



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของไมโทคอนเดรียต่อคุณภาพตัวอสุจิ
แช่แข็ง การสะสมพลังงานและความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในแมวบ้าน
และสัตว์ป่าตระกูลแมว

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

โดย

สัตวแพทย์หญิง ดร. ปวีณา ชูระนฤติ

พฤษภาคม พ.ศ. 2561

สัญญาเลขที่ MRG5980231

โครงการ

การศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของไมโทคอนเดรียต่อคุณภาพตัวอสุจิ
แช่แข็ง การสะสมพลังงานและความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายในแมวบ้าน
และสัตว์ป่าตระกูลแมว

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

โดย

สัตวแพทย์หญิง ดร. ปวีณา ชูระนุติ

ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต้นสังกัดเดิม ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนูเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และต้นสังกัด

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 ฐะนุติ

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 จัทรตรงค์

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 I 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 และความสามารถในการปฏิสนธิในแมวน้ำและสัตว์ป่าตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษา 1. กลไกที่เกี่ยวข้องกับการสะสมและสร้างพลังงานในเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอสุจิ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการทำงาน คุณภาพ และความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาตัวด้วยกระบวนการแช่แข็ง โดยใช้แมวน้ำเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 1) และ 2. ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ทางพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในสัตว์ทดลองต้นแบบในการนำไปใช้จริงในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 2) โดยในโครงการศึกษาวิจัยที่ 1 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึง 1. การแสดงออกของโปรตีนในไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิของแมวน้ำที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (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 ปฏิกริยาฟอสโฟลิเรชั่นของโปรตีน AMPK- α (phospho-AMPK α (Thr172)) โปรตีนชนิด Glucose transporter 1 (GLUT1) และระดับของพลังงานภายในเซลล์ (intracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP)) ในโครงการศึกษาวิจัยที่ 2 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึง 1.การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิของเสีอลายเมฆ และ 2. ผลของการทำงานของ AMPK- α /AICAR ต่อคุณภาพตัวอสุจิเสีอลายเมฆภายหลังกระบวนการแช่แข็ง ผลการศึกษาในแมวน้ำซึ่งเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 1) พบการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิของแมวน้ำ (โดยกลุ่มแมวน้ำที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 มีระดับการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α สูงกว่ากลุ่มแมวน้ำที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 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 ($P \leq 0.05$) และไม่ส่งผลกระทบเชิงลบต่ออัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ โดยจากการศึกษานี้พบว่า AMPK- α /AICAR ได้ทำงานผ่านกระบวนการทำงานของปฏิกริยา phospho-AMPK α (Thr172) การทำงานของโปรตีน Glut1 (Glut1 translocation) และการเพิ่มของระดับพลังงานในตัวอสุจิ เมื่อนำองค์ความรู้ที่ได้จากสัตว์ทดลองต้นแบบไปประยุกต์ใช้จริงในสัตว์ป่าตระกูลแมว เช่น เสีอลายเมฆ (โครงการศึกษาวิจัยที่ 2) พบว่า ตัวอสุจิของเสีอลายเมฆมีการ

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

1. วัตถุประสงค์

- วัตถุประสงค์หลัก

- เพื่อศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการสะสมและสร้างพลังงานในเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ ตัวอสุจิ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการทำงาน คุณภาพ และความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษาตัวด้วยกระบวนการแช่แข็ง โดยใช้เมวบ้านเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ
- เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ทางพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ในสัตว์ทดลองต้นแบบ ในการนำไปใช้จริงในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

- วัตถุประสงค์ย่อย

- โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาในสัตว์ต้นแบบ

- เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวอสุจิ เช่น โปรตีน 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (α subunit) และการทำงานของ Mitochondrial permeability transition pore (MPTP) ในตัวอสุจิของเมวบ้าน
- เพื่อศึกษาผลของกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวอสุจิ ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ เช่น 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAR) ที่เวลาและความเข้มข้นต่างกัน ต่อคุณภาพของตัวอสุจิแช่แข็ง ภายหลังการละลาย รวมทั้งความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย
- เพื่อศึกษากลไกเชิงชีวโมเลกุลในการทำงานของสารเคมี/โปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวอสุจิ ผ่านปฏิกิริยาระดับเซลล์

- โครงการย่อยที่ 2 การนำองค์ความรู้ไปใช้จริงทางปฏิบัติ

- เพื่อศึกษาผลการแสดงออกของโปรตีนและสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานต่อคุณภาพของตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็น ในสัตว์ป่าตระกูลแมวที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้แก่ เสือลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*)

2. วิธีการทดลอง

- โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาในสัตว์ต้นแบบ

สัตว์ทดลอง

- ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ใช้แมวบ้านเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ
- สัตว์ทดลองเพศผู้ ทำการเก็บตัวอย่างตัวสุจิได้ทำการแยกเก็บจากท่ออพิดีไดมิสส่วนท้าย (caudal epididymis) จากอณฑะ (testis) ของแมวบ้านโตเต็มวัย ไม่ทราบอายุ สุขภาพแข็งแรง ที่ได้รับการผ่าตัดทำหมันถาวร ที่กลุ่มควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า อาคารสำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร จำนวนทั้งหมด 128 ตัว
- สัตว์ทดลองเพศเมีย ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์จากรังไข่ของแมวบ้านเพศเมียโตเต็มวัย ไม่ทราบอายุ สุขภาพแข็งแรง ที่ได้รับการผ่าตัดทำหมันถาวร ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกลุ่มควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า อาคารสำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร จำนวนทั้งหมด 49 ตัว

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 โครงการย่อยได้แก่

- โครงการวิจัยย่อยที่ 1.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวสุจิ ซึ่งได้แก่ โปรตีน 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (α subunit) ในตัวสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 และต่ำกว่าร้อยละ 50
- โครงการย่อยที่ 1.2 การศึกษาผลของกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสาร 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) ที่เวลาและความเข้มข้นต่างกัน ก่อนทำการแช่แข็งตัวสุจิ
- โครงการย่อยที่ 1.3 การศึกษาผลของสาร AICAR ต่อคุณภาพของตัวสุจิแช่แข็งภายหลังการละลาย รวมทั้งความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกอกร่างกาย
- โครงการย่อยที่ 1.4 การศึกษากลไกการทำงานของ AMPK/AICAR ผ่านปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน AMPK- α (phospho-AMPK α) โปรตีนชนิด Glucose transporter 1 (GLUT1) และระดับของพลังงานภายในเซลล์ (intracellular ATP)
- โครงการย่อยที่ 1.5 การตรวจการทำงานของ Mitochondrial permeability transition pore (MPTP)

- โครงการวิจัยย่อยที่ 1.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวสperm ซึ่งได้แก่ โปรตีน 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (α subunit) ในตัวสpermของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 และต่ำกว่าร้อยละ 50

ขั้นตอนการดำเนินงาน

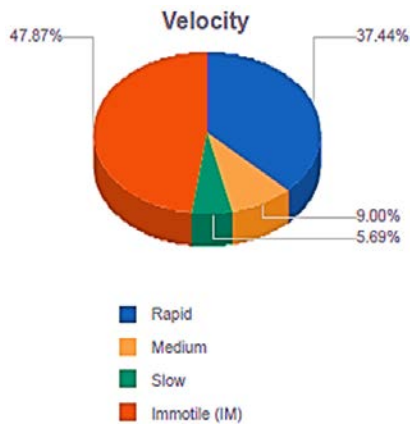
- O ทำการเก็บตัวสpermจากท่ออพิติไทมัสส่วนท้ายจากอวัยวะของแมวบ้าน ที่ได้จากการทำหมันถาวรด้วยวิธีการผ่าตัด จำนวน 41 ตัว โดยขั้นตอนโดยสังเขปประกอบด้วย
 - การเลาะเอาท่ออพิติไทมัสส่วนท้าย (ท่อนำสpermส่วนท้าย) ออกจากอวัยวะ
 - ตัดท่ออพิติไทมัสส่วนท้ายให้เป็นชิ้นย่อยๆ ในสารละลายทริส (Tris buffer)
 - ทำการเก็บรักษาสารละลายทริสซึ่งบรรจุท่ออพิติไทมัสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที
 - ทำการแยกชิ้นส่วนท่ออพิติไทมัสออกจากสารละลายทริส ซึ่งในสารละลายทริสประกอบด้วยตัวสpermที่เจริญเติบโตพร้อมปฏิสนธิ (mature sperm)
- O ทำการประเมินความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวสperm และทำการแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ตัวสpermมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 และน้อยกว่าร้อยละ 50 โดยในแต่ละกลุ่มทำการรวมตัวสpermให้ได้จำนวนเท่ากับ 20 ล้านตัว (กลุ่มตัวอย่างที่ตัวสpermมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70; n=11 และ กลุ่มตัวอย่างที่ตัวสpermมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 50; n=6)
- O ทำการสกัดโปรตีนทั้งหมดของตัวสpermด้วยชุดสกัด Mammalian Tissue Lysis/Extraction (CellLytic TM MT) (Sigma, Saint Louis, MA, USA) และปรับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนให้มีค่าเท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
- O ตรวจการแสดงออกของโปรตีน 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) ด้วยเทคนิค Western blot analysis ประกอบด้วยขั้นตอน Electrophoresis โดยทำการบรรจุตัวอย่างโปรตีนที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ลงใน Mini Protein® TGX Precast Gels (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) และทำการย้ายโปรตีนไปไว้ในแผ่นเมมเบรน (Immun-Blot® PVDF Membranes for Protein Blotting) (Bio-rad Laboratories) ด้วยขั้นตอน Blotting จากนั้นทำการตรวจการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิคือ AMPK- α (AMPK- α Rabbit Ab 2532S) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) และใช้แอนติบอดีทุติยภูมิคือ Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody 7074 (Cell Signaling Technology) ทำการตรวจความเข้มของแบนด์โปรตีนด้วยเทคนิค colorimetric จากชุดตรวจ Opti-4CN Substrate Kit (Bio-rad Laboratories) โดยทำการรายงานผลค่าความเข้มของแบนด์โปรตีน AMPK- α เทียบกับค่าความเข้มของแบนด์โปรตีนมาตรฐานที่พบได้ในตัวสpermของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

คือ α -Tubulin Antibody 2144S (Cell Signaling Technology) ซึ่งการรายงานผลดังกล่าวเรียกว่าค่า relative protein band intensity

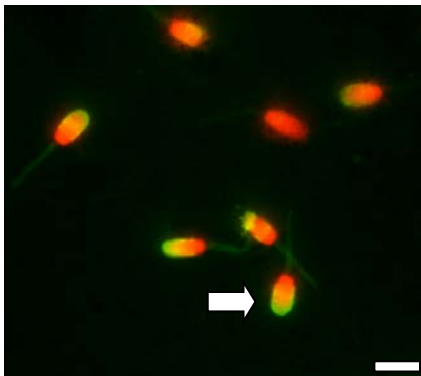
- โครงการย่อยที่ 1.2 การศึกษาผลของกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK - α ด้วยสาร 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) ที่เวลาและความเข้มข้นต่างกัน ก่อนทำการแช่แข็งตัวอสุจิ

