

นิพนธ์ต้นฉบับ

ไกลโคโปรตีนโอมิกส์ของสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก ระยะ pre-receptive และ receptive ในรอบการรักษาด้วย เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ที่มีการฝังตัวและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน จินดารัตน์ เจนเกรียงไกร*, เจริญไชย เจียมจรรยา**, ลิทธิรักษ์ รอยตระกูล***, พัทธรา วิสุตกุล****

บทคัดย่อ

- บทนำ:** การตรวจประเมินความพร้อมของเยื่อโพรงมดลูก ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มอัตราสำเร็จของการรักษาภาวะมีบุตรยากโดยใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในปัจจุบันยังขาดตัวชี้วัดที่เชื่อถือได้ในการตรวจวินิจฉัย วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาไกลโคโปรตีนในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก เพื่อนำไปสู่การศึกษาหาตัวชี้วัดทางชีวภาพในการตรวจประเมินความพร้อมของเยื่อโพรงมดลูก
- วิธีการศึกษา:** ทำการเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งของเยื่อโพรงมดลูกจากปลายสายที่ใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อน ในสตรีที่รักษาภาวะมีบุตรยากโดยใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ จำนวน ๓๒ ราย จากผู้ป่วยที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๑๖ ราย และผู้ป่วยที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๑๖ ราย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มในวันที่ทำการเก็บไข่ (วันที่ ๐) จากผู้ที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๘ ราย และผู้ที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๘ ราย รวมเป็นจำนวน ๑๖ ราย (กลุ่มที่ ๑) และวันที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) จากผู้ป่วยที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๑๖ ราย (กลุ่มที่ ๒) และผู้ป่วยที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนจำนวน ๑๖ ราย (กลุ่มที่ ๓) แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์หาไกลโคโปรตีนด้วยเครื่อง Liquid chromatography with tandem mass spectrometry ระบุชนิดและเปรียบเทียบการแสดงออกของไกลโคโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีการฝังตัวและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนโดยใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics)
- ผลการศึกษา:** พบไกลโคโปรตีนในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูกในวันที่ ๐ เป็นกลุ่มที่ ๑ จำนวน ๖๔ ชนิด และพบในวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) เป็นกลุ่มที่ ๒ และกลุ่มที่ ๓ จำนวน ๖๗ ชนิด โดยไกลโคโปรตีนที่พบในวันที่ ๕ นั้นเป็นไกลโคโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (กลุ่มที่ ๒) จำนวน ๑ ชนิด คือ cGMP-dependent protein kinase 1 isoform 2 และเป็นไกลโคโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน (กลุ่มที่ ๑) จำนวน ๒ ชนิด คือ human coding gene (hCG) 2038570 และ thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** ไกลโคโปรตีนที่พบในวันที่ ๐ และวันที่ ๕ จำนวน ๖๔ ชนิด แสดงให้เห็นว่าไกลโคโปรตีนส่วนใหญ่ที่ตรวจพบในเยื่อโพรงมดลูก จะปรากฏตั้งแต่ระยะ pre-receptive และยังคงปรากฏต่อเนื่องไปจนถึงระยะ receptive สำหรับไกลโคโปรตีนที่พบเฉพาะในวันที่ ๕ จำนวน ๓ ชนิด น่าจะเป็นตัวแทนของไกลโคโปรตีนที่แสดงถึง receptive phase (window period of implantation; WOI) ของเยื่อโพรงมดลูก โดยที่ cGMP-dependent protein kinase 1 isoform 2 ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน อาจจะใช้เป็นตัวแทนบอกถึงความพร้อมของเยื่อโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัว และสำหรับ hCG 2038570 และ thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2 ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน อาจจะใช้เป็นตัวแทนบอกถึงความไม่พร้อมของเยื่อโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัว ทั้งนี้ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป
- คำสำคัญ:** ไกลโคโปรตีนโอมิกส์, สารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก, การฝังตัวของตัวอ่อน, เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์

วันที่รับบทความ: ๑๗ มีนาคม ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๓๐ มิถุนายน ๒๕๖๐

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีโอมิกส์ สถาบันจิโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

**** โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา ภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

๙๙ หมู่ ๑๘ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี อีเมล charoenchai1961@hotmail.com

บทนำ

อุบัติการณ์ของภาวะมีบุตรยากพบได้ร้อยละ ๕ - ๑๕ ของคู่สมรสในวัยเจริญพันธุ์ทั่วโลก^{๑, ๒} ปัจจุบันนี้มีการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (assisted reproductive technologies; ART) ในการรักษาภาวะมีบุตรยากกันอย่างแพร่หลาย โดยทำการปฏิสนธิไขกับอสุจิภายนอกร่างกายแล้วเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ ในปัจจุบันมักจะเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจนเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี จะได้รับการคัดเลือกเพื่อย้ายฝากเข้าสู่โพรงมดลูก แม้ว่าจะมีการตรวจวินิจฉัยทางพันธุกรรมของตัวอ่อนก่อนการฝังตัวเพื่อทำให้มีอัตราการตั้งครรภ์สูงขึ้น แต่อัตราความสำเร็จของการตั้งครรภ์โดยเฉลี่ยมีเพียงร้อยละ ๒๕ - ๓๐ ต่อรอบการรักษา^{๓, ๔} ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งคือความล้มเหลวในการฝังตัวของตัวอ่อน

