

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5980231

รหัสโครงการ : MRG5980231

Project Title : Sperm mitochondrial functions related to post-thaw sperm quality, intracellular energy storage and fertilization ability in domestic and endangered wild felids

ชื่อโครงการ : การศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของไมโทคอนเดรียต่อคุณภาพตัวอสุจิแช่แข็ง การสะสมพลังงานและความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายในแมวบ้านและสัตว์ป่าตระกูลแมว

Investigator : Paweena Thuwanut (DVM, MSc, PhD)

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

ชื่อนักวิจัย: สัตวแพทย์หญิง ดร. ปวีณา ฐวะหุติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : paweena.thuwanut@gmail.com

อาจารย์ที่ปรึกษา:

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ สัตวแพทย์หญิง ดร.นุชจรินทร์ ศงสะเสน

Adjunct Professor Dr. Pierre Comizzoli

สถาบันสมิธโซเนียน ประเทศสหรัฐอเมริกา

ศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี จัตรตรงค์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ นพ. กำธร พฤษานานนท์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Period : 2 years

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

Keywords : พลังงาน ไมโทคอนเดรีย ตัวอสุจิ สัตว์ตระกูลแมว

คำหลัก: Energy Mitochondria Sperm Felids

Abstract

The main objectives of the present study were to 1. investigate major pathway that regulated sperm energy production or storage and related to post-thaw sperm quality as well as fertilizing ability using domestic cats as research models (Research project 1) and 2. apply basic knowledge gained from research animal models to a further study as clinical trial in endangered wild felids (i.e. clouded leopard; *Neofelis nebulosa*) (Research project 2). In research project 1; epididymal cat sperm was collected and investigated for 1. expression of mitochondrial protein related to intracellular energy production or storage (i.e. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK (α subunit))) 2. effects of AMPK- α activation by chemical substances (i.e. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAR)) at different dose and time-dependent manner to post-thaw sperm quality and fertilizing ability by homologous *in vitro* fertilization (IVF) and 3. AMPK- α /AICAR signalling pathways including expression of phospho-AMPK α protein Thr172; expression of glucose transporter1 (GLUT1) protein and intracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) level. Our main results demonstrated that AMPK protein (α subunit) dominantly expressed in sperm with high proportion of motility ($\geq 70\%$ motility) compared to samples with low proportion of motility (≤ 0.05) ($P \leq 0.05$). The presence of AMPK activator, AICAR, could regulate AMPK function (AICAR/AMPK regulation pathway) via increase of phospho-AMPK α Thr172, GLUT1 protein expression (GLUT1 translocation) and intracellular ATP level. Furthermore, short equilibration of AMPK- α protein with 0.5 mM AICAR for 30 min prior to cryopreservation procedure positively influenced epididymal cat sperm functions (sperm motility, sperm motility patterns (curve linear velocity and straight linear velocity) and cleavage rate after homologous IVF) without deleterious effects to sperm membrane integrity or sperm viability ($P \leq 0.05$). In research project 2; we, hence, applied the basic knowledge from research project 1 to clinical trial phase in endangered wild cats. The present results mainly indicated that AMPK- α protein was also present in ejaculated sperm of clouded leopards. Similar to the domestic cats, the activation of AMPK- α by 0.5 mM AICAR for 30 min prior to cryopreservation process enhanced post-thaw sperm motility without the deleterious effects to sperm viability and acrosome integrity. Due to the limitation of female clouded leopard research accessibility i.e. oocyte collection by ovum pick-up technology, our data on embryo production by homologous IVF was then absent. However, the authors strongly believed that the applied research from our basic science

present in this study should be further conducted in other endangered wild felid species in Thailand with the ultimate purpose of new offspring production and wildlife conservation.

บทคัดย่อ

การศึกษาและวิจัยเรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิ ต่อคุณภาพตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็ง พลังงานในเซลล์ และความสามารถในการปฏิสนธิในแมวบ่านและสัตว์ป่าตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษา 1. กลไกที่เกี่ยวข้องกับการสะสมและสร้างพลังงานในเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอสุจิ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการทำงาน คุณภาพ และความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาตัวอสุจิ กระบวนการแช่แข็ง โดยใช้แมวบ่านเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 1) และ 2. ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ทางพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในสัตว์ทดลองต้นแบบในการนำไปใช้จริงในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 2) โดยในโครงการศึกษาวิจัยที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึง 1. การแสดงออกของโปรตีนในไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิของแมวบ่านที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (ได้แก่ โปรตีน 5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase; AMPK (α subunit)) 2. ผลของการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสารเคมีชนิด 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAR) ที่เวลาและความเข้มข้นต่างกัน ต่อคุณภาพของตัวอสุจิ และความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ภายหลังกระบวนการแช่แข็งตัวอสุจิ 3. กลไกเชิงชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ AMPK- α /AICAR ได้แก่ ปฏิกริยาฟอสโฟลิเรชันของโปรตีน AMPK- α (phospho-AMPK α (Thr172)) โปรตีนชนิด Glucose transporter 1 (GLUT1) และระดับของพลังงานภายในเซลล์ (intracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP)) ในโครงการศึกษาวิจัยที่ 2 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึง 1. การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิของเสือลายเมฆ และ 2. ผลของการทำงานของ AMPK- α /AICAR ต่อคุณภาพตัวอสุจิเสือลายเมฆภายหลังกระบวนการแช่แข็ง ผลการศึกษาในแมวบ่านซึ่งเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 1) พบการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิของแมวบ่าน (โดยกลุ่มแมวบ่านที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 มีระดับการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α สูงกว่ากลุ่มแมวบ่านที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 50 ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้การทำงานของ AMPK- α /AICAR ที่ AICAR ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลลาร์ เป็นเวลา 30 นาที สามารถกระตุ้นคุณภาพของตัวอสุจิภายหลังกระบวนการแช่แข็งได้แก่ ต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (curve linear velocity และ straight linear velocity) ร้อยละของการพัฒนาของตัวอ่อนไปสู่ระยะ 2 เซลล์ภายหลังกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ($P \leq 0.05$) และไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ โดยจากการศึกษานี้พบว่า AMPK- α /AICAR ได้ทำงานผ่านกระบวนการทำงานของปฏิกริยา phospho-AMPK α (Thr172) การทำงานของโปรตีน Glut1 (Glut1 translocation) และการเพิ่มของระดับพลังงานในตัวอสุจิ เมื่อนำองค์ความรู้ที่ได้จากสัตว์ทดลองต้นแบบไปประยุกต์ใช้จริงในสัตว์ป่าตระกูลแมว เช่น เสือลายเมฆ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 2) พบว่า ตัวอสุจิของเสือลายเมฆมีการ

แสดงออกของโปรตีน AMPK- α เช่นเดียวกับในแมวบ้าน รวมทั้ง ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของเสื่อลายเมฆภายหลังกระบวนการแช่แข็งมีค่าสูงในกลุ่มตัวอสุจิที่ได้รับการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสารเคมีชนิด AICAR เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามด้วยข้อจำกัดของการศึกษาในเสื่อลายเมฆเพศเมีย เช่นความสามารถในการเก็บเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์ จึงทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถทำการศึกษาถึงผลการทำงานของ AMPK- α /AICAR AICAR ต่อความสามารถในการปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อนได้ ดังนั้นโครงการวิจัยในอนาคตควรมุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสร้างพลังงานในไมโทคอนเดรียของอสุจิในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ ต่อกระบวนการการปฏิสนธิและพัฒนาของตัวอ่อน เพื่อประโยชน์สูงสุดในการเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ป่า