ขั้นตอนการดำเนินงาน

- O ทำการเก็บตัวอสุจิจากท่อพิติไดมิสส่วนท้ายจากอวัยวะของแมวบ้านที่ได้จากการทำหมัน จำนวน 26 ตัว และทำการทำการรวมตัวอสุจิให้ได้จำนวนเท่ากับ 20 ล้านตัว (n=10)
- O ทำการแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสาร AICAR ความเข้มข้นขนาด 0.5 2.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ทำการตรวจคุณภาพตัวอสุจิที่เวลา 30 และ 60 นาที ภายหลังที่ได้รับสาร AICAR และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่ม การตรวจคุณภาพตัวอสุจิประกอบด้วย
 - ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา
 - ระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า
 - รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (รูปที่ 1)
 - Curve linear velocity
 - Straight linear velocity
 - Lateral head displacement
 - Average path velocity
 - ร้อยละของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ โดยการย้อมสีฟลูออเรสซิน ชนิด SYBR-14/Ethidium (Molecular Probes; Eugene, OR, USA)
 - ร้อยละของความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิ โดยการย้อมสีฟลูออเรสซิน ชนิด FIT-C/PNA และ Propidium Iodide (Sigma) (รูปที่ 2)
 - ร้อยละของความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรียที่มีค่าสูง โดยการย้อมสีฟลูออเรสซินชนิด 1H-Benzimidazolium, 5,6-dichloro-2-[3-(5,6-dichloro-1,3-diethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene)-1-propenyl]-1,3-diethyl-, iodide, (E) หรือ JC1 Dye (Sigma)



รูปที่ 1 แสดงการรายงานผลของการตรวจรูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆ โดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2 แสดงความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิ โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ชนิด FIT-C/PNA และ Propidium Iodide โดยตัวอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของอะโครโซมจะติดสีเขียวที่บริเวณครึ่งบนของส่วนหัวของตัวอสุจิ (ลูกศร) (Bar = 10 ไมโครเมตร)

- โครงการย่อยที่ 1.3 การศึกษาผลของสาร AICAR ต่อคุณภาพของตัวอสุจิแช่แข็ง ภายหลังการละลาย รวมทั้งความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

- O ทำการเก็บตัวอสุจิจากท่ออสุจิได้มีส่วส่วนท้ายจากอณฑะของแมวบ้านที่ได้จากการทำหมัน จำนวน 30 ตัว และทำการทำการรวมตัวอสุจิให้ได้จำนวนเท่ากับ 20 ล้านตัว (n=10)
- O แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง จากการอ้างอิงจากผลการทดลองของโครงการย่อยที่ 1.2 โดยทำการเลือกจากขนาดของ AICAR ที่เหมาะสมที่ไม่ทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่ได้รับสาร AICAR ขนาด 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นแช่แข็งตัวอสุจิในสารอาหารเลี้ยงตัวอสุจิชนิด Egg yolk Tris ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำการละลายตัวอสุจิแช่แข็งและตรวจคุณภาพตัวอสุจิ (ดังในโครงการย่อยที่ 1.2) ที่เวลา 0 ชั่วโมงภายหลังการละลาย

- O การทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายทำภายหลังจากการละลายตัวอสุจิแช่แข็งที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้
- ทำการเก็บรังไข่แมวบ่านที่ได้รับการทำหมันถาวรด้วยวิธีการผ่าตัด จากแมวจำนวน 49 ตัว จากนั้นหั่นรังไข่เป็นชิ้นเล็กๆ ในน้ำยา chopping medium (ประกอบด้วยสารละลาย Minimum essential medium eagle (MEM; Sigma) Bovine serum albumin (BSA; Sigma) และยาปฏิชีวนะชนิด Penicillin-Streptomycin (Sigma) และคัดเลือกเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์เกรด 1 และ 2 (มีจำนวนคิวมูลัสเซลล์ (cumulus cell) มากกว่า 1-2 ชั้นและมีไซโตพลาซึม (cytoplasm) สีดำ) จำนวนกลุ่มการทดลองละ 8-10 ใบ โดยได้ใช้จำนวนโอโอไซต์ทั้งสิ้น 513 ใบต่อการทดลองทั้งหมด ย้ายโอโอไซต์ลงในน้ำยา *in vitro* maturation (IVM medium) ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนน้ำยา chopping medium แต่ทำการเติมฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง (Follicle stimulating hormone; FSH, Sigma) ฮอรัโมนเอสตราไดออล (Estradiol; Sigma) และ โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ชนิด IGF (Sigma) เก็บรักษาโอโอไซต์ที่ควบคุมระดับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - คัดแยกโอโอไซต์ที่เกิดการเสื่อมสลายออก ย้ายโอโอไซต์ลงในน้ำยา *in vitro* fertilization (IVF medium) ซึ่งน้ำยาสําเร็จรูปที่ใช้ในการผลิตตัวอ่อนในมนุษย์ จากนั้นทำการละลายตัวอสุจิแช่แข็ง ที่แบ่งกลุ่มต่างๆ นำไปผ่านการคัดเลือกว่าตัวอสุจิที่แข็งแรงด้วยวิธีการ swim up เป็นเวลา 30 นาที ปลอ่ยตัวอสุจิที่จำนวน 5×10^5 ตัวลงในแต่ละกลุ่มของโอโอไซต์ ทำการประเมินร้อยละของการพัฒนาของโอโอไซต์เป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (รูปที่ 3) ที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง (ภายหลังจากการปลอ่ยตัวอสุจิ) เทียบกับจำนวนโอโอไซต์ทั้งหมดจากการทำ *in vitro* maturation



รูปที่ 3 แสดงการพัฒนาของโอโอไซต์เป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ภายหลังกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (Bar = 50 ไมโครเมตร)

- โครงการย่อยที่ 1.4 การศึกษากลไกการทำงานของ AMPK/AICAR ผ่านปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันของโปรตีน AMPK- α (phospho-AMPK α) โปรตีนชนิด Glucose transporter 1 (GLUT1) และระดับของพลังงานภายในเซลล์ (intracellular ATP)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

- O ทำการเก็บตัวอย่างสุจิจากท่ออีพิดิไทม์มีส่วนทำยจากอวัยวะของเมวบ้านที่ได้จากการทำหมัน จำนวน 37 ตัว และทำการรวมตัวอย่างสุจิให้ได้จำนวนเท่ากับ 20 ล้านตัว โดยแบ่งเป็น การศึกษาโปรตีน phospho-AMPK α n=6; โปรตีนชนิด GLUT1 n = 11 และระดับของพลังงานภายในเซลล์ n = 11
- O แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง จากการอ้างอิงจากผลการทดลองของโครงการย่อยที่ 1.2 โดยทำการเลือกจากขนาดของ AICAR ที่เหมาะสมที่ไม่ทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์สุจิเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่ได้รับสาร AICAR ความเข้มข้นขนาด 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที โดยทำการตรวจการแสดงออกของโปรตีน phospho-AMPK α และโปรตีนชนิด GLUT1 ก่อนกระบวนการแช่แข็ง และการตรวจวัดค่าระดับของพลังงานภายในเซลล์ ภายหลังกระบวนการแช่แข็งตัวอย่างสุจิ
- O สกัดแยกโปรตีนและตรวจการแสดงออกของโปรตีน phospho-AMPK α (Thr172) และ GLUT1 ด้วยวิธี Western blot analysis ดังที่ได้แสดงในโครงการย่อยที่ 1.1 โดยใช้แอนติบอดีปฐภูมิ ได้แก่ phospho-AMPK α (Thr172) (D79.5E) Rabbit mAb 4188 และ GLUT1 (D3J3A) Rabbit Antibody (Cell Signaling Technology) การรายงานผลค่า relative protein band intensity โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแบนด์โปรตีน phospho-AMPK α และ GLUT1 กับค่าความเข้มของแบนด์โปรตีน α -Tubulin Antibody 2144S (Cell Signaling Technology)
- O ทำการตรวจวัดค่าระดับของพลังงานภายในเซลล์ โดยกระบวนการ High performance liquid chromatography (HPLC) ทำการตรวจวัดค่าสูงสุดของระดับพลังงานภายในเซลล์ที่การดูดกลืนของแสงในระดับความยาวแสงเท่ากับ 254 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับค่าพลังงานมาตรฐาน โดยมีค่า $r^2 = 0.90$

- โครงการย่อยที่ 1.5 การตรวจการทำงานของ Mitochondrial permeability transition pore (MPTP)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

- O ทำการเก็บตัวอย่างสุจิจากท่ออีพิดิไทม์มีส่วนทำยจากอวัยวะของเมวบ้านที่ได้จากการทำหมัน จำนวน 14 ตัว และทำการทำการรวมตัวอย่างสุจิให้ได้จำนวนเท่ากับ 20 ล้านตัว (n=6)
- O ทำการตรวจการทำงานของ MPTP โดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป ได้แก่ Mitochondrial permeability transition pore assay kit (BioVision, Cambridge, UK) ด้วยกระบวนการ Flow cytometry (ความยาวคลื่นแสง 488 นาโนเมตร)

หมายเหตุ

- O เนื่องจากผลการทดลองที่ได้จากการตรวจการทำงานของ MPTP ด้วยวิธี Flow cytometry ให้ค่าผลบวกสูง (false positive) ในระดับสูง อันเนื่องมาจากการอ่านค่า MPTP ของเซลล์อื่นๆ ที่ปน (contaminate) มาในกระบวนการเก็บตัวอสุจิจากอภิติไดมัส อีกทั้งผู้วิจัยหลักไม่สามารถปั่นแยกตัวแยกตัวอสุจิให้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 100 ได้ จึงทำให้การแปลผลค่าการทำงานของ MPTP มีระดับสูงกว่าปกติ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเห็นสมควรไม่นำผลการทดลองที่ได้จากการตรวจการทำงานของ MPTP ไปใช้จริงในทางปฏิบัติ

- โครงการย่อยที่ 2 การนำองค์ความรู้ไปใช้จริงทางปฏิบัติ

ขั้นตอนการดำเนินงาน

- O การนำองค์ความรู้พื้นฐานจากสัตว์ทดลองต้นแบบไปใช้จริงทางปฏิบัติ ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการเพาะขยายพันธุ์เสีอลายเมฆ ภายใต้การดูแลขององค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ประเทศไทย
- O ทำการเก็บตัวอสุจิจากเสีอลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*) จำนวน 7 ตัว โดยเสีอลายเมฆกลุ่มดังกล่าว ได้รับคัดเลือกเพื่อเข้าร่วมโครงการเพาะขยายพันธุ์เสีอลายเมฆ ประจำปี 2560-2561 โดยตัวอสุจิที่นำมาทำการทดลองนี้ เป็นตัวอสุจิที่เหลือจากการนำไปใช้เพื่อการผสมเทียมเสีอลายเมฆเพศเมีย (จำนวน 5 ล้านตัว/เสีอลายเมฆ)
วิธีการเก็บตัวอสุจิ ทำโดยวิธีการกระตุ้นต่อมลูกหมากของเสีอลายเมฆเพศผู้ที่อยู่ภายใต้การวางยาสลบ ซึ่งการกระตุ้นต่อมลูกหมากนั้นทำได้ด้วยการปล่อยกระแสไฟฟ้า (electroejaculation) ที่ระดับความแรง 2-5 โวลต์ (รูปที่ 4)