การฝังตัวของตัวอ่อนมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง ๓ อย่างคือ ปัจจัยทางด้านตัวอ่อน ปัจจัยทางด้านเยื่อบุโพรงมดลูก และปัจจัยทางช่วงเวลาของความพร้อมที่สัมพันธ์กัน (synchronized dialogue) ระหว่างระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและความพร้อมของการรองรับการฝังตัวของเยื่อบุโพรงมดลูก (Window of Implantation; WOI)^{๕, ๖} การศึกษาในปัจจุบันส่วนมากมุ่งเน้นการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงและประเมินคุณภาพของตัวอ่อน แต่รายงานการศึกษาที่เกี่ยวกับความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกในช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการฝังตัวของตัวอ่อนยังมีจำนวนน้อย เนื่องจากการศึกษาในส่วนนี้มีความซับซ้อน และการเก็บตัวอย่างเยื่อบุโพรงมดลูกนั้น ในบางกรณีอาจต้องมีการรุกราน (invasive) เยื่อบุโพรงมดลูกที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการการฝังตัวและอัตราสำเร็จในการรักษา

การตรวจประเมินคุณภาพและความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกมีหลายวิธีการ เช่น การตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ (histology) ตามเกณฑ์ประเมินของ Noyes และคณะ^๗ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ยังคงใช้กันอยู่ โดยตรวจวิเคราะห์จากการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) ซึ่งเป็นวิธีการที่รุกราน (invasive) ไม่สามารถนำมาใช้ทางคลินิกในแต่ละรอบการรักษาได้ นอกจากนี้การแปลผลอาจมีความคลาดเคลื่อนได้จากประสบการณ์และทักษะของผู้แปลผลแต่ละคน และขณะนี้ก็ยังไม่สามารถเชื่อมโยงระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุโพรงมดลูกกับความพร้อมในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้อย่างชัดเจน

สำหรับวิธีการตรวจที่ไม่รุกรานที่ใช้ในทางคลินิก ได้แก่ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อตรวจดูความหนาและลักษณะที่

ปรากฏของเยื่อบุโพรงมดลูก^{๘, ๙} ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ราคาไม่แพง แต่ก็ยังไม่สามารถเชื่อมโยงระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุโพรงมดลูกกับความพร้อมในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้อีกเช่นกัน

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาชนิดของโปรตีนและหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (functional proteomics) เพื่อหาตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) ที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงโปรตีนหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translational modifications of proteins; PTMs) สามารถระบุความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกในระดับโมเลกุล โดยทำการศึกษาในกลุ่มไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการเติมและเชื่อมต่อกับหมู่น้ำตาล ที่เรียกว่า ไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับความเสถียรของโปรตีน ระบบภูมิคุ้มกัน การควบคุมคุณภาพใน endoplasmic reticulum และอื่นๆ ซึ่งปัจจุบันการศึกษาไกลโคโปรตีนในสารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกที่มีบทบาทในการฝังตัวของตัวอ่อนในรอบการรักษาด้วยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ยังมีจำนวนน้อย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษา โดยมีการใช้เทคนิค enrichment มาช่วยในการตรวจหาไกลโคโปรตีนที่มีปริมาณน้อยภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพพร้อมกับการใช้ฐานข้อมูล (database) ของโปรตีนในปัจจุบัน ช่วยทำให้สามารถระบุชนิดของไกลโคโปรตีนที่พบได้มากขึ้น

สารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกเป็นสารชีวโมเลกุลที่สร้างและหลั่งออกมามากในช่วงที่มีการเตรียมพร้อมในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน ทำหน้าที่ช่วยในการปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวอ่อนและโพรงมดลูกและมีส่วนร่วมในกระบวนการฝังตัว ดังนั้นจึงเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการศึกษาตัวชี้วัดทางชีวภาพในการระบุความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูก

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งของเยื่อบุโพรงมดลูกจากปลายสายที่ใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อนเข้าสู่โพรงมดลูก (embryo transfer catheter) ภายหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนตามขั้นตอนการรักษาตามปกติ เป็นการเก็บตัวอย่างที่ไม่รุกรานเยื่อบุโพรงมดลูก (non-invasive) และไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการฝังตัว รวมทั้งเป็นการศึกษาที่กระทำในรอบการย้ายฝากตัวอ่อนทั้งที่มีการฝังตัวและไม่ฝังตัวของตัวอ่อน แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ไกลโคโปรตีนเพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูก เพื่อช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จในการฝังตัวของตัวอ่อนและทำให้การรักษาด้วยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่งแบบตัดขวาง (Cross-sectional descriptive study) ได้ใบรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ชุดที่ ๑ จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ MTU-EC-OB-1-149/58 ศึกษาในสตรีที่มีภาวะมีบุตรยาก และมารับการรักษาโดยใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. ๒๕๕๘ ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๙

การใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์

อาสาสมัครจะได้รับการรักษาตามกระบวนการของการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ตามปกติ เกณฑ์การรับอาสาสมัครคือ คู่สมรสฝ่ายหญิงมีอายุ ๒๕ - ๔๐ ปี ไม่มีโรคประจำตัว ไม่มีความผิดปกติทางด้านเยื่อบุโพรงมดลูก ปากมดลูก และรังไข่ มีตัวอ่อนที่เจริญเติบโตไปเป็นระยะบลาสโตซิสต์คุณภาพดี สำหรับเกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครคือ สตรีที่ใส่ตัวอ่อนยากหรือมีเลือดปนเปื้อนที่ปลายสายย้ายฝากตัวอ่อน การรักษาเริ่มจากการกระตุ้นการทำงานของรังไข่โดยใช้ antagonist protocol ได้แก่ การให้ฮอร์โมน recombinant follicle stimulating hormone (Gonal-F®, Merck Serono, Italy) ร่วมกับ gonadotropin releasing hormone antagonist (Cetrotide®, Merck serono, Italy) โดยขนาดความเข้มข้นของยาที่ใช้ขึ้นกับแต่ละบุคคลและตามการตอบสนองของรังไข่ ระหว่างนั้นมีการตรวจติดตามการเจริญเติบโตของรังไข่ด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทางช่องคลอด เมื่อไข่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ๑๘ มิลลิเมตร จำนวนอย่างน้อย ๒ ใบ จึงทำการเหนี่ยวนำให้ไข่ตกโดยใช้ฮอร์โมน recombinant human chorionic gonadotropin (Ovidrel®, Merck Serono, Italy) ขนาดความเข้มข้น ๖,๕๐๐ IU หลังจากนั้น ๓๖ ชั่วโมง ทำการเก็บไข่ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเก็บไข่แล้ว แพทย์จะสอดสายย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer catheter) ผ่านทางช่องคลอดเข้าสู่โพรงมดลูก เพื่อตรวจสอบช่องทางที่จะนำตัวอ่อนไปวางและเพื่อให้มั่นใจว่าวันย้ายฝากตัวอ่อนจริงจะสามารถทำได้โดยไม่มีปัญหาในหัตถการการย้ายฝาก เรียกว่า mock transfer และเพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนโปรตีนในสารคัดหลั่งจากปากมดลูก ในขั้นตอนการทำนั้น แพทย์จะสอดสายย้ายฝากส่วนที่เป็น outer catheter เข้าไปก่อน ผ่านบริเวณปากมดลูกจนถึงโพรงมดลูกส่วนต้น โดยใช้การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงทางหน้าท้องเพื่อช่วยดูตำแหน่ง จากนั้นค่อยสอดสาย inner catheter ผ่านเข้าไปใน outer catheter

จนปลายสาย inner catheter ผ่านปลาย outer catheter ถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในโพรงมดลูกสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน และในขั้นตอนการถอนสาย catheter นั้น แพทย์จะถอนสาย inner catheter เข้ามาใน outer catheter ก่อนจะถอนออกทั้ง ๒ สายผ่านปากมดลูกออกมา ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนได้ (แม้ว่าอาจจะไม่ร้อยละ ๑๐๐) หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการทางผู้วิจัยจะเก็บสารคัดหลั่งที่ส่วนปลายของสายย้ายฝากตัวอ่อนซึ่งเป็นบริเวณที่สัมผัสเยื่อบุโพรงมดลูก โดยตัดปลายสายของ inner catheter ใส่ลงในน้ำยา phosphate buffer saline (PBS) นำไปปั่นให้ตกตะกอน เก็บส่วนบนใสในหลอด แช่แข็งที่อุณหภูมิ -๘๐ องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ โดยตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างของวันเก็บไข่ (วันที่ ๐)

หลังจากเก็บไข่แล้ว ๔ ชั่วโมง นำไข่มาปฏิสนธิกับอสุจิที่เตรียมไว้ด้วยวิธี density gradient centrifugation โดยฉีดอสุจิเข้าไปในเซลล์ไข่ (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) เซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะนำมาเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง Global culture media® (Life-Global, USA) ในตู้เลี้ยงที่มีสภาวะเหมาะสมโดยควบคุมความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ร้อยละ ๖ ออกซิเจน ร้อยละ ๕ และไนโตรเจนร้อยละ ๘๙ ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเป็นเวลา ๕ วัน เมื่อตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ คัดเลือกตัวอ่อนโดยประเมินคุณภาพและแบ่งเกรดตาม Gardner และ Schoolcraft (ปี ค.ศ. ๑๙๙๙)^{๑๐} ตัวอ่อนที่จะย้ายฝากนั้นจะมีอยู่ ๘ ลักษณะ ได้แก่ 3AA, 3AB, 3BA, 3BB, 4AA, 4AB, 4BA และ 4BB การย้ายฝากตัวอ่อนแต่ละครั้งจะย้ายฝากไม่เกิน ๒ ตัวอ่อน ทันทีที่แพทย์ย้ายฝากตัวอ่อนเสร็จทางผู้วิจัยจะเก็บสารคัดหลั่งที่ปลายสายย้ายฝากตัวอ่อน เป็นตัวอย่างวันย้ายฝาก (วันที่ ๕) กระบวนการเก็บตัวอย่างทำเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ใน การเก็บตัวอย่างวันเก็บไข่ (วันที่ ๐) หลังจากนั้นกระบวนการทำ luteal support จะให้ vaginal progesterone gel ๙๐ มิลลิกรัม (Crinone®, Merck serono, Italy) วันละ ๑ ครั้ง ตั้งแต่หลังวันเก็บไข่ (วันที่ ๐) จนถึงวันตรวจการตั้งครรภ์

การเตรียมสารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกและการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีน

จำนวนตัวอย่างที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ จะแบ่งออกเป็น ๓ กลุ่มคือ กลุ่มที่ ๑ เป็นตัวอย่างวันเก็บไข่ (วันที่ ๐) ซึ่งใช้เป็นพื้นฐาน (control) จำนวน ๑๖ ราย โดยเป็นกลุ่มตัวอย่างจากกลุ่มที่มีการฝังตัวและไม่ฝังตัวของตัวอ่อนอย่างละ ๘ ราย โดยการคัดเลือก ๘ รายจากใน ๑๖ รายของแต่ละ

