แนวทางการใช้เทคนิคโปรติโอมิกส์ในการหาตัวบ่งชี้ที่จำเพาะต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในเซมินอล พลาสมาและอสุจิ

Proteomics Tools for Fertility Biomarkers in Seminal Plasma and Spermatozoa

พัชรา ธนานุรักษ์[1] และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ[1, 2*]

Pachara Thananurak[1] and Thevin Vongpralub[1, 2*]

บทคัดย่อ: โปรติโอมิกส์ ถูกนำมาเป็นเครื่องมือในการศึกษางานด้านโปรตีน เช่น การแสดงออกของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชิงปริมาณและคุณภาพ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูง การนำเทคนิคโปรติโอมิกส์มาใช้เพื่อการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอสุจิ เช่น two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrometry และ differential in-gel electrophoresis โดยเซลล์อสุจิเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความพิเศษที่สามารถเก็บและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย อสุจิที่เจริญเต็มที่จะเกิดกระบวนการถอดรหัสและแปลงรหัสที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ และมีปริมาณการแสดงออกของโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเซลล์อสุจิ สามารถทำให้เข้าถึงการทำงานของโปรตีนในกระบวนการสร้างอสุจิทั้งในอสุจิที่ปกติและอสุจิที่ผิดปกติ นอกจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนภายในอสุจิแล้ว โปรติโอมิกส์แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายหลังการแปลงรหัสและลักษณะการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการปฏิสนธิ จึงมีการพัฒนาการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในอสุจิและเซมินอล พลาสมา เพื่อใช้ในการระบุ biomarkers เพื่อช่วยในการตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติด

คำสำคัญ: โปรติโอมิกส์, อสุจิ, ความสมบูรณ์พันธุ์

ABSTRACT: Proteomics has been used for the systemic study of proteins in a cell such as protein expression and analyses changes in quantity and quality of protein expression with high efficiency and accuracy. The used of proteomics approach to study changes of spermatozoa. Proteomics analysis is a highly sensitive method which can be used for the detection of a very small amount of protein sample with detection limit of femtomole. Moreover, this method provides very high throughput. Recently, the application of proteomic approaches such as the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrometry, and differential in-gel electrophoresis has identified several sperm-specific proteins. Spermatozoa are highly specialized cells that can be easily obtained and purified. Mature spermatozoa are transcription and translation inactive and incapable of protein synthesis. In addition, spermatozoa contain relatively higher amounts of membrane proteins compared to other cells; therefore, they are very suitable for proteomic studies. These findings have provided a further understanding of protein functions involved in different sperm processes as well as of the differentiation of normal state from an abnormal one. In addition, studies on the sperm proteome have demonstrated the importance of spermatozoa posttranslational modifications and their ability to induce physiological changes responsible for fertilization.

Keywords: proteomics, sperm, fertility

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon kaen University

[2] ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Research and development network center for animal breeding (Native chicken), Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

* Corresponding author: vthevi@kku.ac.th

บทนำ

อสุจิเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษ มีส่วนประกอบภายในที่มีลักษณะจำเพาะ และมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม การกระจายตัวของ DNA องค์ประกอบภายในเซลล์อสุจิ และโครงสร้างของโครมาติน องค์ประกอบเหล่านี้ช่วยควบคุมอัตราการผสมติด และในส่วนของการเข้าปฏิสนธิกับไข่และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจะขึ้นกับคุณภาพของอสุจิ ซึ่งส่งผลต่อการเคลื่อนที่ รูปร่าง และความเข้มข้นของอสุจิ (Park et al., 2012) ในสัตว์แต่ละชนิดมีอสุจิที่มีความแตกต่างกัน ทั้งด้านรูปร่างและกลไกการทำงานภายในเซลล์อสุจิ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีเพียงการจัดลำดับ genome เพื่อรวบรวมเป็นฐานข้อมูล ซึ่งถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการทำความเข้าใจถึงการทำงานของเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงในระดับโมเลกุล (Plessis et al., 2011)

