

นิพนธ์ฉบับ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและ ในบริเวณผิวเยื่อโพรงมดลูกต่อการฝังตัวของตัวอ่อน

กัลยาวัฒน์ หุตะโชค*, เจริญไชย เจียมจรรยา**, พัทธรา วิสุตกุล***, ลิทธิรักษ์ รอยตระกูล****

บทคัดย่อ

- บทนำ:** ปัจจุบันกระบวนการช่วยการเจริญพันธุ์มีการพัฒนาไปเป็นอย่างมาก ทั้งแพทย์ นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัย ต่างก็มีความต้องการที่จะคิดค้นหาวิธีการรักษาที่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในด้านการเลือกตัวอ่อนและการตรวจสอบประสิทธิภาพของเยื่อโพรงมดลูกว่ามีความเหมาะสมต่อการรองรับการฝังตัวหรือไม่ รวมถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการฝังตัวของตัวอ่อน และการตั้งครรภ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biomarkers) ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อน การฝังตัวของตัวอ่อน และการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนที่บริเวณเยื่อโพรงมดลูก
- วิธีการศึกษา:** อาสาสมัครหญิงที่เข้ารับการรักษาภาวะมีบุตรยากด้วยวิธี Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) ที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๗ คน และไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๗ คน โดยผู้วิจัยทำการเก็บน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ zygote, cleavage และ blastocyst และเก็บน้ำล้างเยื่อโพรงมดลูกในวันที่ทำการเก็บไข่ (วันที่ ๐) และวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕ หลังวันเก็บไข่) เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโปรตีนโดยวิธี Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS) แล้วระบุชนิดของโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- ผลการศึกษา:** พบโปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระยะ cleavage จำนวน ๒ ตัวที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ได้แก่ Smad4 และ RBFOX1 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนจำนวน ๑ ตัวจากน้ำล้างเยื่อโพรงมดลูกที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในกลุ่มมีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ได้แก่ TRIFIC โปรตีนทั้ง ๓ ตัวนี้พบว่า มีความสัมพันธ์กับ factors ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนและการฝังตัวของตัวอ่อน
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** พบว่า มีโปรตีน ๒ ตัว ได้แก่ Smad4 และ RBFOX1 ที่ได้จากน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและโปรตีน ๑ ตัว คือ TRIFIC ที่ได้จากน้ำล้างเยื่อโพรงมดลูก มีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ดังนั้น ควรจะมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับบทบาทของโปรตีนเหล่านี้ต่อการพัฒนาของตัวอ่อนและการฝังตัวของตัวอ่อน

คำสำคัญ: ภาวะมีบุตรยาก, การฝังตัวของตัวอ่อน, โปรตีน

วันที่รับบทความ: ๓ มิถุนายน ๒๕๕๘

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๗ กรกฎาคม ๒๕๕๘

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** งานบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี

บทนำ

เนื่องจากปัจจุบันในกระบวนการทำเด็กหลอดแก้ว จำเป็นต้องมีการคัดเลือกตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีที่สุด เพื่อการนำตัวอ่อนไปย้ายฝากเข้าสู่โพรงมดลูก ในจำนวนที่น้อยที่สุด เช่น การใส่ตัวอ่อนเพียง ๑ ตัว เพื่อลดอัตราการตั้งครรภ์แฝด การคัดเลือกเอาตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีโดยที่ไม่มีผลกระทบ ต่อตัวอ่อนนั้น โดยทั่วไปจะดูลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน และความเหมาะสมกับช่วงเวลาในการเจริญพัฒนาในแต่ละระยะ ซึ่งข้อเสียของการประเมินตัวอ่อนลักษณะนี้อาจมีความแตกต่างกันในผู้ประเมินแต่ละคน ดังนั้น จึงต้องการวิธีที่จะนำมาใช้ในการประเมินการคัดเลือกตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี โดยมีตัวชี้วัดที่ชัดเจนและเป็นเกณฑ์เดียวกันไม่ว่าใครจะเป็นผู้ประเมินก็ตาม ตัวชี้วัดที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อประเมินตัวอ่อนวิธีหนึ่ง คือ โปรตีนที่ถูกปล่อยจากตัวอ่อน ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการพัฒนา ซึ่งอาจจะมีการโปรตีนที่สำคัญและมีความจำเป็นต่อการพัฒนาตัวอ่อน โดยตัวอ่อนที่ดีย่อมส่งผลถึงการฝังตัวที่ติดตามมา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีนที่ตัวอ่อนปล่อยออกมาในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในแต่ละระยะของการพัฒนาของตัวอ่อน ว่ามีความสัมพันธ์กับอัตราการฝังตัวของตัวอ่อนหรือไม่ ซึ่งการฝังตัวของตัวอ่อนนอกจากจะต้องการตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีแล้วนั้น ยังต้องการเยื่อโพรงมดลูกที่มีคุณภาพดีและมีความพร้อมอีกด้วย ในปัจจุบันมีการประเมินคุณภาพของเยื่อโพรงมดลูกโดยการทำอัลตราซาวด์ซึ่งยังไม่สามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีนที่บริเวณผิวเยื่อโพรงมดลูกกว่ามีความสัมพันธ์ต่ออัตราการฝังตัวของตัวอ่อนหรือไม่