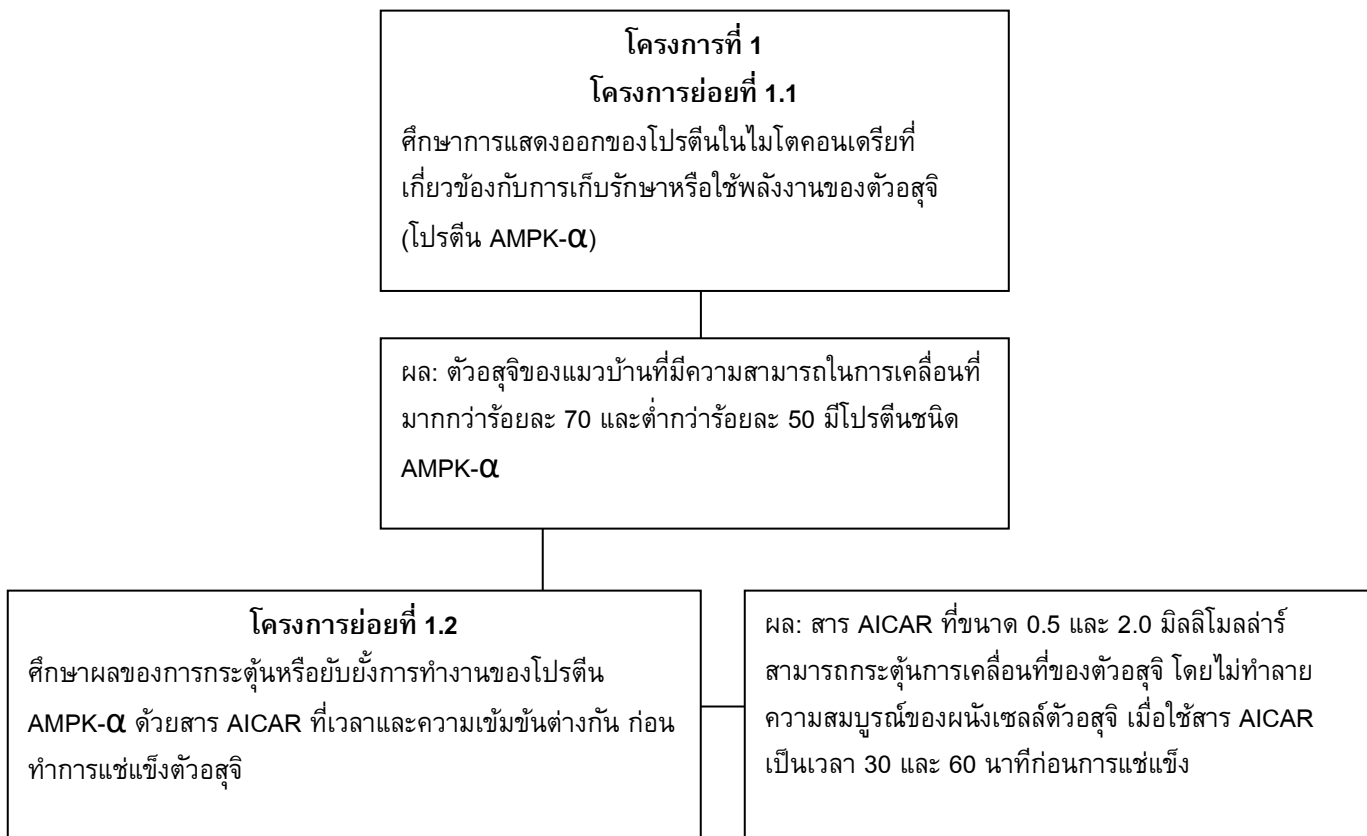


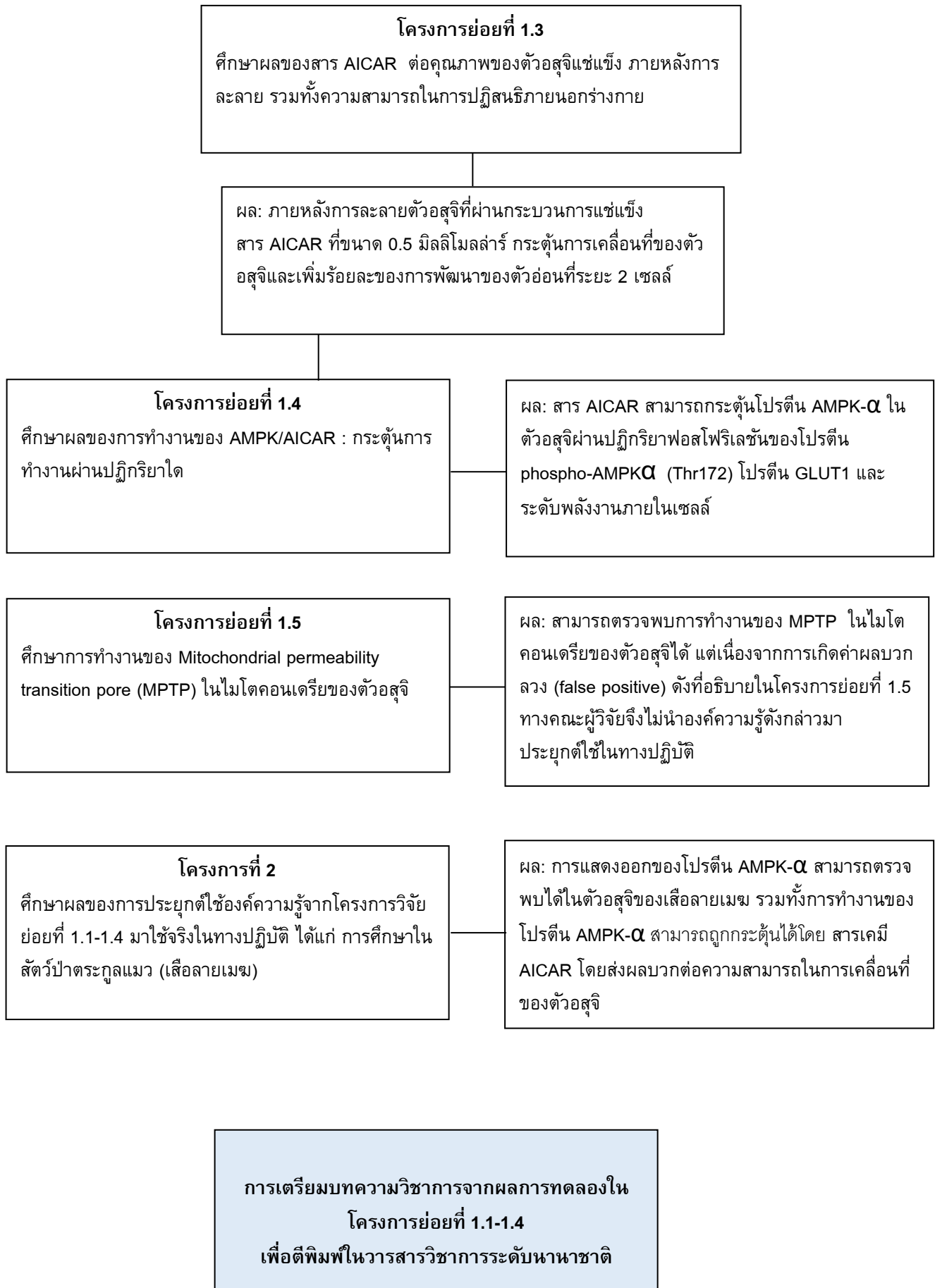
รูปที่ 4 แสดงอุปกรณ์ชนิด Electroejaculator ใช้เพื่อสำหรับการเก็บตัวอสุจิจากเสีอลายเมฆ

- O ทำการตรวจการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ด้วยวิธี Western blot analysis (รายละเอียดแสดงในโครงการย่อยที่ 1.1) (n = 2)
- O ทำการศึกษาผลของกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสารเคมีชนิด AICAR ในตัวอสุจิของเสือลายเมฆจำนวน 5 ตัว (n = 5) โดยทำการแบ่งตัวอสุจิเป็น 3 กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นการทำงานของ AMPK- α ด้วยสาร AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนกระบวนการแช่แข็ง โดยการประเมินคุณภาพของตัวอสุจิประกอบด้วย
 - ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา
 - ระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า
 - ร้อยละของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ชนิด SYBR-14/Ethidium
 - ร้อยละของความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิ โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ชนิด FIT-C/PNA และ Propidium Iodide

หมายเหตุ แผนผังสรุปแผนการดำเนินงานแบ่งตามโครงการวิจัยย่อยได้แสดงตามแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 แสดงแผนผังสรุปการดำเนินงานวิจัยตามวัตถุประสงค์ย่อยในรอบ 24 เดือน





- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

O การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ใช้โปรแกรม SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, version 9) จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของข้อมูล (normal distribution of residuals) โดยใช้ UNIVARIATE procedure (option NORMAL) การวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดข้อมูลได้แก่ ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ ร้อยละของความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ ร้อยละของความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิ ร้อยละของความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรียที่มีค่าสูงและผลของค่า relative protein band intensity ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Paired t-test เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวแบบปกติ และ Wilcoxon signed rank test เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวแบบผิดปกติ การวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า ใช้การวิเคราะห์ด้วย NPAR1WAY procedure และ Kruskal-Wallis test ในส่วนของการวิเคราะห์ร้อยละของอัตราการเจริญของตัวอ่อนในระยะ 2 เซลล์ ใช้การวิเคราะห์ด้วยค่า binomial score (1 หรือ 0) (ปรากฏหรือไม่ปรากฏตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์) ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมีค่าที่ $P \leq 0.05$

3. ผลการทดลอง

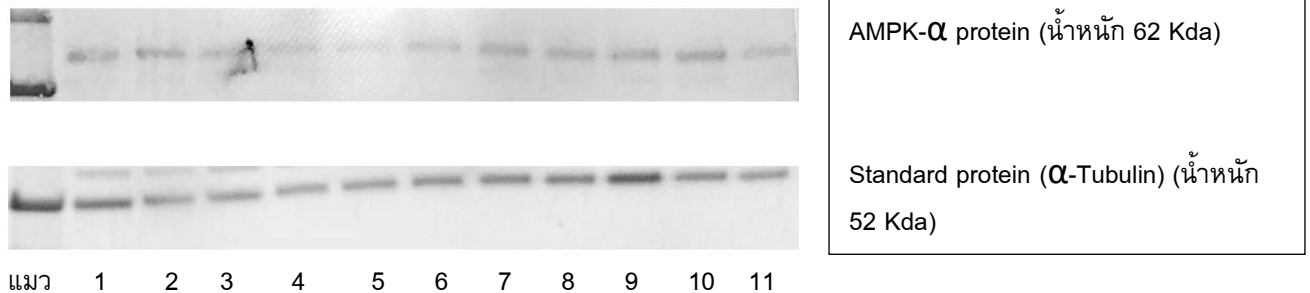
3.1 โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาในสัตว์ต้นแบบ