โปรติโอมิกส์ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน โดยเฉพาะด้านโครงสร้างและการทำงานในระดับเซลล์ของโปรตีน ก่อนหน้านี้มีการนำเทคนิคโปรติโอมิกส์มาใช้ในการศึกษาเซลล์อสุจิ พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของอสุจิ ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของตัวอสุจิ อสุจิที่พัฒนาเต็มที่จะมีกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่สมบูรณ์ (Park et al., 2012) และมีการศึกษาเกี่ยวกับการหา biomarker ที่จำเพาะต่ออัตราการผสมติด โดยศึกษาจากระดับของ genome และการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่พบในอสุจิและ seminal plasma มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกื้อกูลการมีชีวิตรอดของอสุจิ รวมไปถึงการมีชีวิตรอดของอสุจิในระบบสืบพันธุ์เพศเมียและกระบวนการปฏิสนธิ (Topfer-Petersen et al., 2005)

ปัจจุบันเครื่องมือทางด้านโปรติโอมิกส์มีด้วยกันหลายวิธี เช่น two-dimensional (2D) polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrometry (MS) และ differential in gel electrophoresis ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถบอกถึงข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนที่มีความจำเพาะในอสุจิได้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงความแตกต่างของการทำงานของโปรตีนภายในเซลล์อสุจิที่ลึกซึ้ง เช่น การเคลื่อนที่, การเกิดกระบวนการ capacitation, การเกิด acrosomal reaction, การปฏิสนธิ และการปรับแต่งหลังการทรานสเลชั่นของโปรตีน เช่น phosphorylation, glycosylation, proteolytic cleavages และ matulation ได้ (Rahman et al., 2013) ซึ่งงานวิจัยทางด้านการแสดงออกของโปรตีน เป็นองค์ความรู้ใหม่ ที่จะทำให้สามารถศึกษาการทำงานและการแสดงออกที่แตกต่างกันของอสุจิ เช่น การเปรียบเทียบอสุจิปกติกับอสุจิที่อ่อนแอ, เปรียบเทียบอสุจิที่เจริญเต็มที่กับอสุจิที่เจริญไม่เต็มที่, เปรียบเทียบอสุจิที่เกิดกระบวนการ capacitation กับอสุจิที่ไม่เกิดการ capacitation, เปรียบเทียบกลุ่มอสุจิที่มีความเข้มข้นต่ำกับกลุ่มอสุจิที่มีความเข้มข้นสูง และเปรียบเทียบอสุจิที่ให้อัตราการผสมติดต่ำกับอสุจิที่ให้อัตราการผสมติดสูง (Cui et al., 2008; Jagan Mohanarao and Atreja, 2011; Xu et al., 2012) ซึ่งการศึกษาเปรียบเทียบทั้งหมดที่กล่าวมานั้นมีความสำคัญในการระบุตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดี ในบทความฉบับนี้รวบรวมเทคนิคทางโปรติโอมิกส์ต่างๆ, การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ และการนำไปใช้ประโยชน์ เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของอสุจิที่มีผลต่ออัตราการผสมติดต่อไป

เซลล์อสุจิ

อสุจิเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างขึ้นภายในอัณฑะสัตว์เพศผู้ โดยเกิดขึ้นในท่อ seminiferous ภายในท่อดังกล่าวมีเซลล์สืบพันธุ์ (germinal epithelium) และเซลล์ค้ำจุน (Sertori cell) แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการผลิตอสุจิของพ่อพันธุ์สัตว์แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์พันธุ์ สภาพแวดล้อม และฤดูกาล (Kimmins and Sassone-Corsi, 2005) ความสามารถในการผลิตอสุจิที่แตกต่างกันนั้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ภายในอสุจิ รวมไปถึงปริมาณของโครมาตินภายในโครงสร้างตัวอสุจิ (Kierszenbaum and Tres, 2004; Rousseaux et al., 2005)

เครื่องมือทางโปรติโอมิกส์ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์อสุจิ

เครื่องมือทางโปรติโอมิกส์ที่นิยมใช้ในงานวิจัยด้านอสุจิในปัจจุบัน ได้แก่ เทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) คือ การแยกโปรตีนที่อยู่ในสภาวะของเหลวด้วยวิธี liquid chromatography และมีการเกิด ion source แบบ electrospray ionization (ESI) ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry โดยมวลสารถูกตรวจวัดในส่วน mass analyser นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถเปรียบเทียบในเชิงปริมาณได้ จึงมีประโยชน์ในด้านการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในสภาวะที่แตกต่างกัน (Becker and Bern, 2010) และ เทคนิค Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Zumoffen et al., 2013) หรือ tendem MS (MS/MS) คือ การทำให้ตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนก่อนการวิเคราะห์ โดยผสมตัวอย่างกับ matrix ได้แก่ α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เครื่องมือนี้ สะดวกและรวดเร็วกว่า LC-MS แต่ถูกจำกัดด้วยปริมาตรของสารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ในสถานะของแข็งได้ (Pixton et al., 2004; Martinez-Heredi et al., 2006; Li et al., 2007)