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกใช้รูปแบบการเก็บตัวอย่างงานวิจัยแบบไปข้างหน้า (Prospective study) และเลือกตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ผลแบบ Retrospective study โดยการศึกษาครั้งนี้ได้รับใบรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (MTU-EC-OB-6-106/55) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครหญิงที่เข้ามาได้รับการรักษาในหน่วยผู้มีบุตรยากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๖ ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗ โดยกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษามีทั้งสิ้น ๑๔ คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๗ คน และไม่มี การฝังตัวของตัวอ่อน ๗ คน

การคัดอาสาสมัครเข้าโครงการ (Inclusion criteria)

๑. อาสาสมัครหญิงที่ต้องทำการรักษาโดยวิธี Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) ซึ่งจำเป็นต้องมีการเก็บไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ และจำเป็นต้องมีการย้ายฝากตัวอ่อนกลับเข้าสู่โพรงมดลูก

๒. อาสาสมัครหญิงที่เข้าทำการรักษาด้วยวิธี ICSI ซึ่งมีอายุไม่เกิน ๔๕ ปี

๓. อาสาสมัครหญิงที่หลังทำการเก็บไข่ แพทย์ตัดสินใจให้มีการย้ายตัวอ่อนสู่โพรงมดลูกในวันที่ ๕ หลังการเก็บไข่

๔. อาสาสมัครหญิงที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B) ภูมิต้านทานต่อเชื้อซิฟิลิสและภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV)

เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Exclusion criteria)

๑. อาสาสมัครหญิงที่ทำการรักษาภาวะมีบุตรยากด้วยวิธีอื่น ที่นอกเหนือจากการรักษาด้วยวิธี ICSI เช่น การฉีดเชื้อ (Intrauterine insemination; IUI)

๒. อาสาสมัครหญิงที่มีตัวอ่อนแช่แข็งไว้อยู่แล้ว และต้องการมาใส่ตัวอ่อนเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการเก็บไข่ในรอบการรักษาอื่นๆ

๓. อาสาสมัครหญิงที่มีอายุเกิน ๔๕ ปี อาสาสมัครหญิงที่ตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B) ภูมิต้านทานต่อเชื้อซิฟิลิสและภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV)

เกณฑ์การยุติการเข้าร่วมโครงการ (Discontinuation criteria)

๑. อาสาสมัครหญิงที่หลังการเก็บไข่ แพทย์ตัดสินใจให้ย้ายฝากตัวอ่อนในวันที่ ๓ หลังการเก็บไข่ หรืออาสาสมัครหญิงที่แพทย์ตัดสินใจให้แช่แข็งตัวอ่อนไว้ก่อน แล้วจึงมาย้ายฝากตัวอ่อนในรอบต่อไป

๒. หากถึงวันย้ายฝากตัวอ่อนแล้วแพทย์ตัดสินใจว่าตัวอ่อนไม่สามารถย้ายฝากแก่อาสาสมัครได้ ผู้วิจัยจะยุติการเข้าร่วมโครงการวิจัยของอาสาสมัคร

๓. อาสาสมัครสามารถยุติการเข้าร่วมโครงการได้ตลอดเวลา โดยจะไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาพยาบาลอื่นๆ การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ 2pronuclei (2PN) โดยจะเก็บหลังจากทำการย้ายตัวอ่อนไปในน้ำยาเลี้ยง

ตัวอ่อนหลุมใหม่ จากนั้นจะทำการเก็บน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนใน ระยะ cleavage โดยจะเก็บหลังจากทำการย้ายตัวอ่อนไปใน น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหลุมใหม่ และเก็บน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนใน ระยะ blastocyst โดยจะเก็บหลังจากทำการย้ายฝากตัวอ่อน เข้าสู่โพรงมดลูก แล้วเก็บตัวอย่างแช่ใน -๘๐ องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)