กลุ่มศึกษา ใช้การเลือกแบบสุ่มดังนี้ เลือกสายที่เป็นลำดับเลขคู่ ต่อเนื่องไป ได้แก่ ลำดับที่ ๒, ๔, ๖, ๘, ๑๐, ๑๒, ๑๔, ๑๖ จนครบ ๘ ราย สำหรับกลุ่มที่ ๒ เป็นตัวอย่างวันย้ายฝาก (วันที่ ๕) ที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน จำนวน ๑๖ ราย และกลุ่มที่ ๓ เป็นตัวอย่างวันย้ายฝาก (วันที่ ๕) ที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน จำนวน ๑๖ ราย นำตัวอย่างของแต่ละรายมาวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเทคนิค Lowry assay^{๑๑} เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณของตัวอย่างแต่ละรายที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างเท่าๆ กัน แล้วจึงนำตัวอย่างดังกล่าวมา pool รวมกันในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา

นำตัวอย่างทั้ง ๓ กลุ่มข้างต้นมาทำให้ไกลโคโปรตีน มีความเข้มข้น (enrichment) มากขึ้น โดยใช้เทคนิค immobilized lectin columns concanavalin A (ConA) affinity kit (Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology, United States) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใส่ตัวอย่างที่มีโปรตีนความเข้มข้น ๔๐๐ ไมโครกรัม ลงใน ConA lectin resin ปริมาตร ๘๐ ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑๐ นาทีพร้อมกับเขย่า จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างส่วนที่ไม่ใช่ไกลโคโปรตีนออก โดยใช้ 5X binding/wash buffer จำนวน ๓ ครั้ง เก็บส่วนที่เป็นไกลโคโปรตีนโดยใช้ elution buffer ๑๖๐ ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๕ นาที จากนั้นปั่นล้าง ทำซ้ำ ๓ ครั้ง นำส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

ทำการย่อยไกลโคโปรตีนให้เป็นสายสั้นๆ โดยใช้ Dithiothreitol (DTT) ความเข้มข้น ๕ มิลลิโมลต่อลิตร (Sigma, St. Louis, MO, USA) ซึ่งเป็น reducing agent ทำลายพันธะของ disulfide บ่มที่อุณหภูมิ ๕๖ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๖๐ นาที ตามด้วย Iodoacetamide (IAA) ความเข้มข้น ๑๕ มิลลิโมลต่อลิตร

(Sigma, St. Louis, MO, USA) บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๖๐ นาที จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promega Corp., Madison, WI, USA) ปริมาณความเข้มข้น substrate: enzyme คือ ๑:๒๐ บ่มที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

วิเคราะห์ไกลโคเปปไทด์ด้วยเครื่อง Liquid chromatography with tandem mass spectrometry (SYNAPTTM HDMS mass spectrometer, Waters Corp., Manchester, UK) ระบุชนิดของไกลโคโปรตีนด้วยชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ได้แก่ วิเคราะห์เพปไทด์ที่ได้โดย DeCyderTM MS Differential analysis software (DeCyder MS) (Version 2.0, Thermo Scientific, USA) ระบุชนิดของเพปไทด์โดย Mascot algorithm 2.2.1 software (Matrix Science, London, UK) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดย Venn diagram (<http://bioinfo.genotoul.fr/jvenn/>) และตรวจสอบข้อมูลโปรตีนโดย Universal protein resource (UniProt) database (<http://www.uniprot.org/>)

ผลการศึกษา

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มศึกษา

อาสาสมัครในการศึกษาคั้งนี้แบ่งเป็น ๒ กลุ่ม คือ อาสาสมัครที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ อายุ, Body mass index (BMI), จำนวนยาที่ใช้ในการกระตุ้น, จำนวนไข่ที่เก็บได้, จำนวนไข่ระยะ M II, จำนวนไข่ที่ได้รับปฏิสนธิ, จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ ๕, จำนวนตัวอ่อนที่ใส่กลับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทั้ง ๒ กลุ่ม (p-value > ๐.๐๕) รายละเอียดดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มศึกษา

ค่าพารามิเตอร์	กลุ่มที่ฝังตัว (n = ๑๖)	กลุ่มที่ไม่ฝังตัว (n = ๑๖)	p-value ^a
อายุ (ปี)	๓๓.๘๗ ± ๒.๗๙ (๒๙ - ๓๙)	๓๔.๑๐ ± ๓.๔๓ (๒๗ - ๔๐)	๐.๗๗๓
BMI	๒๑.๔๒ ± ๑.๑๘ (๑๙.๔๐ - ๒๔.๓๐)	๒๑.๘๐ ± ๑.๒๕ (๑๙.๗๐ - ๒๓.๘๐)	๐.๒๓๖
จำนวนยาที่ใช้ในการกระตุ้น (IU)	๒,๐๘๐ ± ๔๒๑.๔๘ (๑,๓๕๐ - ๒,๗๐๐)	๒,๐๒๗.๕ ± ๔๙๖.๕๑ (๑,๒๐๐ - ๒,๗๐๐)	๐.๖๖๐
จำนวนไข่ที่เก็บได้	๘.๗๐ ± ๒.๓๒ (๕ - ๑๔)	๘.๔๗ ± ๓.๐๓ (๔ - ๑๖)	๐.๗๓๙
จำนวนไข่ระยะ M II	๗.๓๓ ± ๑.๘๓ (๓-๑๑)	๖.๘๗ ± ๒.๙๔ (๒-๑๓)	๐.๔๖๔
จำนวนไข่ที่ได้รับปฏิสนธิ	๕.๗๐ ± ๑.๕๑ (๓ - ๘)	๕.๓ ± ๒.๒๗ (๒ - ๑๐)	๐.๔๒๖
จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ ๕	๓.๒๐ ± ๑.๒๔ (๑ - ๕)	๓.๐๖ ± ๑.๘๑ (๑ - ๗)	๐.๗๔๑
จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีที่ใส่กลับ ^b	๑.๖๗ ± ๐.๔๘ (๑ - ๒)	๑.๖๓ ± ๐.๔๙ (๑ - ๒)	๐.๗๙๕