โปรตีนที่แสดงออกภายในเซลล์อสุจิ

งานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่า การผสมเทียมมีอัตราการผสมติดเกิดขึ้นโดยเฉลี่ยเพียง 50% เท่านั้น ทั้งในมนุษย์และโค (Park et al., 2012) โดยยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุในระดับโมเลกุลได้ (Novac et al., 2013) จากการศึกษาที่ผ่านมามีการตรวจวิเคราะห์ถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ โดยใช้วิธีแบบพื้นฐาน เช่น ประเมินการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Bonde et al., 1998) การเคลื่อนที่ (Budworth et al., 1988) การวิเคราะห์ mucus penetration test (Aitken et al., 1985) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Thundathil et al., 1999) การเกิด acrosome reaction (Kjaestad et al., 1993) พลังงาน ATP ภายในเซลล์อสุจิ (Sooderquist et al., 1991) และความสามารถของอสุจิในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ (Braundmeire et al., 2004) แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ ยังไม่สามารถอธิบายถึงความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการหาตัวบ่งชี้โดยอาศัยการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์อสุจิที่มีผลต่อความสมบูรณ์ของอสุจิ อาจเข้ามาเป็นตัวช่วยในการตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถของอสุจิในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ มีการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีนบริเวณต่างๆ ของตัวอสุจิ เพื่อประกอบการพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนที่แสดงออกและจุดกำเนิดของโปรตีนนั้นๆ เพื่อให้สอดคล้องต่อการวิเคราะห์ความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ (Rahman et al., 2013) และแสดงใน **Table 1**

Table 1 Summary of major proteomic studies to define the fertile male (animal models).

Sample	Proteomic technique	Study outcome	Authors
Accessory sex gland fluid (dairy bull)	LC-MS/MS	Identification of isoforms of osteopontin and phospholipase A2 (PLA2) in high-fertility bulls	Moura et al., 2006
Mouse spermatozoa	MS/MS	Identification of 100 proteins that are expressed on mature sperm at the site of sperm-oocyte interactions	Stein et al., 2006
Accessoey sex gland fluid (Holstein)	LC-MS/MS	Increased expression of bovine seminal plasma protein identified in high-fertility bulls	Moura et al., 2007
Rat spermatozoa	LC-MS/MS	Identification of 5123 peptides from rat spermatozoa	Baker et al., 2008
Bull spermatozoa (Holstein)	LC-MS/MS	Identification of proteins of impaired sperm function due to elevated testicular temperature, with important implications for fertility predictions	Newton et al., 2009
Mouse spermatozoa	MS/MS	Identification of capacitation-associated changes in the phosphorylation status (55 in vivo sites) of mouse sperm proteins	Piatt et al., 2009
Mouse spermatozoa	PMF, LC-MS/MS	Identification of 100 proteins of capacitation	Nixon et al., 2009
Stallion spermatozoa	LC-MS/MS	identified proteins within sperm and seminal plasma that could serve as biomarkers of semen quality and fertility	Novak et al., 2010
Mouse spermatozoa	LC-MS/MS	Identification of 52 proteins following capacitation	Baker et al., 2010
Mouse spermatozoa	MS/MS	Identification of 299 testis-specific proteins and detection of 155 novel proteins involved in spermiogenesis	Guo et al., 2010
Boar spermatozoa	LC-MS	Identification of proteins from the sperm surface that are responsible for binding of the sperm to the oocyte	Belleannee et al., 2011
Bull spermatozoa (Brahman)	LC-MS/MS	Identification of tektin-4 following motility	Thepparat et al., 2012
Bull spermatozoa (Brahman)	LC-MS/MS	Different expression in mature bovine proacrosin binding protein (sp32)	Thepparat et al., 2012
Bull spermatozoa	LC-MS/MS	Identification of 131 proteins to differentiate normal and pyriform sperm	Shojaei Saadi et al., 2013
Chicken spermatozoa	MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF MS	Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing–thawing treatment	Cheng et al., 2015
Boar	MALDI-TOF MS	characterized the peptidome of epididymal spermatozoa from boar	Labas et al., 2015