- โครงการวิจัยย่อยที่ 1.1 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาหรือใช้พลังงานของตัวอสุจิ ซึ่งได้แก่ โปรตีน 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (α subunit) ในตัวอสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 และต่ำกว่าร้อยละ 50

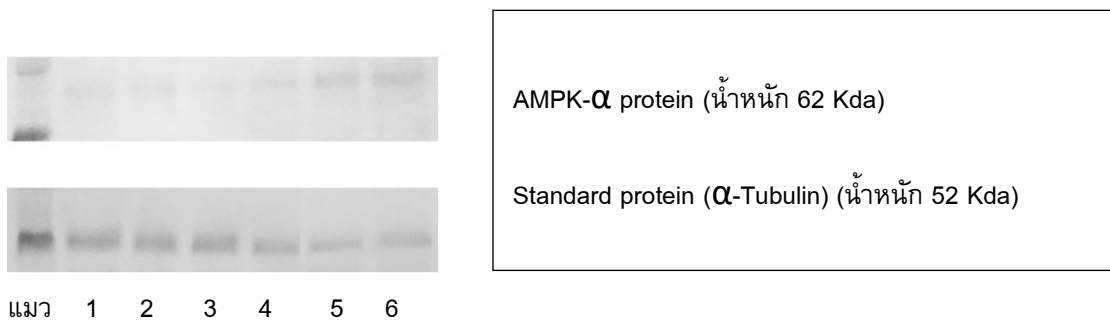
ผลการทดลอง โปรตีนชนิด AMPK- α สามารถพบได้ในตัวอสุจิของแมวบ้านทั้งที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 และต่ำกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 5) โดยมีค่า relative protein band intensity ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α บ่งชี้ให้เห็นว่า ตัวอสุจิของแมวบ้านมีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการเก็บรักษาและใช้พลังงานภายในเซลล์

รูปที่ 5 การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ที่แยกสกัดได้จากตัวสุจิของแมวบ้านด้วยวิธี Western blot analysis

- ตัวสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70



- ตัวสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 50



ตารางที่ 1 ค่า relative protein band intensity ของโปรตีน AMPK- α ที่แยกสกัดได้จากตัวสุจิของแมวบ้านด้วยวิธี Western blot analysis (Mean $\pm$ SD)

Relative protein band intensity quantification	
ตัวสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70	ตัวสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 50
0.35 $\pm$ 0.13 ^A	0.27 $\pm$ 0.09 ^B

หมายเหตุ ความแตกต่างของตัวอักษรบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

- โครงการย่อยที่ 1.2 การศึกษาผลของกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสาร 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) ที่เวลาและความเข้มข้นต่างกัน ก่อนทำการแช่แข็งตัวอสุจิ

ผลการทดลอง เมื่อใช้ AICAR เป็นเวลา 30 และ 60 นาทีก่อนการแช่แข็งที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลลาร์ สามารถกระตุ้นการทำงานของตัวอสุจิ ดังต่อไปนี้

- ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา (subjective motility)
- ระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า (progressive motility)
- รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (motility pattern by SCA program analysis)
 - curve linear velocity
 - straight linear velocity
- ร้อยละของความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรียที่มีค่าสูง (mitochondrial membrane potential)

โดยไม่ทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิ (membrane integrity) ค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) และไม่กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมรีแอคชัน (acrosome reaction)

ตารางที่ 2 ผลของการใช้สาร AICAR ที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 2.0 และ 5.0 มิลลิโมลลาร์ (กลุ่มทดลองที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ) ต่อคุณภาพตัวอสุจิของแมวบ้านเป็นเวลา 30 และ 60 นาทีก่อนทำการแช่แข็งตัวอสุจิ (Mean $\pm$ SD)

คุณภาพของตัวอสุจิ	เวลา	ตัวอสุจิที่ไม่ผ่าน กระบวนการแช่เย็น	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองที่ 1	กลุ่มทดลองที่ 2	กลุ่มทดลองที่ 3
Subjective motility (%)	30 นาที	74.0 $\pm$ 5.4 ^A	68.0 $\pm$ 4.5 ^{A,B}	71.0 $\pm$ 4.2 ^{A,B}	68.0 $\pm$ 4.5 ^{A,B,a}	63.0 $\pm$ 5.0 ^{B,a}
	60 นาที		67.0 $\pm$ 9.7 ^A	65.0 $\pm$ 7.1 ^B	57.0 $\pm$ 8.3 ^{B,b}	46.0 $\pm$ 5.5 ^{C,b}
Progressive motility (score 0-5)	30 นาที	3.8 $\pm$ 0.4 ^A	3.9 $\pm$ 0.2 ^A	3.8 $\pm$ 0.3 ^A	3.6 $\pm$ 0.5 ^{A,a}	3.4 $\pm$ 0.5 ^{A,a}
	60 นาที		3.5 $\pm$ 0.4 ^A	3.5 $\pm$ 0.4 ^A	2.9 $\pm$ 0.2 ^{B,b}	3.0 $\pm$ 0.3 ^{B,b}
Membrane integrity (%)	30 นาที	72.2 $\pm$ 3.9 ^A	66.5 $\pm$ 1.9 ^A	66.4 $\pm$ 4.7 ^A	64.5 $\pm$ 1.8 ^A	56.8 $\pm$ 9.0 ^B
	60 นาที		60.3 $\pm$ 2.3 ^B	60.1 $\pm$ 6.2 ^B	59.5 $\pm$ 3.7 ^B	52.9 $\pm$ 2.9 ^C

Acrosome integrity (%)	30 นาที	66.4 ± 7.2 ^A	54.0 ± 4.6 ^{A,B}	55.6 ± 2.6 ^{A,B}	50.6 ± 6.3 ^B	46.6 ± 7.2 ^B
	60 นาที		55.7 ± 2.2 ^{A,B}	50.5 ± 4.6 ^B	51.1 ± 4.1 ^B	41.0 ± 4.8 ^C
Acrosome reaction (%)	30 นาที	24.2 ± 5.2 ^A	32.4 ± 3.8 ^{A,B}	38.3 ± 5.1 ^B	36.7 ± 6.6 ^B	45.4 ± 6.2 ^C
	60 นาที		38.2 ± 3.7 ^B	40.2 ± 3.9 ^B	37.9 ± 3.1 ^B	45.6 ± 6.2 ^B
Mitochondrial membrane potential (%)	30 นาที	67.6 ± 3.9 ^A	62.8 ± 2.6 ^{A,a}	63.4 ± 4.5 ^{A,a}	55.2 ± 4.1 ^{B,a}	51.6 ± 4.4 ^{B,a}
	60 นาที		54.1 ± 2.7 ^{B,b}	55.8 ± 4.0 ^{B,b}	53.5 ± 4.5 ^{B,a}	47.3 ± 4.5 ^{C,b}

รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวสุมิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (Sperm motility patterns; SCA program analysis)

VCL (μm/s)	30 นาที	69.3 ± 5.5 ^A	68.1 ± 13.3 ^{A,a}	70.9 ± 10.7 ^A	66.5 ± 9.4 ^{A,a}	57.3 ± 17.1 ^{B,a}
	60 นาที		60.3 ± 2.9 ^{B,b}	71.5 ± 2.1 ^A	58.1 ± 0.7 ^{B,b}	49.5 ± 2.3 ^{C,b}
VAP (μm/s)	30 นาที	36.1 ± 5.1 ^A	39.1 ± 6.5 ^{A,a}	40.2 ± 6.1 ^{A,a}	34.3 ± 3.4 ^{A,a}	32.5 ± 6.7 ^{A,a}
	60 นาที		35.9 ± 1.1 ^{A,a}	34.8 ± 2.8 ^{A,b}	33.9 ± 1.6 ^{A,a}	25.2 ± 4.5 ^{B,b}
VSL (μm/s)	30 นาที	48.3 ± 2.6 ^A	46.3 ± 3.7 ^A	47.3 ± 4.0 ^A	44.8 ± 2.6 ^{A,a}	41.2 ± 1.1 ^{B,a}
	60 นาที		44.9 ± 3.4 ^A	48.1 ± 2.2 ^A	38.8 ± 3.1 ^{B,b}	35.4 ± 3.7 ^{B,b}
ALH (μm)	30 นาที	2.3 ± 0.9 ^A	2.5 ± 0.7 ^A	2.7 ± 0.7 ^A	2.8 ± 0.6 ^A	3.1 ± 0.7 ^B
	60 นาที		3.3 ± 0.4 ^B	3.3 ± 0.7 ^B	2.9 ± 0.5 ^A	3.3 ± 0.5 ^B

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่บ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถวตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ ($P \leq 0.05$)

- โครงการย่อยที่ 1.3 การศึกษาผลของสาร AICAR ต่อคุณภาพของตัวสุมิแช่แข็ง ภายหลังการละลาย รวมทั้งความสามารถในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ผลการทดลอง ภายหลังการทำละลายตัวสุมิที่ได้รับสาร AICAR ขนาดความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาทีก่อนการแช่แข็งที่ พบว่า สาร AICAR ขนาด 0.5 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นการทำงานของตัวสุมิ ดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3)

➤ ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา (subjective motility)

- ระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า (progressive motility)
- รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (motility pattern by SCA program analysis)
 - curve linear velocity
 - straight linear velocity

รวมทั้งกระตุ้นร้อยละของการพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะ 2 เซลล์ เมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุมและตัวอย่างที่ได้รับสาร AICAR ขนาด 2.0 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ผลของการใช้สาร AICAR ที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 2.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ (กลุ่มทดลองที่ 1 2 และ 3) ต่อคุณภาพตัวอสุจิของแมวบ้านเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ภายหลังการแช่แข็งตัวอสุจิ (Mean $\pm$ SD)