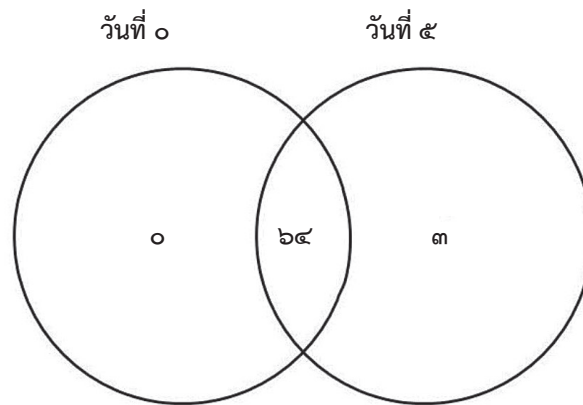
ค่าทั้งหมดรายงานผลเป็น mean ± SD, ช่วงของค่าทั้งหมด แสดงผลอยู่ในวงเล็บ

^a = เปรียบเทียบโดยใช้ t-test

^b = ตัวอ่อนคุณภาพดี ประเมินคุณภาพและแบ่งเกรดตาม Gardner และ Schoolcraft (ปี ค.ศ. ๑๙๙๙)^{๑๐} ซึ่งอยู่ใน ๘ ลักษณะ ได้แก่ 3AA, 3AB, 3BA, 3BB, 4AA, 4AB, 4BA และ 4BB

ผลการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีนในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก พบไกลโคโปรตีนในวันเก็บไข่ (วันที่ ๐) ที่ได้จากกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๘ ราย และกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๘ ราย รวมเป็น ๑๖ ราย จำนวน ๖๔ ชนิด และวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) ที่ได้จากกลุ่มที่มีการฝังตัวของ

ตัวอ่อน ๑๖ ราย และกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน ๑๖ ราย รวมเป็น ๓๒ ราย จำนวน ๖๗ ชนิด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวันที่ ๐ กับวันที่ ๕ พบว่า มี ๓ ชนิดที่พบเฉพาะในวันที่ ๕ ดังรูปที่ ๑ สำหรับรายละเอียดของไกลโคโปรตีนที่พบแสดงในตารางที่ ๒



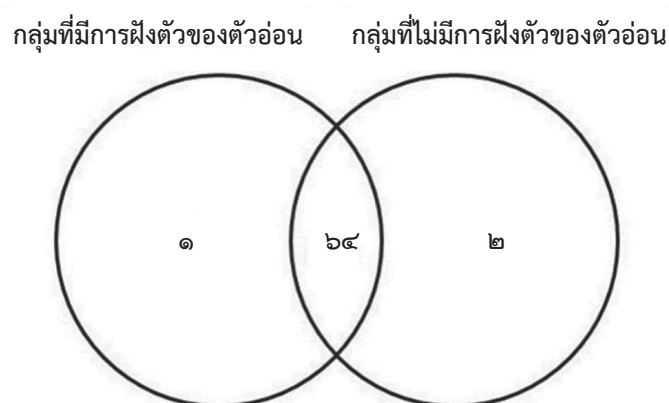
รูปที่ ๑ แผนภูมิ Venn diagram แสดงการเปรียบเทียบจำนวนไกลโคโปรตีนที่พบในวันเก็บไข่ (วันที่ ๐) และวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕)

ตารางที่ ๒ ไกลโคโปรตีน ๓ ชนิดในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก ที่พบในวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) แต่ไม่พบในวันเก็บไข่ (วันที่ ๐)

Accession No.	Peptide sequence	Protein description
gi 11954514	ALATK	hCG1997574, isoform CRA_a
gi 578838475	KGEDGK	high mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5 isoform X3
gi 2174758	EGAEK	unnamed protein product

ผลการวิเคราะห์ไกลโคโปรตีนในวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการฝังตัวและไม่ฝังตัว พบไกลโคโปรตีน ๑ ชนิดที่มีเฉพาะในกลุ่มที่ฝังตัว และ

๒ ชนิดที่มีเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัว ดังรูปที่ ๒ สำหรับรายละเอียดของไกลโคโปรตีนที่พบแสดงในตารางที่ ๓



รูปที่ ๒ แผนภูมิ Venn diagram แสดงการเปรียบเทียบจำนวนไกลโคโปรตีนที่พบในวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) ในกลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อนและกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

ตารางที่ ๓ ชนิดและระดับการแสดงออก (intensity) ของไกลโคโปรตีนในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูกวันย้ายฝากตัวอ่อน (วันที่ ๕) ที่พบเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัว (กลุ่มที่ ๒) และในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัว (กลุ่มที่ ๓)