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS: liquid chromatography -mass spectrometry; MS/MS: tandem mass spectrometry; PMF: peptide mass fingerprints; MALDI-TOF MS: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. (modified from Rahman et al., 2013)

โปรตีนตัวบ่งชี้ (biomarkers) ถึงความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถในการสืบพันธุ์ของอสุจิ

Park et al. (2012) ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในอสุจิโคที่มีอัตราการผสมติดสูงเปรียบเทียบกับอสุจิโคที่ให้อัตราการผสมติดต่ำ เพื่อศึกษาแบบแผนโปรตีนที่แสดงออก พบว่า ในอสุจิโคกลุ่มที่ให้อัตราการผสมติดสูง มี enolase-1, ATP synthase H^+, transporting mitochondrial F1 complex beta subunit, apoptosis-stimulating of p53 protein 2, alpha-2-HS-glycoprotein และ phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase เป็นโปรตีนที่เป็นตัวกำหนดกระบวนการ metabolism, การปรับแต่งภายหลังการทรานสเลชั่นของโปรตีน และการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในส่วนของกลุ่มอสุจิที่ให้อัตราการผสมติดต่ำ มีการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด คือ voltage dependent anion channel 2 (VDAC2), ropporin-1 และ ubiquinal-cytochrome-c-reducrase complex core protein 2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu et al. (2010) ที่รายงานว่า VDAC2 ก่อให้เกิดความไม่สมบูรณ์ของอสุจิ และโปรตีน ubiquinal-cytochrome-c-reducrase complex core protein 2 มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด oxidative stress และ ROS generation ภายใน mitochondria (Cocco et al., 1998) เช่นเดียวกับการรายงานของ Gaviraghi et al. (2010) พบว่า โปรตีน enolase-1, VDAC2 และ ubiquinal-cytochrome-c-reducrase complex core protein 2 มีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดในโค การศึกษาของ Peddini et al. (2008) สามารถจำแนกโปรตีนได้ 125 ชนิด ที่คาดว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติด โดยศึกษาในอสุจิโคที่ให้อัตราการผสมติดสูง พบว่าโปรตีนที่แสดงออกส่วนใหญ่ มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ energy metabolism, cell communication, spermatogenesis และการเคลื่อนที่ และการศึกษาของ D' Amours et al. (2010) ทำการศึกษาในโคสายพันธุ์ Holstein พบว่าโปรตีน adenylate kinase isoenzyme I และ phosphotidyleth-anolamine-binding protein I มีการแสดงออกและมีการกระจายตัว (64%) ในปริมาณที่มากในอสุจิโคที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ นอกจากนี้ Thepparat et al. (2012a) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในอสุจิโคสายพันธุ์ Brahman พบว่าการแสดงออกของโปรตีน tektin-4 มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีน proacrosin binding protein (sp32) มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (Thepparat et al., 2012b) และการศึกษาของ Kwon et al. (2013) ที่ทำการศึกษาในอสุจิหนู รายงานว่าโปรตีน deamino [CysI, D-ArgS] vasopressin, arginine vasopression receptor-2 agonist ส่งผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่, pH ภายในตัวอสุจิ และการแสดงออกของโปรตีน phosphor-protein kinase A substrate ลดลง แต่มีการเพิ่มขึ้นของระดับความข้นของ Ca^{2+} และมีการศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน VDAC2 และ VDAC3 โดยใช้ 4,4'-diisothiocyanostillbene-2,2'-disulfonic acid ส่งผลทำให้ลดการเคลื่อนที่ของอสุจิ, ลดอัตราการรอดชีวิต, ลดการเกิด acrosome reaction, capacitation, การแสดงออกของโปรตีน tyrosine phosphorylation ลดลง, อัตราการผสมติดลดลง และส่งผลทำให้ตัวอ่อนไม่มีการพัฒนา แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน VDACs นั้น ส่งผลดีต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ Shukla et al. (2013) รายงานว่าโปรตีน nutlin-3a ยับยั้งการทำงานของ ubiquinal-cytochrome-c-reducrase complex core protein 2 ในอสุจิ ขณะเกิดกระบวนการ capacitation และส่งผลให้ลดอัตราการผสมติดอีกด้วย Labas et al. (2015) ทำการศึกษาในอสุจิสุกร พบว่าการแสดงออกของโปรตีน A-kinase anchor protein 4 isoform x1 (AKAP4) ที่แสดงออกบริเวณหาง มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่, กระบวนการ capacitation และกระบวนการ acrosome reaction และมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีน acrosomal protein sp-10 precusor บริเวณ AKAP3