คุณภาพของตัวอสุจิ	เวลา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองที่ 1	กลุ่มทดลองที่ 2	กลุ่มทดลองที่ 3
Subjective motility (%)	30 นาที	59.3 $\pm$ 2.1 ^A	65.6 $\pm$ 3.2 ^{A,a}	60.2 $\pm$ 3.9 ^{A,B,a}	50.3 $\pm$ 2.4 ^{C,a}
	60 นาที	56.5 $\pm$ 4.2 ^A	59.7 $\pm$ 2.9 ^{B,b}	50.1 $\pm$ 4.5 ^{B,b}	40.7 $\pm$ 4.9 ^{C,b}
Progressive motility (score 0-5)	30 นาที	3.1 $\pm$ 0.3 ^{A,B}	3.2 $\pm$ 0.2 ^A	3.2 $\pm$ 0.1 ^{A,a}	2.8 $\pm$ 0.3 ^{B,a}
	60 นาที	3.0 $\pm$ 0.2 ^A	3.1 $\pm$ 0.1 ^A	2.5 $\pm$ 0.3 ^{B,b}	2.4 $\pm$ 0.2 ^{B,b}
Membrane integrity (%)	30 นาที	57.7 $\pm$ 3.3 ^{A,a}	59.1 $\pm$ 5.4 ^{A,a}	56.6 $\pm$ 2.9 ^{A,a}	49.4 $\pm$ 5.6 ^B
	60 นาที	52.5 $\pm$ 2.8 ^{A,b}	50.2 $\pm$ 3.2 ^{A,b}	50.2 $\pm$ 1.7 ^{A,b}	44.3 $\pm$ 4.3 ^B
Acrosome integrity (%)	30 นาที	46.4 $\pm$ 3.1 ^{A,B}	49.5 $\pm$ 4.4 ^B	43.7 $\pm$ 5.6 ^{A,C}	40.1 $\pm$ 3.8 ^C
	60 นาที	43.1 $\pm$ 5.2 ^A	43.2 $\pm$ 2.9 ^{A,B}	42.9 $\pm$ 4.9 ^A	37.8 $\pm$ 1.5 ^B
Acrosome reaction (%)	30 นาที	37.5 $\pm$ 4.4 ^{A,a}	41.2 $\pm$ 4.9 ^{A,B,a}	39.6 $\pm$ 5.8 ^A	45.3 $\pm$ 1.5 ^B
	60 นาที	45.8 $\pm$ 3.7 ^{A,b}	47.3 $\pm$ 5.6 ^{A,b}	40.4 $\pm$ 2.3 ^B	49.9 $\pm$ 4.7 ^A
Mitochondrial membrane potential (%)	30 นาที	53.7 $\pm$ 3.7 ^A	55.8 $\pm$ 5.3 ^A	50.1 $\pm$ 3.9 ^A	44.1 $\pm$ 4.2 ^B
	60 นาที	49.8 $\pm$ 2.2 ^A	51.1 $\pm$ 4.6 ^B	49.5 $\pm$ 4.8 ^A	41.3 $\pm$ 5.1 ^B

รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (Sperm motility patterns; SCA program analysis)

VCL (μ m/s)	30 นาที	58.2 $\pm$ 2.2 ^A	65.7 $\pm$ 4.4 ^B	61.3 $\pm$ 9.1 ^{A,B}	48.7 $\pm$ 11.2 ^B
------------------	---------	-----------------------------	-----------------------------	-------------------------------	------------------------------

	60 นาที	57.4 ± 4.9 ^B	64.3 ± 5.1 ^B	54.4 ± 8.3 ^A	44.1 ± 6.6 ^C
VAP (µm/s)	30 นาที	30.7 ± 7.8 ^{A,B}	32.9 ± 6.2 ^A	29.6 ± 4.1 ^{A,B}	27.5 ± 3.8 ^B
	60 นาที	31.1 ± 5.8 ^A	29.2 ± 4.5 ^A	28.4 ± 6.7 ^A	22.6 ± 5.9 ^B
VSL (µm/s)	30 นาที	38.2 ± 2.2 ^A	43.9 ± 2.1 ^B	39.3 ± 3.6 ^{A,B}	34.8 ± 5.7 ^B
	60 นาที	39.1 ± 3.8 ^A	42.9 ± 3.4 ^A	34.7 ± 4.4 ^B	30.8 ± 6.9 ^B
ALH (µm)	30 นาที	2.6 ± 0.3 ^{A,a}	2.7 ± 0.9 ^A	3.1 ± 0.7 ^A	3.3 ± 0.4 ^A
	60 นาที	3.5 ± 0.6 ^{A,b}	3.0 ± 0.8 ^A	3.0 ± 0.3 ^A	3.7 ± 0.6 ^A

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่บ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถวตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลของการใช้สาร AICAR ที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ (กลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2) ต่อร้อยละของการพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะ 2 เซลล์ ภายหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยใช้ตัวสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลาย (Mean ± SD)

คุณภาพของตัวสุจิ	เวลา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองที่ 1	กลุ่มทดลองที่ 2
การพัฒนาของตัวอ่อนที่ระยะ 2 เซลล์ (%)	30 นาที	61.1 ± 3.1 ^A	68.6 ± 2.2 ^B	60.3 ± 4.4 ^A
	60 นาที	58.3 ± 4.2 ^A	67.4 ± 3.2 ^B	58.4 ± 3.7 ^A

หมายเหตุ ความแตกต่างของตัวอักษรบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

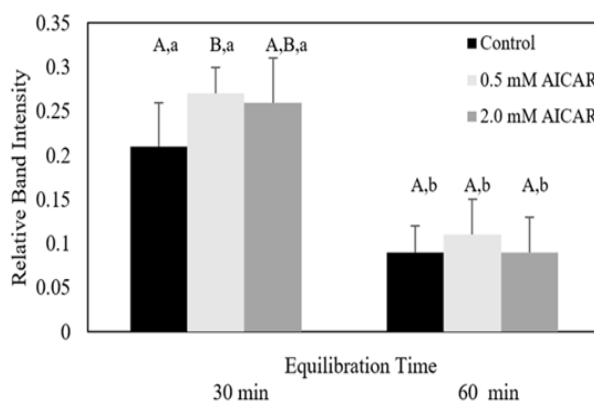
- โครงการย่อยที่ 1.4 การศึกษากลไกการทำงานของ AMPK/AICAR ผ่านปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันของโปรตีน AMPK ชนิดแอลฟา (phospho-AMPK α) โปรตีนชนิด Glucose transporter 1 (GLUT1) และระดับของพลังงานภายในเซลล์ (intracellular ATP)

ผลการทดลอง

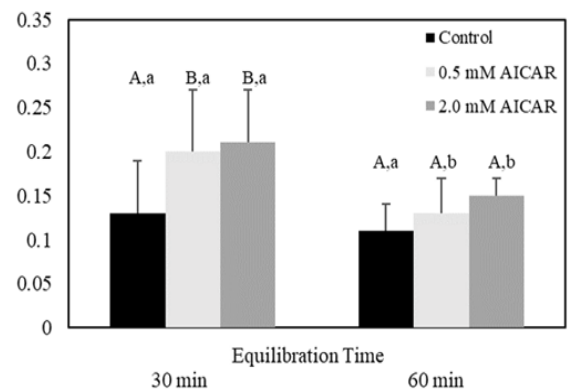
O การใช้สาร AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ในตัวสุจิ ผ่านปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน (phospho-AMPK α (Thr172)) อย่างไรก็ตามการใช้สาร AICAR เป็นเวลา 60 นาที จะชะลอการทำงานของปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน (phospho-AMPK α (Thr172)) (รูปที่ 6A)

- การใช้สาร AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน GLUT1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานของเซลล์ (cell metabolism) เมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการทำงานของโปรตีน GLUT 1 ในตัวอสุจิที่ได้รับสาร AICAR เป็นเวลา 60 นาที มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6B)
- ระดับของพลังงานภายในเซลล์อสุจิมีค่าเพิ่มสูงสุดเมื่อตัวอสุจิได้รับการกระตุ้นด้วยสาร AICAR เป็นเวลา 30 นาทีก่อนกระบวนการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามภายหลังการละลายตัวอสุจิ ระดับของพลังงานภายในเซลล์อสุจิในกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 ในทั้ง 2 ช่วงเวลา (ตารางที่ 5)

รูปที่ 6 แสดงค่า relative protein band intensity ของโปรตีน phospho-AMPK α (Thr172) (6A) และ GLUT1 (6B) ในตัวอสุจิที่ได้รับการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK- α ด้วยสาร AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที (Mean $\pm$ SD)



รูป 6A



รูป 6B

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่บ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละกลุ่มการทดลอง ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละช่วงเวลา ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 5 ค่าระดับของพลังงานภายในเซลล์อสุจิได้รับการกระตุ้นด้วยสาร AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 30 และ 60 นาทีก่อนกระบวนการแช่แข็งและภายหลังการละลาย (Mean $\pm$ SD)

ค่าระดับของพลังงานภายในเซลล์อสุจิ (ไมโครกรัม/ตัวอสุจิ 1 ล้านตัว)			
เวลา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองที่ 1	กลุ่มทดลองที่ 2
ก่อนการแช่แข็ง			
30 นาที	0.09 $\pm$ 0.02 ^A	0.18 $\pm$ 0.03 ^B	0.17 $\pm$ 0.05 ^B
60 นาที	0.08 $\pm$ 0.03 ^A	0.15 $\pm$ 0.04 ^B	0.11 $\pm$ 0.03 ^{A,B}
ภายหลังการแช่แข็ง			
30 นาที	0.05 $\pm$ 0.009 ^A	0.11 $\pm$ 0.03 ^B	0.09 $\pm$ 0.02 ^B
60 นาที	0.04 $\pm$ 0.01 ^A	0.07 $\pm$ 0.03 ^A	0.08 $\pm$ 0.04 ^A

หมายเหตุ ความแตกต่างของตัวอักษรบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

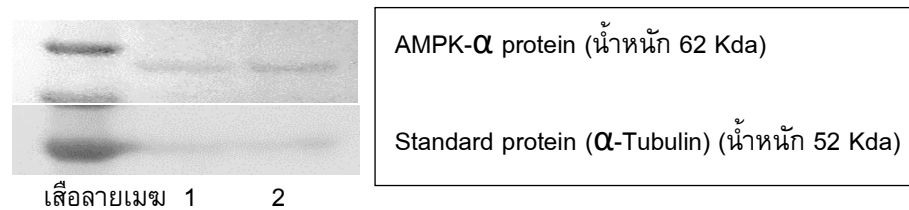
3.2 โครงการย่อยที่ 2 การนำองค์ความรู้ไปใช้จริงทางปฏิบัติ

ผลการทดลอง

- O โปรตีนชนิด AMPK- α สามารถพบได้ในตัวอสุจิของเสีอลายเมฆ (กลุ่มประชากร เท่ากับ 2 ตัว) เช่นเดียวกับที่สามารถตรวจพบได้ในตัวอสุจิของแมวบ้าน โดยมีค่า relative protein band intensity ของโปรตีน AMPK- α เท่ากับ 1.03 และ 1.15 ตามลำดับ (รูปที่ 7)
- O เมื่อใช้ AICAR ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการแช่แข็งตัวอสุจิ สามารถกระตุ้นการทำงานของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งและการละลาย ดังต่อไปนี้
 - ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา (subjective motility)
 - ระดับของความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า (progressive motility)

โดยไม่ทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิ (membrane integrity) และ
ค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) (ตารางที่ 6)

รูปที่ 7 แสดงการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิของเสีอลายเมฆ



ตารางที่ 6 ผลของการใช้สาร AICAR ที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ (กลุ่มทดลองที่ 1 และ 2) ต่อคุณภาพตัวอสุจิของเสีอลายเมฆเป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการแช่แข็งตัวอสุจิ (Mean $\pm$ SD)

คุณภาพของตัวอสุจิ	เวลา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดลองที่ 1	กลุ่มทดลองที่ 2
Subjective motility (%)	ก่อนการแช่แข็ง	60.3 $\pm$ 7.1 ^{A,a}	65.9 $\pm$ 4.2 ^{A,a}	61.4 $\pm$ 2.3 ^{A,a}
	หลังการละลาย	40.5 $\pm$ 5.4 ^{A,b}	49.2 $\pm$ 2.9 ^{B,b}	44.5 $\pm$ 5.3 ^{A,B,b}
Progressive motility (score 0-5)	ก่อนการแช่แข็ง	2.9 $\pm$ 0.2 ^{A,a}	3.2 $\pm$ 0.2 ^{A,a}	3.0 $\pm$ 0.2 ^{A,a}
	หลังการละลาย	2.1 $\pm$ 0.1 ^{A,b}	2.6 $\pm$ 0.1 ^{B,b}	2.5 $\pm$ 0.2 ^{A,B,b}
Membrane integrity (%)	ก่อนการแช่แข็ง	65.4 $\pm$ 4.6 ^{A,a}	67.9 $\pm$ 2.4 ^{A,a}	66.6 $\pm$ 4.9 ^{A,a}
	หลังการละลาย	50.7 $\pm$ 3.1 ^{A,b}	51.2 $\pm$ 4.2 ^{A,b}	48.2 $\pm$ 3.7 ^{A,b}
Acrosome integrity (%)	ก่อนการแช่แข็ง	50.4 $\pm$ 7.1 ^{A,a}	53.5 $\pm$ 4.3 ^{A,a}	49.2 $\pm$ 3.6 ^{A,a}
	หลังการละลาย	40.8 $\pm$ 2.5 ^{A,b}	46.2 $\pm$ 2.9 ^{B,b}	40.1 $\pm$ 3.9 ^{A,b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่บ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละแถวตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กบ่งบอกถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ ($P \leq 0.05$)

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาและรายงานผลครั้งแรก (first report) ถึงการแสดงออกและการทำงานของโปรตีน ได้แก่ โปรตีน AMPK- α บริเวณไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิในสัตว์ตระกูลแมว (แมวบ้าน และสัตว์ป่าตระกูลแมว ได้แก่ เสีอลายเมฆ) ซึ่งโปรตีนชนิดดังกล่าวสามารถถูกกระตุ้นได้โดยสารเคมีชนิดต่างๆ เช่น AICAR ในขนาดความเข้มข้นและเวลาที่

เหมาะสม (การใช้ สารเคมีชนิด AICAR ขนาดความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 30 นาที) โดยการทำงานของ AMPK- α /AICAR มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ผ่านกระบวนการฟอสโฟริเลชัน phospho-AMPK α (Thr172) การทำงานของโปรตีน GLUT1 และการเพิ่มระดับพลังงานภายในเซลล์ (intracellular ATP) ซึ่งส่งผลบวกต่อคุณภาพตัวอสุจิ (เช่น ร้อยละความสามารถในการเคลื่อนที่ทั้งหมดโดยการประเมินจากตา ระดับความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปข้างหน้า รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์) ความสามารถในการผลิตตัวอ่อน (ภายหลังการปฏิสนธิภายนอกกร่างกาย) โดยไม่ส่งผลกระทบด้านลบต่อร้อยละของการมีชีวิตของตัวอสุจิ ทั้งก่อนและภายหลังกระบวนการแช่แข็งตัวอสุจิ

จากผลการทดลองโดยสังเขป พบว่า

- การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่าร้อยละ 70 มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่มีความเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยปกติโปรตีน AMPK ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลัก คือ α γ และ β subunit โปรตีน AMPK สามารถตรวจพบได้ทั้งเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ โดยในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยตัวอสุจิของมนุษย์และสัตว์ชนิดต่างๆ (หมู ไก่) จะมีการแสดงออกของโปรตีน AMPK- α เต็มขีดที่สูงสุด (Hurtado de Llere และคณะ 2012; Calle-Guisado และคณะ 2017; Nguyen และคณะ 2015) นอกจากนี้ ได้มีรายงานการศึกษาในมนุษย์ว่า เมื่อทำการปั่นแยกตัวอสุจิออกเป็น 2 กลุ่มประชากรได้แก่ กลุ่มที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่สูง และ กลุ่มตัวอสุจิที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำ พบว่า การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α ของกลุ่มประชากรที่มีตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูง มีค่ามากกว่า กลุ่มตัวอสุจิที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำ (Calle-Guisado และคณะ 2017) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองของคณะผู้วิจัย นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาถึงการกระจายตัว (localization) ของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิพบว่า โปรตีน AMPK- α มีการกระจายตัวบริเวณ ตัวอสุจิส่วนกลาง (ซึ่งเป็นตำแหน่งของไมโทคอนเดรีย) และ ส่วนหาง (เป็นตำแหน่งสำคัญที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ) (Nguyen และคณะ 2015; Shabani Nashtaei และคณะ 2016) จากข้อมูลดังกล่าว สามารถสันนิษฐานได้ว่า AMPK- α อาจมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์และการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ
- การทำงานของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิ สามารถกระตุ้นได้โดยการใช้สารเคมีชนิด AICAR (ที่ขนาดความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์) ผ่านกระบวนการฟอสโฟริเลชันของโปรตีน AMPK- α (phospho-AMPK α (Thr172) การทำงานของโปรตีน GLUT1 และการเพิ่มระดับพลังงานภายในเซลล์ (intracellular ATP) โดยการทำงานทั้ง 3 กระบวนการ มีค่าการทำงานสูงสุดที่ระยะเวลา 30 นาที ภายหลังการกระตุ้นด้วยสารเคมี AICAR และมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที (4 องศาเซลเซียส)

ภายใต้สภาวะที่สิ่งแวดล้อมมีอุณหภูมิต่ำ สิ่งมีชีวิตจะมีการผลิตและใช้พลังงานที่ลดลง เช่น การทำงานของเซลล์ประสาท (glia cell) ของกบจะลดการใช้พลังงานเมื่ออุณหภูมิสิ่งแวดล้อมและอุณหภูมิร่างกายลดต่ำลง (Donohoe และคณะ 2000) นอกจากนี้ การศึกษาเซลล์หลอดเลือดฝอยในสมองของมนุษย์พบว่า การแสดงออกของโปรตีน AMPK- α มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับพลังงานภายในเซลล์และการลดต่ำของอุณหภูมิ (Castro และคณะ 2017) โดยปกติเมื่อทำการลดอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีกระบวนการตอบสนองเพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด เช่น การลดการทำงานของ โซเดียม โพแทสเซียม ปั๊ม (Sodium/Potassium pump) ตรงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อลดการส่งผ่านของพลังงาน (Singer และ Bretschneider 1990) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนการผลของการวิจัยที่ตรวจพบการลดลงของการทำงานของ phospho-AMPK α (Thr172) และ ระดับพลังงานภายในเซลล์

ในส่วนของการทำงานของโปรตีน GLUT1 สามารถถูกกระตุ้นได้หลายปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามพบว่า การทำงานของโปรตีน AMPK เป็นหนึ่งในปัจจัยที่กระตุ้นการทำงานของโปรตีน GLUT1 ได้ (Bertoldo และคณะ 2015) การศึกษาในหนูแรพพบว่า โปรตีน AMPK มีส่วนในการกระตุ้นการทำงานของปฏิกิริยาการสร้างแลคเตต (lactate production) ในเซลล์ Sertoli ของหนูแรพ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลกลูโคส (glucose uptake) และการทำงานของโปรตีน GLUT1 (Galardo และคณะ 2007) สอดคล้องกับการทดลองในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดชนิด bEnd.3 ในสมองของหนูเมาส์ ซึ่งพบว่า การเพิ่มขึ้นของการทำงานของการสะสมพลังงานและการทำงานของโปรตีน GLUT1 เป็นผลมาจากการการทำงานของโปรตีน AMPK (Cura and Carruthers และคณะ 2012) เช่นเดียวกันกับการทำงานของ phospho-AMPK α (Thr172) และ ระดับพลังงานภายในเซลล์ การทำงานของโปรตีน GLUT1 มีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที (ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาในตัวอสุจิของม้าพ่อพันธุ์พบว่า การกระตุ้นการทำงานของโปรตีน AMPK โดยการใช้สารเคมีชนิด Rosiglitazone ซึ่งใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของโปรตีน phospho-AMPK α ระดับพลังงานภายในเซลล์ และการทำงานของโปรตีน GLUT1 (Swegen และคณะ 2016) บ่งบอกถึงความสัมพันธ์เชิงบวกของการทำงานของสามปฏิกิริยา ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเก็บสะสมพลังงานในตัวอสุจิของแมวบ้าน ซึ่งเป็นสัตว์ต้นแบบในการทดลองนี้

- การทำงานของโปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิ มีผลเชิงบวกต่อคุณภาพของตัวอสุจิภายหลังกระบวนการแช่แข็ง เช่น ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ และการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังกระบวนการปฏิสนธิภายนอกกร่างกาย จากผลการทดลองที่ได้ระบุมาข้างต้น การกระตุ้นการทำงานของ AMPK- α ส่งผลเชิงบวกต่อปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง

กับการใช้หรือสะสมพลังงานของเซลล์ โดยเฉพาะการทำงานของโปรตีน GLUT1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสลาย glucose หรือ glycolysis

โดยทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิประกอบด้วย 2 ทฤษฎีหลัก คือ การใช้พลังงานจากกระบวนการ glycolysis และการใช้พลังงานจากกระบวนการ oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Ruiz-Pesini และคณะ 2007) ถึงแม้ว่าในน้ำพอพันธุ์จะพบว่าปฏิกิริยา OXPHOS จะเป็นแหล่งสร้างพลังงานสำคัญสำหรับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Plaza Daliva และคณะ 2015) กลุ่มนักวิจัยกลุ่มดังกล่าวได้ทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมโดยการยับยั้งกระบวนการ glycolysis โดยสารเคมีชนิด 2-deoxy-D-glucose ผ่านกระบวนการทำงานของเอนไซม์ชนิด hexokinase ผลการศึกษาพบว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ (ค่า VCL, VSL and VAP) มีค่าลดต่ำลง (Plaza Daliva และคณะ 2015) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาในการยับยั้งกระบวนการ glycolysis ของตัวอสุจิของมนุษย์ (Barbonetti และคณะ 2010) นอกจากนี้ การศึกษาในแมวบ้าน โดยกลุ่มนักวิจัยจากประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2010 พบว่า อัตราส่วนระหว่างการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (glucose uptake): การสร้างแลคเตต (lactate production) ในตัวอสุจิของแมวบ้านที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ร้อยละ 80 มีค่าสูงกว่า กลุ่มประชากรแมวที่ตัวอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่ร้อยละ 66 บ่งชี้ถึงความสอดคล้องของการศึกษาถึงความสำคัญของกระบวนการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ และกระบวนการ glycolysis ต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในแมวบ้าน (Terrell และคณะ 2010)