การเก็บตัวอย่างจากผิวเยื่อโพรงมดลูกโดยจะทำการทั้งหมด ๒ ครั้ง คือ ในวันเก็บไข่ ภายหลังจากการทำ mock transfer (โดยการใช้ยา flushing's medium ปริมาตร ๖๕ ไมโครลิตร ล้างบริเวณส่วนปลายของ catheter) และวันย้าย ฝากตัวอ่อนเข้าสู่โพรงมดลูก ภายหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อน จะใช้น้ำยา flushing's medium ปริมาตร ๖๕ ไมโครลิตร ล้างบริเวณส่วนปลายของ catheter แล้วเก็บตัวอย่างแช่ใน -๘๐ องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ โปรตีน ด้วยวิธี Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)

การแยกเกลือออกจากตัวอย่าง (desalting)

นำตัวอย่างมาใส่ใน spin column chromatography แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 g นาน ๒ นาที จากนั้นจะได้ตัวอย่าง ในรูปแบบของสารละลาย แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลาย ออกด้วยเครื่อง speed vacuum ให้เหลือปริมาณของตัวอย่าง ประมาณ ๕๐ ไมโครลิตร และนำไปโปรตีนตัวอย่างมาวัดปริมาณ โปรตีนโดยวิธี Lowry®

การเตรียมโปรตีนตัวอย่างและแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

เตรียมโปรตีนแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ ๕ ไมโครกรัม ผสมกับ 5X SDS loading buffer นำไปต้มที่ ๙๖ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที ก่อนนำไปแยกใน 12.5% polyacrylamide gel ตามวิธีของ Laemmli® เทียบกับโปรตีน มาตรฐาน (LMW-SDS marker kit, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) จากนั้นนำเจลมาย้อมโดยวิธี silver staining

การตัดเจลและการย่อยโปรตีนภายในเจล

แบ่งเจลแต่ละตัวอย่างออกเป็น ๑๕ ช่วง แต่ละช่วง ตัดเจลให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ ๑ ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใส่ลงใน 96-well plate หลุมละ ๘ - ๑๐ ชิ้น เริ่มจากล่างเจล ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและ 100% acetonitrile (ACN) จากนั้น ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ภายในโปรตีนด้วยสารละลาย ๑๐ มิลลิโมลาร์ dithiothreitol (DTT) ใน ๑๐ มิลลิโมลาร์ ammonium bicarbonate และป้องกันการเกิดพันธะไดซัลไฟด์

ซ้ำโดยการเติมหมู่อัลคิลด้วยสารละลาย ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ iodoacet-amide (IAA) ใน ๑๐ มิลลิโมลาร์ ammonium bicarbonate ล้างเจลอีก ๓ ครั้ง ด้วย 100% ACN ก่อนย่อยโปรตีน ภายในเจลด้วย ๑๐ นาโนกรัม trypsin (sequencing grade modified trypsin, Promega, WI, USA) ที่ละลายใน ๑๐ มิลลิโมลาร์ ammonium bicarbonate และ 10% ACN แล้วเติม 30% ACN เพื่อสกัดเปปไทด์ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑ คืน จากนั้นดูดของเหลวแต่ละตัวอย่างซึ่งมีเปปไทด์ใส่ใน 96-well plate อันใหม่ แล้วสกัดเปปไทด์ที่เหลือในเจลด้วย 50% ACN ใน 0.1% formic acid (ทำซ้ำ ๒ ครั้ง) และ 70% ACN ใน 0.1% formic acid ทำตัวอย่างเปปไทด์ให้แห้งด้วย incubator ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ คืน นำตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาที่ -๘๐ องศาเซลเซียส รอนำไปวิเคราะห์ผลด้วย เครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของเปปไทด์โดยเครื่อง LC-MS/MS

ละลายตัวอย่างเปปไทด์ที่ได้ด้วย 0.1% formic acid แล้วฉีดเข้าเครื่อง capillary HPLC (Ultimate 3000 LC System, Dionex, USA) แยกเปปไทด์ด้วยนาโนคอลัมน์ (PepSwift Monolithic Nano Column, 100 µm i.d. x 50 mm) ชะล้าง เปปไทด์ออกจากคอลัมน์ด้วย ACN ที่มี 0.1% formic acid แล้ววิเคราะห์ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของเปปไทด์ในตัวอย่าง ต่างๆ ที่ถูกชะล้างออกมาพร้อมกัน ด้วยเครื่อง tandem mass spectrometer ชนิด ESI-Ion Trap MS (HCTultra PTM Discovery System, Bruker Daltonics, Germany) นำข้อมูล ที่ได้มาวิเคราะห์หาเปปไทด์และเปรียบเทียบปริมาณเปปไทด์ ที่แสดงออกแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม DeCyder™ for Mass spectrometry (DeCyder MS 2.0, GE healthcare) โดยกำหนดค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$

การระบุชนิดโปรตีนโดยเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI

นำข้อมูลเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรม DeCyder ไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Mascot (Matrix Science, London, UK) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนต่างๆ ที่มีในฐาน ข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิดของโปรตีน จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ ด้วย venn diagram เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ โปรตีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่มของกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ และระบุถึงหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ต่อการฝังตัวของตัวอ่อน โดยเทียบจากฐานข้อมูล

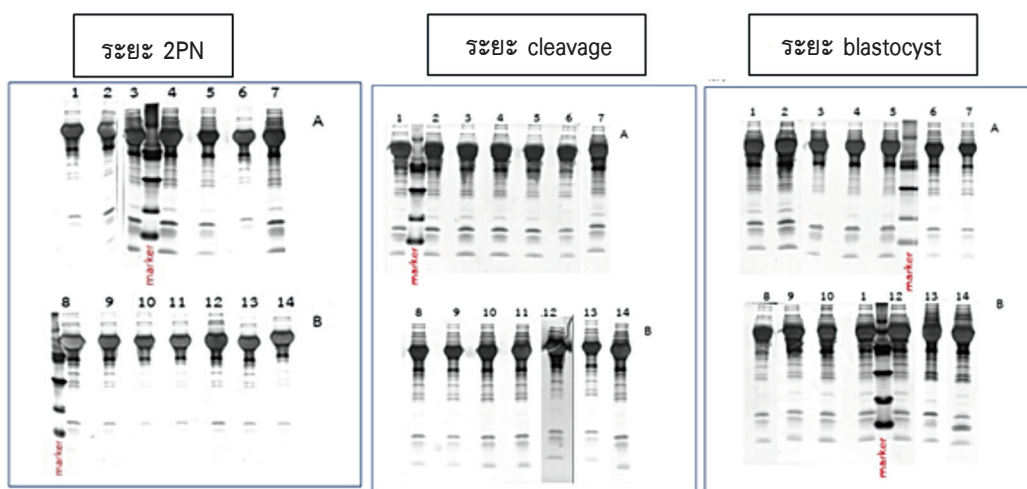
ผลการศึกษา

วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อนำตัวอย่างโปรตีนในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๗ ราย และกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๗ ราย ที่เตรียมได้จากน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกแต่ละรายไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA แล้วจึงเตรียมโปรตีนในทุกตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน คือ

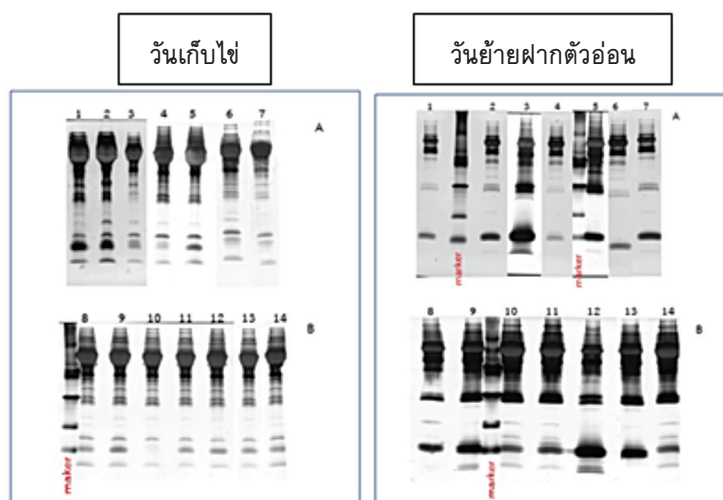
๕ ไมโครกรัม สำหรับแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining จากนั้นนำไปถ่ายภาพเจลด้วยโปรแกรม Quantity one-42.0 พบว่า ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนทุกระยะมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ดังรูปที่ ๑ และในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกทั้งในวันเก็บไข่และวันย้ายฝากตัวอ่อนมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ดังรูปที่ ๒

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน



รูปที่ ๑ รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนด้วยวิธี SDS-PAGE (A) กลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (B) กลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

น้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูก



รูปที่ ๒ รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกด้วยวิธี SDS-PAGE (A) กลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (B) กลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

ผลการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกระยะต่างๆ ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมดมี

๔๖๑ ชนิด และพบโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (differential expressed proteins) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระยะ cleavage ทั้งหมด ๒ ชนิด ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน และไม่มีการแสดงออกในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน แสดงในตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ โปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในระยะ cleavage หรือวันที่ ๓ หลังวันเก็บไข่ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันและกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

Accession No.	Peptide sequence	Protein description
gil6573399	EAGRAPGDAVHK	Chain A, Crystal Structure Analysis Of The Smad4 Active Fragment
gil119609969	IEAGS	RBFOX1

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกทั้งหมดมี ๖๓๐ ชนิด และพบโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (differential expressed proteins) ในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูก

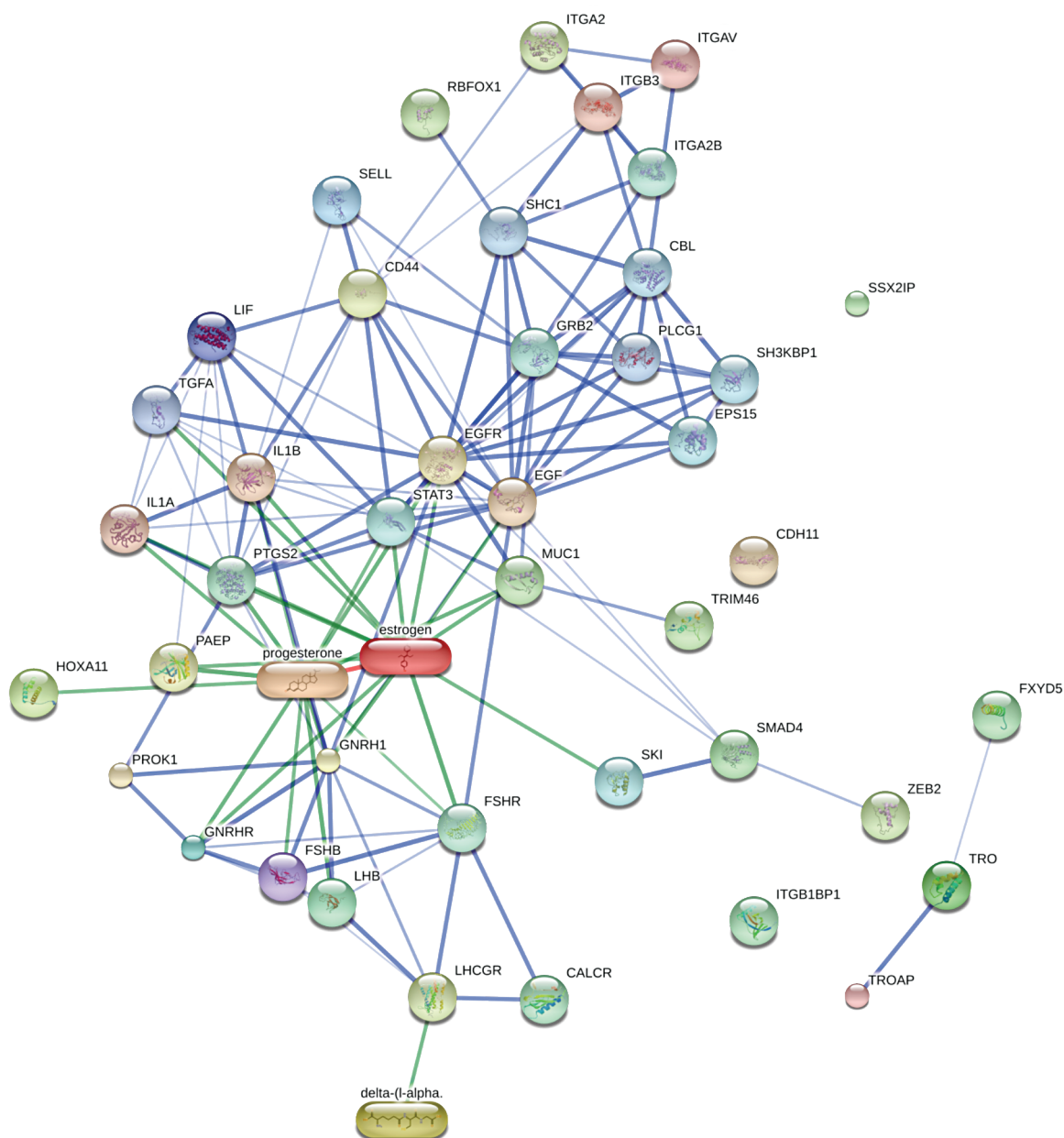
ในวันย้ายฝากตัวอ่อน ๑ ชนิด ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการแสดงออกในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน แสดงในตารางที่ ๒