binding ส่วน acrosome (Brown et al., 2003) และสามารถจับกับโปรตีน cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit (PRKAR2A) บริเวณหางของอสุจิ (Loconi et al., 2011) และการแสดงออกของโปรตีน LOC100626147; Leucine-rich reprat containing protein 37A-like ที่แสดงออกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถไปจับกับ AKAP3 ที่แสดงออกมาได้ (Lea et al., 2004) ในส่วนของโปรตีน sperm acrosme membrance-assoiciated protein I precursor (SPACA1) ที่บริเวณเยื้อหุ้มเซลล์ส่วน acrosome ช่วยกระตุ้นให้อสุจิเจริญได้อย่างเต็มที่ (Baker et al., 2011) Cheng et al. (2015) ได้ทำการศึกษาในอสุจิแบบอสุจิสดและอสุจิที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งในไก่สายพันธุ์พื้นเมืองไต้หวัน พบว่าโปรตีน fructose-bisphosphate aldolase C, triosephosphate isomerase, aconitata hydrotase, tuburin และ outer-dense-fiber protein มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพลังงานและการสร้างโครงสร้างส่วนหางของอสุจิไก่ เช่นเดียวกับการรายงานของ O'Donnell and O'Bryan (2014) พบว่า Tuburin α-3 มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวบริเวณหางของอสุจิ นอกจากนี้ Pixton et al. (2004) รายงานว่า ระดับของ outer-dense-fiber protein 2 ที่มีการแสดงออกในปริมาณมาก ส่งผลให้อัตราการผสมติดที่ทำการศึกษาในหลอดทดลองลดต่ำลงในมนุษย์ ในส่วนของอสุจิไก่ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง พบว่ามีการลดลงของกระบวนการ metabolism ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ fructose-bisphosphate aldolase C, triosephosphate isomerase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, L-lactate dehydrogrnase, NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit, creatine kinase (CK) และ cytochrome Bc1 complex และเพิ่มระดับ aconitate hydratase Cheng et al. (2015) ได้ทำการจำแนกโปรตีน phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP-1) และ homer protein homolog 1-like (Homer-1 like) ได้เป็นครั้งแรกในอสุจิไก่ โดยระดับของโปรตีน PEBP-1, Homer-1 like และ protein kinase C (PKC) inhibitor จะลดลงภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็ง โดย PEBP-1 ทำหน้าที่เป็น receptor ของปฏิกิริยา decapacitation ซึ่งจะพบบริเวณส่วนหัว (acrosomal cap และ postacrosomal region) และบริเวณหางของอสุจิหนูและมนุษย์ (Gibbons et al., 2005; Fraser et al., 2006) มีรายงานถึงการลดลงของปริมาณ PEBP-1 ทำให้เกิดปฏิกิริยา capacitation-like change (cryocapacitation) ภายในอสุจิ ส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติดลดลงในโค (D'Amours et al., 2010) Yuan et al. (2003) รายงานว่าโปรตีน Homer 1a มีผลไปยับยั้งการแลกเปลี่ยน Ca^{2+} ภายในอสุจิ, รบกวนการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction, และลดอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ Ashizawe et al. (2006) รายงานว่า การทำงานของ PKC inhibitor ไปลดอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่ แสดงให้เห็นว่าการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน PEBP-1, homer-1 like และ PKC inhibitor นั้น จะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งลดลงตามไปด้วย (Cheng et al., 2015)

ในปี ค.ศ. 2010 ที่ผ่านมา Novak et al. (2010) มีการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีน เพื่อใช้เป็น biomarkers ในการพยากรณ์ความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติดในอสุจิและ seminal plasma โดยใช้อสุจิม้าเป็นกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา พบว่าโปรตีนที่แสดงออกใน seminal plasma ได้แก่ Kallikrein-1E2, seminal plasma protein 1 (SP1) และ seminal plasma protein (SP2) มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติด เช่นเดียวกับการศึกษาในสุกร พบว่าโปรตีน AWN1, PSP1 และ osteopontin ภายใน seminal plasma มีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราการผสมติด และโปรตีน IGF-1 ใน seminal plasma มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิม้า (Macpherson et al., 2002) และมีการศึกษาในอสุจิหนู พบว่าโปรตีน IGF-1 ไปลด