Accession No.	Peptide sequence	Protein description	Do pool (P*+ NP**)	D5 (P*)	D5 (NP**)
gi 10835242	AYEDAEAK	cGMP-dependent protein kinase 1 isoform 2	๗.๔๖๕๕	๙.๐๔๙๔	๐.๐๐๐๐
gi 119599937	FQHFRRPR	hCG2038570	๗.๕๐๗๒	๐.๐๐๐๐	๔.๕๓๑๘
gi 148727319	KEEKVDELCGALK	thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2	๙.๙๒๗๓	๐.๐๐๐๐	๒.๔๖๓๘

P* หมายถึง กลุ่มที่มีการฝังตัวของตัวอ่อน, NP** หมายถึง กลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน

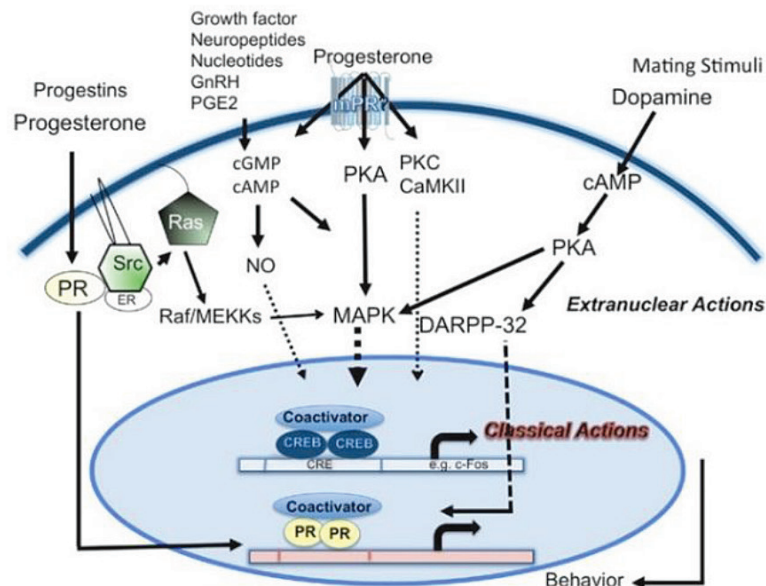
วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้มีการใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ ร่วมกับการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน ที่เรียกว่า functional proteomics ที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัสของโปรตีน (post-translational modifications of proteins; PTMs) โดยทำการศึกษากลุ่มไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ในสารคัดหลั่งจากเยื่อโพรงมดลูก ซึ่งพบว่ามีไกลโคโปรตีนที่แสดงออกในช่วง pre-receptive phase จำนวน ๖๔ ชนิด และแสดงออกในช่วง receptive phase จำนวน ๖๗ ชนิด โดยที่ไกลโคโปรตีนทั้ง ๖๔ ชนิดที่พบในช่วง pre-receptive phase จะพบต่อเนื่องไปในช่วง receptive phase ด้วยทั้งหมด สำหรับไกลโคโปรตีน ๓ ชนิดที่พบเฉพาะในช่วง receptive phase อาจจะช่วยในการตรวจหาว่าเยื่อโพรงมดลูกอยู่ในระยะ receptive phase หรือ window period of implantation (WOI) หรือไม่ โดยต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ไกลโคโปรตีนที่อยู่ในช่วง receptive phase และแสดงออกเฉพาะในกลุ่มที่มีการฝังตัว คือ cGMP-dependent protein kinase 1 isoform 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinase) ออกฤทธิ์กระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (protein phosphorylation) ให้กับโปรตีนเป้าหมาย มีบทบาทในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณของ cGMP/nitric oxide

(NO) signaling pathway โดยผ่านตัวส่งสัญญาณตัวที่สอง (second messenger) คือ cGMP ทำให้เกิดการส่งและขยายสัญญาณต่อไปภายในเซลล์ ทำให้มีการหลั่งแคลเซียม ซึ่งจะกระตุ้น Ca²⁺ dependent enzyme เช่น NO synthase ต่อไป

โปรตีนที่ถูกเติมฟอสเฟตจาก cGMP-dependent protein kinase 1 มีบทบาทต่อกระบวนการฝังตัวของตัวอ่อน โดยเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของเยื่อโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน^{๑๖} มีกลไกการออกฤทธิ์ ๒ แบบ คือ ออกฤทธิ์โดยจับกับรีเซพเตอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ และจับกับรีเซพเตอร์ที่อยู่ในนิวเคลียส สำหรับการจับกับรีเซพเตอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์จะนำไปสู่การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signaling pathway) โดยผ่านการถ่ายทอดสัญญาณของ cGMP และ cAMP ซึ่งผ่านต่อไปทาง nitric oxide (NO) signaling pathway และ MAPK signaling pathway แล้วผ่านเข้าไปจับกับ cGMP responsive element binding protein 1 (CREB) ในนิวเคลียส ที่จับอยู่กับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง DNA-cGMP response element (CRE) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เยื่อโพรงมดลูก ซึ่งอาจจำเป็นสำหรับการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน^{๑๗} (รูปที่ ๓)



รูปที่ ๓ แสดงการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (From Mani SK, Oyola MG. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:7)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า cGMP-dependent protein kinase 1 ที่มีปริมาณมากขึ้นในสารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกในวันที่ย้ายฝากตัวอ่อนอาจจะทำให้มีการแสดงออกของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนผ่าน intracellular signaling pathway มีผลทำให้เกิดความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน และอาจจะใช้เป็นตัวชี้วัดความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับไกลโคโปรตีนซึ่งพบในช่วง receptive phase และแสดงออกเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัว คือ hCG 2038570 และ thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2 อาจจะใช้เป็นตัวชี้วัดถึงความไม่พร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้