ตารางที่ ๒ โปรตีนในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกในวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕ หลังวันเก็บไข่) ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนกับกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

Accession No.	Peptide sequence	Protein description
gil33413959	AHSGHK	TRIFIC

เมื่อวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ของโปรตีน ๓ ตัวที่พบในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยโปรแกรม STITCH 4.0 พบว่า โปรตีนทั้ง ๓ ตัว มีความสัมพันธ์กับการฝังตัวของตัวอ่อน โดยโปรตีนจากน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ๒ ตัว คือ Chain A, Crystal Structure Analysis Of The Smad4 Active Fragment (Smad4) มีความสัมพันธ์กับการฝังตัวของตัวอ่อนผ่านทาง Smad2, SKI, STAT3, EGF และ EGFR ส่วน RBFOX1 มีความสัมพันธ์กับการฝังตัวของตัวอ่อนผ่านทาง SCH1 และ SCH1 สัมพันธ์

กับ EGF และ EGFR สำหรับโปรตีนจากน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูก คือ TRIFIC (TRIM46) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ MUCIN 1 (MUC1) และ MUC1 เป็นอีกปัจจัยที่ทำให้เกิดการฝังตัวของตัวอ่อน โดยทั้ง Smad2, SKI, STAT3, EGF, EGFR, SCH1 และ MUC1 มีความสัมพันธ์กับ Estrogen และ Progesterone ดังแสดงในรูปที่ ๓ ซึ่ง Smad2, SKI, STAT3, EGF, EGFR, SCH1 และ MUC1, Estrogen และ Progesterone เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการฝังตัวของตัวอ่อน



รูปที่ ๓ ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนที่พบ ๓ ชนิดในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อน; Smad2, Mothers against decapentaplegic homolog 2; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; SHC, SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1; MUC1, MUCIN 1

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนมีการแสดงออกของโปรตีนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระยะ cleavage หรือวันที่ ๓ หลังการเก็บไข่ ทั้งหมด ๒ ตัว ได้แก่ Smad4 และ RBFOX1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee KB และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ที่ได้ศึกษาความจำเป็นของการแสดงออกของโปรตีน Smad4 ในตัวอ่อนวัว พบว่า กลุ่มตัวอ่อนที่มีการแสดงออกของ Smad4 จะสามารถพัฒนามาสู่ระยะ cleavage ได้ โดย Smad4 จะเริ่มมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วง meiotic maturation ของเซลล์ไข่ จากนั้นจะเพิ่มปริมาณขึ้นจนสูงสุดในระยะ ๒ เซลล์ และยังคงเพิ่มปริมาณสูงขึ้นจนถึงระยะ ๘ เซลล์ จากนั้นปริมาณของ Smad4 จะลดต่ำลงในระยะ blastocyst นอกจากนี้ Guo และ Jiami ในปี ค.ศ. ๒๐๑๒ ได้ศึกษา Smad4 ต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนในหนู พบว่า ในเซลล์ไข่ที่ยังไม่ถูกปฏิสนธิมีการแสดงออกของ Smad4 ในปริมาณมากเท่าๆ กันกับในตัวอ่อนที่เริ่มมีการแบ่ง blastomeres หรือในระยะ cleavage และยังคงศึกษาพบว่า หากขาด maternal Smad4 จะส่งผลให้ตัวอ่อนตายได้ เนื่องจากเกิดความบกพร่องของการแบ่งตัวแบบ mitosis, polarization และการแบ่งแยกเซลล์เพื่อเป็น Inner cell mass (ICM) หรือ Trophoctoderm (TE)^๗ ซึ่งคาดว่า Smad4 น่าจะมีความสำคัญต่อการฝังตัวของตัวอ่อนเนื่องจากผลงานวิจัยพบว่า Smad4 มีความสัมพันธ์กับโปรตีน Smad2, SKI, STAT3, EGF และ EGFR ซึ่งโปรตีนแต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่อธิบายกลไกการทำงานของ Smad4 อย่างแท้จริงได้ ซึ่งมีรายงานวิจัยศึกษาพบว่า EGF จะพบในเยื่อโพรงมดลูกในระหว่างรอบระดู ใน decidua และในรกของคน มีการศึกษาในสัตว์ primate พบว่า Insulin-like growth factor-I (IGF-I) และ EGF ที่พบใน glandular endometrial epithelium จะมีการเปลี่ยนแปลงในบริเวณที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน แสดงให้เห็นถึงบทบาทในการแทรกตัวของ trophoblast เข้าไปในเยื่อโพรงมดลูก (trophoblast invasion) และการเกิด decidualization^๘ ในทางตรงกันข้ามงานวิจัยของ Kaune H. และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๕ ศึกษาการพัฒนาของเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ และการพัฒนาของตัวอ่อนในหนูที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อไม่ให้มีการแสดงออกของ Smad4 เปรียบเทียบกับกลุ่มหนูที่ไม่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่า Smad4 ไม่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ และการพัฒนาของตัวอ่อน เนื่องจากในหนูกลุ่มที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมยังสามารถมีการเจริญของเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ และการพัฒนาของตัวอ่อน ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม^๙