การทำงานของฮอร์โมน testosterone และลดการสร้างอสุจิ (Baker et al., 1996) การแสดงออกของโปรตีน cystein-rich secretory protein 3 (CRISP3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกในปริมาณมากใน seminal plasma ในม้า (Novak et al., 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Hamann et al. (2007) ที่ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CRISP3 ในเลือดม้า ที่ให้ผลเชิงบวกกับอัตราการผสมติด โดยใช้เทคนิค SNP analysis ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Novak et al. (2010) ที่พบว่าโปรตีน CRISP3 นั้นมีการแสดงออกที่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดในม้า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fouchecourt et al. (2000) พบว่าโปรตีน clusterins ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบใน seminal plasma มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสมบูรณ์พันธุ์ในอสุจิม้า ส่วนของโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิม้า พบโปรตีน 5 ชนิด ที่แสดงออกที่แสดงออกและมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ citrate synthase, fumarate hydratase และ malate dehydrogenase มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ carbohydrate metabolism และการทำงานของ enzyme ภายใน TCA cycle ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยา metabolism ภายในตัวอสุจิ และเพิ่มความสามารถในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นพลังงาน มีผลทำให้ความสามารถในการเข้าปฏิสนธิของอสุจิเพิ่มสูงขึ้น โปรตีน dihydrolipoamide dehydrogenase ถ้ามีการแสดงออกในปริมาณมากจะส่งผลเสียต่ออัตราการผสมติดในม้า (Novak et al., 2010) Martinez-Heredia et al. (2008) รายงานว่าการแสดงออกของ fumarate hydratase และ dihydrolipoamide dehydrogenase ในปริมาณมาก ในอสุจิที่มีการเคลื่อนที่น้อย จากการศึกษาของ Novak et al. (2010) รายงานอีกว่า α-enolase นั้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราการผสมติดในม้า สอดคล้องกับการรายงานของ Force et al. (2002) รายงานว่าสามารถพบการทำงานของ α-enolase ในระดับที่สูง ในอสุจิที่มีความสมบูรณ์

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในอสุจิเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ต่อการนำข้อมูลมาประกอบการพิจารณาการทำงานของโปรตีนต่างๆ และการระบุตัวบ่งชี้ที่สำคัญ ที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติดในอสุจิสัตว์ชนิดต่างๆ แต่ยังขาดความรู้ความเข้าใจในรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับบทบาทการทำงานในบางด้านของโปรตีนภายในเซลล์อสุจิ เช่น การเคลื่อนที่, การเกิดกระบวนการ capacitation, การเกิด acrosomal reaction, การปฏิสนธิ และการปรับแต่งหลังการทรานสเลชั่นของโปรตีน เช่น phosphorylation, glycosylation, proteolytic cleavages และ matulation ซึ่งในสัตว์แต่ละชนิดมีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยการแสดงออกของโปรตีนเป็นการแสดงออกที่สำคัญ สามารถนำการแสดงออกที่เกิดขึ้นไปทำการวิเคราะห์ เพื่อหาความสัมพันธ์ในลักษณะที่แสดงออกต่างๆ ในส่วนของอัตราการผสมติดนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับ biomarkers อย่างเดียว แต่การผสมพันธุ์จะประสบความสำเร็จได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่าง เช่น สภาพแวดล้อม สภาพร่างกายของสัตว์ทั้งแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ วิธีการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติหรือการผสมเทียม รวมไปถึงรูปแบบของอสุจิที่ใช้ในการผสมพันธุ์เป็นแบบสดและแบบแช่แข็ง ตลอดจนการปฏิสนธิในหลอดทดลองที่เป็นเทคโนโลยีช่วยในการสืบพันธุ์ ในอนาคตมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำเทคนิคโปรติโอมิกส์เข้ามามีส่วนร่วมในการระบุตัวบ่งชี้ ที่มีความเกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยอาจเกี่ยวข้องกับข้อมูลของชนิดของโปรตีน, การทำงาน และความสัมพันธ์ต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ เพื่อใช้สำหรับการเพาะขยายพันธุ์ (Breeding stock) ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Aitken R. J., M. Sutton, P. Warner, and D. W. Richardson. 1985. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. Reprod. Fertil. 73: 441-449.