ความสำเร็จของกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ประกอบด้วยปัจจัยสำคัญหลายประการ ทั้งจากทางการทำงานของสรีรวิทยาของสัตว์เพศเมีย เช่น คุณภาพของเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์ หรือจากทางฝั่งสัตว์เพศผู้ เช่น คุณภาพของตัวอสุจิที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ จากการศึกษาในมนุษย์พบว่า รูปแบบของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่างๆโดยการประเมินด้วยคอมพิวเตอร์ โดยเฉพาะค่า VCL และ VSL มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราความสำเร็จของการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (Hirano และคณะ 2001) นอกจากนี้กระบวนการสร้างพลังงานจากปฏิกิริยา pyruvate-glycolysis มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของหางของตัวอสุจิ (flagella movement) กระบวนการคาปาซิเตชัน (sperm capacitation) และกระบวนการ tyrosine phosphorylation (Travis และคณะ 2001; Hereng และคณะ 2011) ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่จะส่งผลให้ตัวอสุจิสามารถปฏิสนธิกับเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์ได้

เมื่อทางคณะผู้วิจัยได้นำองค์ความรู้พื้นฐานที่ได้จากการวิจัยในสัตว์ต้นแบบ มาใช้จริงทางปฏิบัติในสัตว์ป่าตระกูลแมว ได้แก่ เสือลายเมฆ (สัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พุทธศักราช 2535 และจัดอยู่ในบัญชีคุ้มครอง

หมายเลข 1 ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ หรือ CITES) พบผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาในสัตว์ต้นแบบ เช่น การพบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน เช่น โปรตีน AMPK- α ในตัวอสุจิ รวมถึงการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนชนิดดังกล่าวด้วยสารเคมีชนิด AICAR ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อคุณภาพตัวอสุจิ อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดในความสามารถในการเก็บเซลล์ไข่หรือโอโอไซต์จากเสือลายเมฆเพศเมีย ทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถศึกษาผลของการทำงานของโปรตีน AMPK- α ต่อความสามารถของตัวอสุจิในการใช้พลังงานเพื่อการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายได้ โดยคณะผู้วิจัยยังมีความมุ่งหวังว่า องค์ความรู้จากการศึกษาและวิจัยดังกล่าวจะสามารถนำไปใช้จริงเพื่อการผลิตลูกสัตว์ป่าโดยวิธีการทางชีววิทยาการเจริญพันธุ์อื่นๆ (เช่น การผสมเทียมผ่านกล้อง) ในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

- Barbonetti A, Vassallo MR, Fortunato D, Francavilla S, Maccarrone M, Francavilla F. 2010. Energetic metabolism and human sperm motility: impact of CB₁ receptor activation. *Endocrinology*.151(12):5882-92.
- Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, Dupont J, Froment P. 2015. Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in murine oocytes alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. *PLoS One*.13;10(3):e0119680.
- Calle-Guisado V, de Llera AH, Martin-Hidalgo D, Mijares J, Gil MC, Alvarez IS, Bragado MJ, Garcia-Marin LJ. 2017. AMP-activated kinase in human spermatozoa: identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm motility. *Asian J Androl*.19(6):707-14.
- Cura AJ, Carruthers A. 2012. AMP kinase regulation of sugar transport in brain capillary endothelial cells during acute metabolic stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 15;303(8):C806-14.
- Donohoe PH, West TG, Boutilier RG. 2000. Factors affecting membrane permeability and ionic homeostasis in the cold-submerged frog. *J Exp Biol*.203(Pt 2):405-14.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol*.39(4):279-88.

- Hereng TH, Elgstøen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR. 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod.*26(12):3249-63.
- Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J Assist Reprod Genet.*18(4):213-8.
- Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. 2012. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS One.*7(6):e38840.
- Nguyen TM, Seigneurin F, Froment P, Combarnous Y, Blesbois E. 2015. The 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. *PLoS One.* 29;10(7):e0134420.
- Plaza Davila M, Martin Muñoz P, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva C C, Peña FJ. 2015. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced ATP Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility. *PLoS One.* 10(9):e0138777.
- Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Enríquez JA. 2007. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? (Review). *Curr Top Dev Biol.*77:3-19.
- Singer D, Bretschneider HJ. 1990. Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples--Part 1. *Thorac Cardiovasc Surg.*38(4):205-11.
- Shabani Nashtaei M, Nekoonam S, Naji M, Bakhshalizadeh S, Amidi F. 2017. Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm messenger RNAs, possibly through 5' AMP-activated protein kinase activation. *Cell Tissue Bank.* Jul 26. doi: 10.1007/s10561-017-9642-5.
- Swegen A, Lambourne SR, Aitken RJ, Gibb Z. 2016. Rosiglitazone improves stallion sperm motility, ATP content, and mitochondrial function. *Biol Reprod.* 95(5):107;1-12.

Terrell KA, Wildt DE, Anthony NM, Bavister BD, Leibo SP, Penfold LM, Marker LL, Crosier AE. 2010. Evidence for compromised metabolic function and limited glucose uptake in spermatozoa from the teratospermic domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod.* 83(5):833-41.

Travis AJ, Jorgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS, Moss SB. 2001. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem.* 276(10):7630-6.

กิตติกรรมประกาศ

- ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ
 - สัตวแพทย์ นักวิทยาศาสตร์และบุคลากร ประจำหน่วยงานต่าง ๆ ได้แก่
 - สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี
 - สำนักอนุรักษ์ วิจัยและการศึกษา องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์
 - หน่วยสูติกรรม โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - กลุ่มควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า อาคารสำนักงานสัตวแพทย์สาธารณสุข เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร
 - ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - สวนสัตว์แห่งชาติ สถาบันสมิธโซเนียน ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - ผศ.น.สพ.ดร. ชีรวัฒน์ ธาราคานิตย์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนูเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในการจัดหาตัวอย่างอวัยวะและรังไข่ของแมวบ้าน
 - อ.สพ.ญ.ดร. เอ็มอร โอพาร์รัตน์มณี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากกลไกการทำงานของไมโทคอนเดรียต่อคุณภาพตัวอสุจิ การสร้างพลังงานและความสามารถในการปฏิสนธิ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยหลายกระบวนการที่สำคัญ อีกทั้งยังมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละสปีชีส์หรือแต่ละชนิด รวมทั้งการศึกษาในสัตว์ต้นแบบเพื่อการนำไปใช้จริงในทางปฏิบัติ ทั้งทางด้านสัตวแพทยศาสตร์ หรือแพทยศาสตร์ ยังไม่สามารถเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรทั้งหมดได้อย่างแท้จริง ทางคณะผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตดังต่อไปนี้

- ทำการศึกษาหากลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานและการสร้างพลังงานของตัวอสุจิในสัตว์ตระกูลแมว นอกเหนือจากที่ได้ทำการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ เช่น กระบวนการ oxidative phosphorylation (OXPHOS) เป็นต้น และทำการเปรียบเทียบผลกับการทดลองที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้
- เนื่องจากสัตว์ป่าตระกูลแมวมีหลากหลายชนิด (37 สายพันธุ์ทั่วโลก) โดยในประเทศไทยพบทั้งหมด 9 สายพันธุ์ (พบได้ในสถานเพาะเลี้ยงเพื่อการศึกษาวิจัยจำนวน 8 สายพันธุ์) ซึ่งสัตว์ทั้งหมดถูกจัดอยู่ในบัญชีรายชื่อสัตว์ป่าคุ้มครองของประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า การศึกษาและวิจัยไม่ควรจำกัดอยู่ในสัตว์ป่าตระกูลแมวเพียง 1 สายพันธุ์ หากแต่ควรทำการศึกษาและวิจัยในสัตว์ป่าตระกูลแมวทั้ง 8 สายพันธุ์ เพื่อประโยชน์สูงสุดในการสร้างธนาคารพันธุกรรมที่มีคุณภาพในการอนุรักษ์และเพาะขยายพันธุ์สัตว์ป่าต่อไปในอนาคต
- นอกจากการศึกษาวิจัยเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางสัตวแพทยศาสตร์ องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาและวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปเพื่อการศึกษาต่อยอดในทางการแพทย์ เช่น ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินสืบพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างตัวอสุจิ ถึงแม้ว่า ในมนุษย์จะมีการศึกษาที่บ่งชี้ถึงความสำคัญของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการสร้างพลังงาน เช่น โปรตีน AMPK แต่อย่างไรก็ตาม ยังขาดการศึกษาถึงการนำผลของการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนชนิดดังกล่าวต่อความสามารถในการปฏิสนธิ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ควรนำไปต่อยอดการศึกษาในมนุษย์

6. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติหรือผลงานตามที่คาดว่าจะได้ในสัญญาโครงการ
 - ทางคณะผู้วิจัยได้จัดทำบทความวิชาการเสร็จสมบูรณ์ (ตามเอกสารแนบในภาคผนวก) โดยจะทำการส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติภายในเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561
 - รายชื่อวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ได้แก่
Journal of Cryobiology
Quartile 1 (สาขา Medicine) (Scimago Journal & Country Rank)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงสาธารณะ
องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้สามารถก่อให้เกิดประโยชน์แก่การอนุรักษ์และวิจัยด้านการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ป่าตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ โดยหน่วยงานที่สามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้แก่ องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ รวมถึงศูนย์เพาะขยายพันธุ์สัตว์ป่าในสังกัดภาครัฐบาลและเอกชน ทั้งในและต่างประเทศ
 - เชิงวิชาการ
องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษา ในหลักสูตรที่เกี่ยวข้องกับสาขาวิชาชีววิทยา การเจริญพันธุ์ทั้งในสัตว์และมนุษย์ เช่น หลักสูตรระดับบัณฑิตศึกษา สังกัดภาควิชาสัตวศาสตร์ วนศาสตร์วิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. อื่นๆ
 - ผลงานวิจัยบางส่วนจากการศึกษาครั้งนี้ได้รับคัดเลือกให้นำเสนอผลงานในรูปแบบ Poster และ Flash Talk ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา (ตามเอกสารแนบในภาคผนวก)