Thioredoxin (Trx) เป็น co-substrate ร่วมกับ thioredoxin reductase ในระบบเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidant) ร่วมกับ thioredoxin reductase มีบทบาทสำคัญเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระและควบคุมสภาวะออกซิเดชันรีดักชัน (redox) และเกี่ยวข้องกับการตอบสนองระดับเซลล์ โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโมเลกุลมี ๓ แบบ ได้แก่ Trx-1 พบในไซโตซอล Trx-2 พบในไมโทคอนเดรีย และ Trx-3 พบในอสุจิ ระดับของ Trx จะถูกกระตุ้นโดยภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดจากสารก่อออกซิเดชัน ความร้อน รังสีอัลตราไวโอเลต และการได้รับยาเคมีบำบัด

สำหรับเยื่อบุโพรงมดลูก จากการศึกษาค้นคว้าของ Tetsuo Maruyama และคณะ ปี ค.ศ. ๑๙๙๗^{๑๔} ในชิ้นเนื้อมดลูกที่ตัดออก (hysterectomy) และเนื้อเยื่อโพรงมดลูกที่ตัดออก (endometrial biopsy) พบว่ามี Trx ในเนื้อเยื่อของ endometrial gland ในช่วง late proliferative phase และการแสดงออกจะสูงสุดในช่วง early secretory phase และมีการแสดงออกลดลงจนอยู่ในระดับปานกลางในช่วง mid secretory phase จนถึงช่วง late secretory phase อาจจะมีบทบาทในการต้านออกซิเดชันและการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยควบคุมให้มีสารออกซิแดนท์ (oxidant) อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อรักษาสสมดุลการทำงานของเซลล์เยื่อบุโพรงมดลูก^{๑๔-๑๖}

Thioredoxin 2 (Trx2) เป็นโปรตีนที่พบในไมโทคอนเดรีย^{๑๗} จากการศึกษาค้นคว้าพบ Trx2 ในสารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกตั้งแต่วันที่เก็บไข่ (วันที่ ๐) และพบปริมาณน้อยลงในวันที่ใส่ตัวอ่อน (วันที่ ๕) ในกลุ่มที่ไม่ฝังตัว แต่จะไม่พบในกลุ่มที่มีการฝังตัว Trx2 ทำหน้าที่ในการต้าน ROS ในไมโทคอนเดรียที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส การพบ Trx2 ที่ยังมีอยู่ในสารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงมดลูกในกลุ่มที่ไม่มีการฝังตัวในวันที่ย้ายฝากตัวอ่อน อาจเกิดจากการที่มี Trx2 ที่มีปริมาณมากเพื่อใช้ในการกระบวนการป้องกันตัวเองต่อการเพิ่มระดับ ROS ภายในเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่มากเกินไป จนมีการหลั่งออกมาในสารคัดหลั่งเยื่อบุโพรงมดลูกที่มากขึ้น หรืออาจเกิดจากการรั่วซึมของเซลล์ที่ตายจาก ROS

ที่เพิ่มขึ้น^{๑๘, ๑๙} แสดงให้เห็นถึงภาวะเยื่อโพรงมดลูกที่อาจจะไม่พร้อมต่อการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อน ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับ hCG2038570 ยังไม่สามารถระบุชนิดของไกลโคโปรตีนชนิดนี้ในฐานข้อมูลของ NCBI จึงไม่สามารถที่จะศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมได้

การตรวจวิเคราะห์ ในอนาคตหากสามารถทำได้ก่อนการย้ายฝากตัวอ่อน แพทย์สามารถที่จะเลือกกว่าคนไข้อย่างใดที่ตรวจพบ glycosylate cGMP-dependent protein kinase 1 ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่จะช่วยบอกถึงความพร้อมของเยื่อโพรงมดลูก และอาจจะนำมาช่วยในการตัดสินใจที่จะดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนตามที่วางแผนการรักษา หรือคนไข้รายใดที่ตรวจพบ glycosylate ของ hCG2038570 และ thioredoxin domain containing protein 2 isoform 2 ซึ่งอาจจะแสดงถึงความไม่พร้อมของเยื่อโพรงมดลูก และอาจจะนำมาใช้ในการยกเลิกการย้ายฝากตัวอ่อนในรอบการรักษา นั้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการทำงานของโปรตีนทั้ง ๓ ชนิดไม่ได้จำเพาะต่อเยื่อโพรงมดลูกเท่านั้น จึงอาจไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดที่เป็น definite biomarker ได้ แต่อาจจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นส่วนหนึ่งในการบ่งชี้ (indicator) ถึงความพร้อมและไม่พร้อมของเยื่อโพรงมดลูกในการรองรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้

การศึกษานี้มีข้อดีคือ เป็นการเก็บตัวอย่างจากสารคัดหลั่งของเยื่อโพรงมดลูก ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในขั้นตอนการรักษาตามปกติ สามารถทำได้ง่ายและไม่รุกรานเยื่อโพรงมดลูกโดยไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการฝังตัวของตัวอ่อน รวมทั้งทำการศึกษาในรอบระยะที่มีการย้ายฝากตัวอ่อนและในกลุ่มที่มีและไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อน จึงสามารถประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้สำหรับข้อจำกัดคือปริมาณโปรตีนที่ได้มีน้อย การตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่มีความไวและความละเอียดสูงเพียงพอ รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายสูง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อในจำนวนประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งควรมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงเกินไป สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาภาวะมีบุตรยาก

จากการศึกษานี้ ไกลโคโปรตีนอาจจะนำไปสู่การหาสารชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) สำหรับการประเมินความพร้อมของเยื่อโพรงมดลูก ซึ่งจะช่วยให้การรักษาประสบความสำเร็จและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม PTMs นั้นยังมีอีกหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มที่มีการเติมฟอสเฟต

(phosphorylation) กลุ่มที่มีการเติมอะเซทิล (acetylation) เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไปอีกเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงานวิจัยจากกองทุนวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์เจ้าหน้าที่หน่วยมีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007;22:1506-12.
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update* 2015;21:411-26.
3. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010;25:1851-62.
4. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, et al. European IVF-monitoring (EIM) Consortium; European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756-71.

๕. Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation. *Vitamins and hormones* 1973;31:201-56.
๖. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992;58:537-42.
๗. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122:262-3.
๘. Gonen Y, Casper RF. Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990;7:146-52.
๙. Bonilla-Musoles F, Raga F, Osborne NG, Castillo JC, Bonilla F Jr. Endometrial receptivity: evaluation with ultrasound. *Ultrasound Q* 2013;29:3-20.
๑๐. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:307-11.
๑๑. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
๑๒. Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-regulated endometrial factors controlling implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016;75: 237-45.
๑๓. Mani SK, Oyola MG. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:7.
๑๔. Maruyama T, Kitaoka Y, Sachi Y, Nakanoin K, Hirota K, Shiozawa T, et al. Thioredoxin expression in the human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1997;3:989-93.
๑๕. Stavréus-Evers A, Masironi B, Landgren BM, Holmgren A, Eriksson H, Sahlin L. Immunohistochemical localization of glutaredoxin and thioredoxin in human endometrium: a possible association with pinopodes. *Mol Hum Reprod* 2002;8:546-51.
๑๖. Maruyama T, Sachi Y, Furuke K, Kitaoka Y, Kanzaki H, Yoshimura Y, et al. Induction of thioredoxin, a redox-active protein, by ovarian steroid hormones during growth and differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology* 1999;140:365-72.
๑๗. Zhang R, Al-Lamki R, Bai L, Streb JW, Miano JM, Bradley J, et al. Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res* 2004;94:1483-91.
๑๘. Hansen JM, Zhang H, Jones DP. Mitochondrial thioredoxin-2 has a key role in determining tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, NF-kappaB activation, and apoptosis. *Toxicol Sci* 2006;91:643-50.
๑๙. Chen Y, Zhang H, Zhou HJ, Ji W, Min W. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. *Cancers (Basel)* 2016;8(4). pii:E40.

Abstract

Glycoproteomics of endometrial secretion during pre-receptive and receptive phase in implantation and non-implantation assisted reproductive technology cycles

Jindarat Jenkiengkri*, Charoenchai Chiamchanya**, Sittiruk Roytrakul***, Pachara Visutakul****

* Candidate for Ph.D., Faculty of Medicine, Thammasat University

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

*** The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand science park

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

Corresponding author: Charoenchai Chiamchanya, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Thammasat University E-mail: charoenchai1961@hotmail.com

Introduction: The endometrial receptivity assessment has been an important challenge for success in the assisted reproductive technology (ART) treatment of infertility. However, the evaluation methods are still not currently accomplished due to lack of reliable markers for endometrial receptivity. Objective was to study glycoproteins from endometrial secretion with a non-invasive approach that may be useful leading to further study for biomarkers of human endometrial receptivity during the window period of implantation (WOI).

Method: The study was performed in infertile couples with assisted reproductive technology treatment at Thammasat fertility center, including total of 32 infertile couples of which 16 were implantation patients and another 16 were non-implantation patients. Endometrial secretions were collected from embryo transfer catheter tip of 8 implantation plus 8 non-implantation patients (group I) at the oocyte retrieval day (day 0) and of 16 implantation patients (group II), 16 non-implantation patients (group III) at embryo transfer day (day 5). The sample from each group was analysed for glycoproteins. The glycosylated proteins enrichment was performed and analysed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and interpreted by using the bio-informatics.

Result: LC-MS/MS analysis of endometrial secretion identified 64 glycoproteins expressed at D0 (group I). Whereas 67 glycoproteins expressed in D5 (group II plus group III), of which 3 glycoproteins were differentially expressed between implantation and non-implantation groups. One glycoprotein, cGMP-dependent protein kinase 1 isoform 2, found only in implantation group (group II) and two glycoproteins, human coding gene (hCG) 2038570 and thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2, found only in non-implantation group (group III).

Discussion and Conclusion: This study represented a glycoproteomic study of endometrial secretion from ART treatment patients. Sixty-four glycoproteins expressed at D0 and D5 may represent majority of glycoproteins in endometrial secretion presented from pre-receptive through receptive periods. The 3 glycoproteins expressed only at D5 may represent receptive phase of endometrium (Window of implantation; WOI). At D5, cGMP-dependent protein kinase 1 which was found only in implantation group may be useful as potential biomarkers for endometrial receptivity, Whereas, hCG 2038570 and thioredoxin domain-containing protein 2 isoform 2 which were found only in non-implantation group may be useful as potential biomarkers for endometrial non-receptivity. Anyhow, further study is required.

Key words: Glycoproteomics, Endometrial secretion, Embryo implantation, Assisted reproductive technology