Ashizawa, K., G. J. Wishart, S. Katayama, D. Takano, A. R. A. H. Ranasinghe, K. Narumi, and Y.Tsuzuki. 2006. Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. Reproduction. 131: 1017-1024.

Baker J., M. P. Hardy, J. Zhou, C. Bondy, F. Lupu, A. R. Bellve, and A. Efstratiadis. 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. Mol. Endocrinol. 10: 903-918.

Baker, M. A., N. D. Smith, L. Hetherington, M. Pelzing, M. R. Condina, and R. J. Aitken. 2011. Use of titanium dioxide to find phosphopeptide and total protein changes during epididymal sperm maturation. Proteome. Res. 10: 1004 –1017.

Bonde J. P., E. Ernst, and T. K. Jensen. 1998. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. The Lancet. 10: 1172-1177.

Braundmeier, A. G., J. M. Demers, R. D. Shanks, and D. J. Miller. 2004. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. Anim. Sci. 82: 452-458.

Brown P. R., K. Miki, D. B. Harper, and E. M. Eddy. 2003. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. Biol. Reprod. 68: 2241-2248.

Budworth P. R., R. P. Amann, and P. L. Chapman. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozenthawed bull spermatozoa and fertility. Andrology. 9: 41-54.

Cheng, C. Y., P. R. Chen, C. J. Chen, S. H. Wang, C. F. Chen, Y. P. Lee, and S. Y. Huang. 2015. Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing-thawing treatment. Anim. Reprod. Sci. 152: 99-107.

Cocco T., M. Di Paola, S. Papa, and M. Lorusso. 1998. Chemical modification of the bovine mitochondrial bc1 complex reveals critical acidic residues involved in the proton pumping activity. Biochemistry. 37: 2037-2043.

Cui Y., H. Zhu, and Y. Zhu. 2008. Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive. Proteome. Res.7: 3984-3993.

D'Amours, O., G. Frenette, M. Fortier, P. Leclerc, and R. Sullivan. 2010. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. Reproduction. 139: 545-556.

Force A., J. L. Viallard, G. Grizard, and D. Boucher. 2002. Enolase isoforms activities in spermatozoa from men with normospermia and abnormospermia. Andrology. 23: 202-210.

Fouchecourt S., S. Metayer, A. Locatelli, F. Dacheux, and J.L. Dacheux. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. Biol. Reprod. 62: 1790-1803.

Fraser, L. R., S. A. Adeoya-Osiguwa, R. W. Baxendale, and R. Gibbons. 2006. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. Front. Biosci. 11: 1636-1645.

Gaviraghi A., F. Deriu, and A. Soggiu. 2010. Proteomics to investigate fertility in bulls. Vet.Res. Com. 1: 33-36.

Hamann, H., R. Jude, H. Sieme, U. Mertens, E. Topfer-Petersen, O. Distl, and T. Leeb. 2007. A Polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warm blood horses. Anim. Genet. 38: 259-264.

Jagan -Mohanarao, G., and S. K. Atreja. 2011. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 123: 40-47.

Kierszenbaum , A. L., and L. L. Tres. 2004. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. Arch. Histol. Cytol. 67: 271-284.

Kimmins, S. and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. Nature. 434: 583-589.

Kjaestad, H., E. Ropstad, and K. A. Berg. 1993. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. Acta. Vet. Scan. 34: 299-303.

Kovac, J. R., A. W. Pastuszak, and D. J. Lamb. 2013. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. Fertil. Steril. 99: 998-1007.

Kwon, W. S., Y. J. Park, el. and S. A. Mohamed. 2013. Voltagedependent anion channels are a key factor of male fertility. Fertil. Steril. 99: 354-361.

Labas, V., L. Spina, C. Belleannee, A. P. Teixeira-Gomes, A. Gargaros, F. Dacheux, and J. L. Dacheux. 2015. Analysis of epididymal sperm maturation by MALDI profiling and top-down mass spectrometry. Proteomics. 113: 226-243.

Lea, I. A., E. E. Widgren, and M. G. O'Rand. 2004. Association of sperm protein 17 with A-kinase anchoring protein 3 in flagella. Reprod. Biol. Endo. 2: 57.