RBFOX1 หรือ FOX1 หรือ ataxin-2 binding protein 1 (A2BP1) พบใน คน หนู พยาธิตัวกลม โดย RBFOX1 จะจับกับโปรตีน ataxin-2^{๑๐} นอกจากนั้นยังทำหน้าที่เกี่ยวกับ RNA-binding protein^{๑๑} ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tim-Rasmus K. และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๐๐ ที่ศึกษาในหนอน พยาธิพบว่า ataxin-2 (Atx-2) มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อน นอกจากนี้ยังพบ Atx-2 กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ อาจเนื่องมาจากมีคุณสมบัติของ RNA-splicing และยังอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิด polarity ของเซลล์^{๑๒} ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า RBFOX1 มีความสัมพันธ์กับ EGF และ EGFR เช่นเดียวกับ Smad4 จึงคาดว่าน่าจะมีผลสำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อนและการฝังตัวของตัวอ่อนเช่นกัน

ผลงานวิจัยนี้ยังพบโปรตีนที่มีการแสดงออกในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกในวันที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อนในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน คือ TRIFIC (Tripartite motif-containing protein 46; TRIM46) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ tripartite motif family (TRIM) หรือ RING finger, B-box, and coiled-coil (RBCC) โดยจากการศึกษาของ Short KM. และ COX TC. ในปี ค.ศ. ๒๐๐๖ พบว่า TRIFIC มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ microtubule cytoskeleton ซึ่งยังไม่ทราบถึงหน้าที่ในการทำงานอย่างแน่ชัด เนื่องจาก TRIFIC มีลักษณะการทำงานที่ต่างไปจาก TRIM ตัวอื่น คือ ตัว TRIFIC เองจะไม่จับกับกับ TRIM ตัวอื่น หรือแม้แต่ตัว TRIFIC เอง^{๑๓} นอกจากนี้ mucin1 (MUC1) เป็นตัวที่ควบคุมการแสดงออกของ TRIFIC และ MUC1 ยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลเกี่ยวข้องกับการฝังตัวของตัวอ่อน โดยพบว่า MUC1 จะมีการแสดงออกที่บริเวณผิวเยื่อโพรงมดลูกในช่วงเฉพาะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน^{๑๔} ซึ่งหากมีการแสดงออกของ MUC1 ในช่วงต่อไปหลังจากระยะนี้จะส่งผลให้ตัวอ่อนไม่สามารถฝังตัวได้ ดังนั้น เมื่อถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการฝังตัวของตัวอ่อน การแสดงออกของ MUC1 จะลดลงในบริเวณที่เหมาะสมแก่การฝังตัวของตัวอ่อน^{๑๕, ๑๖, ๑๗} แต่เนื่องจากยังไม่มีการวิจัยใดที่ทำการศึกษากลไกการทำงานของทั้ง TRIFIC และ MUC1 อย่างชัดเจน จึงทำให้ไม่สามารถทราบถึงกลไกการทำงานที่สัมพันธ์กันระหว่าง TRIFIC กับ MUC1 อย่างแท้จริงได้ ซึ่งการตรวจพบโปรตีน TRIFIC ในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนนั้น อาจจะเป็นไปได้ว่า MUC1 ที่มีการแสดงออกมาก่อนระยะที่เหมาะสมต่อการฝังตัวของตัวอ่อนเป็นตัวควบคุมให้มีการแสดงออกของ TRIFIC ในระยะที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน แต่ในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนในงานวิจัยครั้งนี้ น่าจะยังคงมีการแสดงออกของ MUC1 ที่บริเวณผิวเยื่อโพรงมดลูก แต่จาก

ผลงานวิจัยไม่พบการแสดงออกของ MUC1 ในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกนั้น อาจเป็นไปได้ว่า MUC1 ยังมีการแสดงออกอยู่ที่ผิวเซลล์เยื่อโพรงมดลูกไม่ได้ถูกปล่อยออกมาถึงน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูก

สรุปผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า โปรตีนที่น่าจะมีความสำคัญต่ออัตราการเจริญและการฝังตัวของตัวอ่อน ได้แก่ โปรตีน Smad4 และ RBFOX1 ที่พบได้ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระยะ cleavage (วันที่ ๓ หลังวันเก็บไข่) โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ส่วนโปรตีน TRIFIC ที่พบได้ในน้ำล้างผิวเยื่อโพรงมดลูกและสัมพันธ์กับ MUC1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการฝังตัวของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโปรตีนโอมิกส์ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์การศึกษาในห้องปฏิบัติการผู้มีบุตรยาก

เอกสารอ้างอิง

- Lowry OH RN, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
- UK L. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
- Johansson C SJ, Sundstrom L, Wadensten H, Bjorkesten L, Flensburg J. Differential expression analysis of Escherichia coli proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. Proteomics 2006;64475-85.
- Perkins DN PD, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 1999; 20:2551-67.
- เจริญไชย เจียมจรรยา. การประเมินเยื่อโพรงมดลูก ในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนโดยตัวชี้วัดทางชีววิทยา. ภาวะมีบุตรยากและการช่วยการเจริญพันธุ์. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ๒๕๕๔:๓๓๕-๔๔.
- Lee KB, Zhang K, Folger JK, Knott JG, Smith GW. Evidence supporting a functional requirement of SMAD4 for bovine preimplantation embryonic development: a potential link to embryotrophic actions of follistatin. Biol Reprod 2014;91:62.
- Guo J. The requirement of Smad4 in mouse early embryonic development. Developmental biology 2012:192.
- Das SK WX-N, Paria BC. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. Development 1994;120:1071-83.
- Kaune H, Peyrache E, Williams SA. Oocyte-derived Smad4 is not required for development of the oocyte or the preimplantation embryo. Theriogenology 2015; 83:897-903.
- Shibata H, Huynh DP, Pulst SM. A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. Hum Mol Genet 2000;9:1303-13.
- Kuroyanagi H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. Cellular and molecular life. Cell Mol Life Sci 2009; 66:3895-907.
- Kiehl TR, Shibata H, Pulst SM. The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in C. elegans. J Mol Neurosci 2000;15:231-41.
- Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. J Biol Chem 2006;281:8970-80.
- Vos HL, Mockensturm-Wilson M, Rood PM, Maas AM, Duhig T, Gendler SJ, et al. A tightly organized, conserved gene cluster on mouse chromosome 3 (E3-F1). Mamm Genome 1995;6:820-2.
- Carson DD, DeSouza MM, Regisford EG. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. Bioessays 1998;20:577-83.

๑๖. Inyawilert W, Fu TY, Lin CT, Tang PC. Let-7-mediated suppression of mucin 1 expression in the mouse uterus during embryo implantation. *J Reprod Dev* 2015;61: 138-44.

๑๗. Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 2):153-6.

Abstract

Correlation of proteins secreted from embryos in embryo culture medium and proteins in fluid washed from endometrial surface with implantation

Kallayawat Hutachok*, Charoenchai Chiamchanya**, Pachara Visutakul***, Sittiruk Roytrakul****

* Candidate for M.Sc., Faculty of Medicine, Thammasat University

** Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Graduate Academy, Faculty of Medicine, Thammasat University

**** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand Science Park, Pathumthani

Introduction: Although assisted reproductive technologies (ART) has been advancedly developed, obstetrician, scientists and researchers are still in search of the highest efficiency methods to select good embryos for better implantation rate. Also, study on factors predicting endometrium receptivity and another implantation factors are interesting. Therefore, we planned to carry on study the significant biomarkers for embryo development, endometrium receptivity and implantation.

Method: Infertile female volunteers were treated with Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Seven volunteers had embryos implanted and seven volunteers had not. We collected embryo culture spent medium at zygote, cleavage and blastocyst stage and collected fluid washed from endometrial surface on the day of ovum pick up and embryo transfer. All specimens were identified for peptide mixtures using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis and searched against National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

Result: Two different expression proteins and one different expression protein were found in embryo culture spent medium and in fluid washed from endometrial surface respectively in the volunteer group having implantation. These 3 proteins, Smad4, RBFOX1, and TRIFIC were evidently related to different factors that involved in the embryo development and implantation process.

Discussion and Conclusion: 3 different expression proteins found in volunteer with embryo implanted group need to be studied further to confirm their roles in embryo development and implantation.

Key words: Infertility, Implantation, Protein