงสุดในรังไข่ของหนูในวันที่ 13.5 ของระยะที่มีการตั้งท้อง อย่างไรก็ตามแล้วยังพบในบางเซลล์ของโอโอไซต์ที่มีการเจริญและพัฒนาอย่างมากเกินในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ซึ่งสามารถพบได้ในการแบ่งเซลล์ในระยะแรก

การตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์นั้นมีการรายงานถึงกระบวนการโดยเห็นเป็นที่แน่ชัด (Ratts et al., 1995) โดยยิ่งกว่านั้นแล้วยังสามารถรายงานทำให้ทราบถึงการอยู่รอดของเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาโดยมีความผันแปรไปในแต่ละสปีชีส์ของสัตว์ แต่ยังไม่ได้มีการรายงานในการตายแบบอะพอพโทซิสในสัตว์ที่เจริญเติบโตเต็มวัย โดยในการทำการทดลองในสภาวะ *in vitro* และ *in vivo* สามารถเห็นการแสดงออกของปริมาณ DNA ที่ได้จากการเกิดความเสียหาย อย่างเช่น polyaromatic hydrocarbons (PAHs) และ cytostatics ในโอโอไซต์ที่เหนียวน่าให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Matikainen et al., 2001)

จากตารางที่ 2-5 แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกทางพันธุกรรมและการล้มเหลวเนื่องจากการเกิดการตายของเซลล์ เมื่อขาดการทำงานของโปรตีน BCL-2 พบว่าเกิดความล้มเหลวเนื่องจากการเกิดการตาย อย่างมีความแตกต่างทางสถิติ โดยในโอโอไซต์ ในสัตว์ต่างชนิดและอายุที่ต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (Ratts et al., 1995) ดังนั้น BCL-2 สามารถป้องกัน การตายของโอโอไซต์ได้ โดยในการเกิดการตายของเซลล์โอโอไซต์ สามารถตรวจสอบได้โดยการแสดงออกของปริมาณของจีนของสัตว์ที่แสดงออก โดยพบว่าในตระกูลของโปรตีน pro-apoptotic BCL-2 เช่น BAX โปรตีนจะแสดงออกในโอโอไซต์ที่มีคุณภาพที่ไม่ดี (Perez et al., 1999)

ตารางที่ 2-5 ผลการแสดงออกและการถูกยับยั้งของจีน BCL-2 ต่อการทำงานของรังไข่ในสัตว์

Items	Ovarian phenotype	Sources
BCL-2 knockout	Loss of oocytes	Ratts et al. (1995)
BCL-2 transgene	Loss of ovarian apoptosis, enhanced folliculogenesis, teratomas	Hsu et al. (1996)
BCL-XL knockout	Loss of germ cells	Watanabe et al. (1997)
BAX knockout	Normal at birth, increased number of oocytes at puberty and during fertile life	Perez et al. (1999)
Caspase-2 knockout	Increased number of primary follicles	Bergeron et al. (1998)
Caspase-3 knockout	Normal number of primary follicles	Matikainen et al. (2001)