Li, L.W., L. Q. Fan, and W. B. Zhu. 2007. Establishment of a highresolution 2-D reference map of human spermatozoal proteins from 12 fertile sperm-bank donors. Asian. 9: 321-329.

Luconi, M., G. Cantini, E. Baldi, and G. Forti. 2011. Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. Front. Biosci. 16: 1315-1330.

Liu, B., P. Wang, and Z. Wang. 2010. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. Assist. Reprod. Genet. 27:719-724.

Macpherson, M. L., R. C. Simmen, F. A. Simmen, J. Hernandez, B. R. Sheerin, D. D. Varner, P. Loomis, M. E. Cadario, C. D. Miller, S. P. Brinsko, S. Rigby, and T. L. Blanchard. 2002. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. Biol. Reprod. 67: 648-654.

Martinez-Heredia, J., J. M. Estanyol, J. L. Ballesca, and R. `Oliva 2006. Proteomic identification of human sperm proteins. Proteomics. 6: 4356-4369.

Martinez-Heredia, J., S. de Mateo, J. M. Vidal-Taboada, J. L. Ballesca and R. Oliva. 2008. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. Hum. Reprod. 23: 783-791.

Novak, S., T. A. Smith, F. Paradis, L. Burwash, M. K. Dyck, G. R. Foxcrort, and W. T. Dixon. 2010. Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. Theriogenology. 74: 956-967.

O'Donnell, L. and M.K. O'Bryan. 2014. Microtubules and spermatogenesis. Semin. Cell. Dev. Biol. 30: 45-54.

Park, Y. J., W. S. Kwon, S. A. Oh. 2012. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. Prot. Res. 11: 4162-4168.

Peddinti, D., B. Nanduri, A. Kaya, J. M. Feugang, S. C. Burgess, and E. Memili. 2008. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. BMC Sys. Bio. 22: 1-9.

Pixton, K. L., E. D. Deeks, F. M. Flesch, F. L. Moseley, L. Bjorndahl, P. R. Ashton, C. L. Barratt, and I. A. Brewis. 2004. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. Hum. Reprod. 19: 1438-1447.

Rahman, S. M., J. S. Lee, W. S. Kwon, and M. G. Pang. 2013. Sperm Proteomics: Road to male fertility and contraception. Int. Endoc. 2013: 1-11.

Rousseaux, S., C. Caron, J. Govin, C. Lestrat, A. K. Faure, and S. Khochbin. 2005. Establishment of male-specific epigenetic information. Gene. 345: 139-153.

Shukla, K. K., W. S. Kwon, and M. S. Rahman. 2013. Nutlin-3a decreases male fertility via UQCRC2. PLoS. ONE. 8: e76959.

Sooderquist, L., H. Rodriguez-Martinez, and L. Janson. 1991. Post- thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A.I. Bull spermatozoa in relation to fertility. Zent. Vet. A. 38:165-174.

Thepparat, T., S. Katawatin, T. Vongpralub, M. Duangjinda, S. Thammasirirak, A. Utha. 2012a. Separation of bovine spermatozoa protein using 2D-PAGE revealed the relationship between tektin-4 expression patterns and spermatozoa motility. Theriogenology. 77: 1816-1821.

Thepparat, T., S. Katawatin, T. Vongpralub, M. Duangjinda, S. Thammasirirak, A. Utha. 2012b. Markedly different expression in mature bovine proacrosin binding protein (sp32). Thai. J Vet. Med. 42: 463-469.

Thundathil, J., J. Gil, and A. Januskauskas. 1999. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. Andrology. 22 :366-373.

Topfer-Petersen, E., M. Ekhlasi-Hundrieser, C. Kirchhoff, T. Leeb and H. Sieme. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. Anim. Reprod. Sci. 89: 159-170.

Xu, W., H. Hu, and Z. Wang. 2012. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility. Proteomics. 18: 5426-5436.

Yuan, J. P., K. Kiselyov, D. M. Shin, J. Chen, N. Shcheynikov, S. H. Kang, M. H. Dehoff, M. K. Schwarz, P. H. Seeburg, S. Muallem, and P. F. Worley. 2003. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. Cell. 114: 777-789.

Zumoffen, C. M., R. Gil, and A. M. Caille. 2013. A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. Hum. Reprod. 28: 1297-1308.