ภาคผนวก

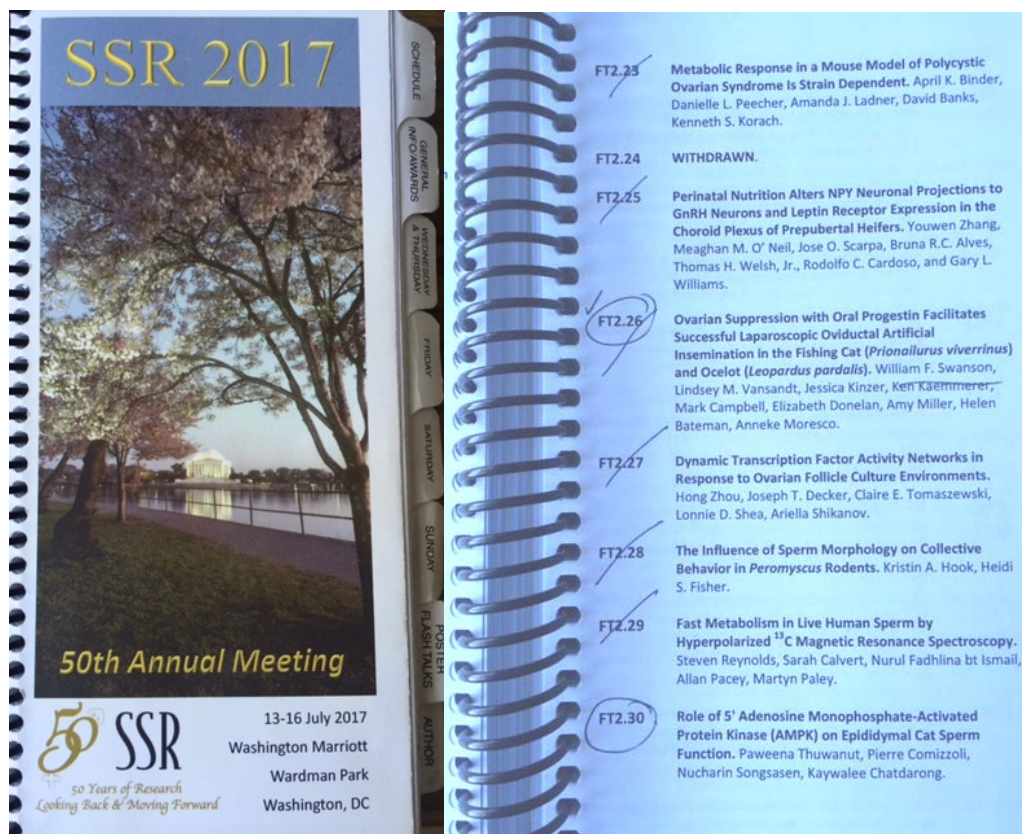
โครงการ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของไมโทคอนเดรียของตัวอสุจิ ต่อคุณภาพตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็ง พลังงานในเซลล์ และความสามารถในการปฏิสนธิในแมวบ้านและสัตว์ป่า
ตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์

รายละเอียดเอกสารแนบประกอบด้วย

1. บทคัดย่อในการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - The Society for the Study of Reproduction ครั้งที่ 50 กรุงวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. บทความทางวิชาการ (manuscript draft) เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
 - Journal of Cryobiology
 - Quartile 1 (สาขา Medicine) (Scimago Journal & Country Rank)

1. บทคัดย่อในการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ



- ชื่อผลงานวิจัย

Role of 5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) on Epididymal Cat Sperm Function. Paweena Thuwanut, Pierre Comizzoli, Nucharin Songsasen, Kaywalee Chatdarong. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand; Smithsonian Conservation Biology Institute, USA

- รูปแบบการนำเสนอผลงาน

การนำเสนอแบบโปสเตอร์และแบบปากเปล่า (Flash talk presentation)

- ชื่องานประชุมวิชาการ

The Society for the Study of Reproduction ครั้งที่ 50 กรุงวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา (งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ)

- **หมายเหตุ**

เนื่องจากบทความดังกล่าวได้จัดทำในระหว่างที่ผู้วิจัยวิจัยหลัก ได้สังกัด คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังนั้นรายละเอียดของรายนามต้นสังกัดในบทความดังกล่าว จึงยังไม่ได้รับการแก้ไขให้เป็น คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), present in mitochondria and responds to changes of energy level in cells, has been reported to either suppress or activate glucose uptake and metabolism in adipocytes leading to intracellular energy storage or use. This homeostasis phenomenon can be induced by pharmacological substances such as 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR). Therefore, study of AMPK/AICAR function has been applied for sperm cryopreservation aimed to maintain intracellular energy that results in improved sperm quality post-thawing. However, fundamental knowledge of AMPK and its roles on sperm function is absent in cat. The present study aimed at (1) investigating presence of AMPK in epididymal cat sperm and comparing protein level between normospermic and asthenospermic cats, (2) examining influences of AICAR doses and incubation periods on epididymal cat sperm function prior to cryopreservation and (3) investigating phosphorylation of AMPK α (pAMPK α) after AMPK activation by AICAR. In Experiment 1, epididymal cat sperm, retrieved after routine castration and divided into two groups ($\geq 70\%$ sperm motility (normospermic cat; NMS; n=11) and $\leq 50\%$ sperm motility (asthenospermic cat; AS; n=6), was evaluated for AMPK quantity (western blot analysis). In Experiment 2, epididymal cat sperm (n =10) was incubated with 0 (control), 0.5, 2, or 5 mM AICAR for 30 min or 60 min prior to cryopreservation. Sperm quality (subjective motility, sperm motility patterns, membrane integrity, acrosome integrity and reaction and mitochondrial membrane potential) was evaluated. In Experiment 3, epididymal cat sperm (n=6) was treated as Experiment 2 and evaluated for pAMPK α quantity (western blot analysis). AMPK was present in both NMS and AS cats. In addition, AMPK quantity did not significantly differ between two groups (0.37 ± 0.09 vs 0.27 ± 0.1). In Experiment 2, 0.5 mM and 2 mM AICAR supplementation did not affect sperm membrane integrity at both time points whereas 5 mM

AICAR had adverse effects to all sperm quality ($P \leq 0.05$). However, subjective motility and motility patterns (curve linear velocity and straight linear velocity) was significantly decreased ($P \leq 0.05$) after 60 min incubation with 2 mM AICAR. In contrast, mitochondrial membrane potential did not significantly differ. In Experiment 3, 30 min-AICAR incubation (with 0.5 mM or 2 mM) could activate AMPK via pAMPK α pathway (control: 0.21 ± 0.06 vs 0.5 mM: 0.27 ± 0.03 vs 2 mM: 0.26 ± 0.05) ($P \leq 0.05$). However, down-regulate effect of AICAR to pAMPK α pathway was observed after 60 min AICAR incubation ($P \leq 0.05$). In summary, AMPK was present in epididymal sperm from both NMS and AS cats. Incubation of 0.5 and 2 mM AICAR for 30 min could activate AMPK via pAMPK α pathway without deleterious effects to sperm quality prior to cryopreservation. These finding can be further applied for cat sperm intracellular energy storage during cryopreservation. This research was supported by (1) Thailand Research Fund (MRG-5980231) with joint funding of Grants for Development of New Faculty Staff, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (2) Research Unit of Obstetrics and Reproduction in Animals, Chulalongkorn University, Thailand and (3) Research Associate Program, Smithsonian Conservation Biology

2. บทความทางวิชาการ (**manuscript draft**) เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

☐ Journal of Cryobiology

☐ Quartile 1 (สาขา Medicine) (Scimago Journal & Country Rank)

Title: Adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK): The expression and its regulatory kinase effects on domestic cat sperm cryopreservation as a research model for endangered wild felids and infertile patients

Paweena Thuwanut¹ DVM, MSc, PhD

Pierre Comizzoli² DVM, MSc, PhD

Kamthorn Pruksananonda¹ MD

Kaywalee Chatdarong³ DVM, MSc, PhD

Nucharin Songsasen^{2,*} DVM, MSc, PhD

¹ Reproductive Medicine Unit, Department of Obstetrics-Gynaecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

² Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, Front Royal, Virginia and Washington, District of Columbia, USA

³ Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author: Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, Virginia, 22630, USA

E-mail address: SongsasenN@si.edu

1 **ABSTRACT**

2 Adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) protein is executively
3 characterized as key regulator of mammalian cell metabolism and energy sensor. Activation
4 of AMPK by pharmacological substances such as 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-
5 ribofuranoside (AICAR) has been reported to strengthen male gamete cell functions. The
6 present study, therefore, aimed to investigate I) expression of AMPK protein, II) AMPK
7 regulatory kinase pathway and III) effects of AMPK activation (AICAR) to epididymal
8 sperm quality using domestic cats with high proportion of sperm pleomorphism as animal
9 research model for endangered wild felids and infertile patients. Study I: AMPK protein (α
10 subunit isoform) expression in high proportion pleomorphic sperm sample with $\geq 70\%$
11 motility ($n = 11$) and $\leq 50\%$ motility ($n = 6$) was evaluated by western blot analysis. Study II:
12 AMPK α signalling pathways including expression of phospho-AMPK α protein Thr172 ($n =$
13 6); expression of glucose transporter 1 (GLUT1) protein ($n = 10$) and intracellular adenosine
14 5'-triphosphate (ATP) level ($n = 10$) were investigated by western blot analysis and high
15 performance liquid chromatography technique (HPLC), respectively. Study III: AMPK α in
16 sperm was triggered by AICAR (0 mM; control, 0.5 mM and 2.0 mM) for 30 and 60 min
17 prior to cryopreservation process and evaluated for sperm functions and fertilizing ability (n
18 = 10). Total of 53 animals were, hence, included. Our major findings indicated that AMPK
19 protein (α subunit) dominantly expressed in sperm with high proportion of motility ($P \leq$
20 0.05). The presence of AMPK activator, AICAR, could regulate AMPK function (AICAR-
21 AMPK regulation pathway) via increase of phospho-AMPK α Thr172, GLUT1 protein
22 expression and intracellular ATP level. Furthermore, short equilibration of AMPK α protein
23 with 0.5 mM AICAR for 30 min prior to cryopreservation procedure positively influenced cat
24 sperm functions (sperm motility, sperm motility patterns and cleavage rate after homologous
25 *in vitro* fertilization) without deleterious effects to sperm membrane integrity ($P \leq 0.05$). In

summary, our research group principally points the major findings on expression of AMPK α protein and its regulatory kinase effects on male cat gamete cell quality leading to worthwhile influence of fertilizing ability. Additionally, the present study will possibly be advantageous for further studies in endangered wild felids and infertile patients particularly presenting the high proportion of pleomorphic sperm.

Keywords: AMPK protein, energy regulation, felids, sperm functions

1. Introduction

The major biochemical pathway for intracellular energy reservoir, regulating sperm function in each mammalian species, have been extensively discussed among laboratories (Ruiz-Pesini et al., 2007; Amaral et al., 2013). In somatic cells, mitochondria are important organelles which are best known as eukaryotic cell powerful house (Amaral et al., 2013). These organelles have been generally hypothesized to participate in several important processes such as adenosine 5'-triphosphate (ATP) production via glycolysis pathway or oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway (Ruiz-Pesini et al., 2007). In mammalian male gamete cell i.e. sperm, the mitochondria together with fibrous sheath of flagellum have been hypothesized to be involved with ATP production leading to sperm flagella movement and fertilization process (Ruiz-Pesini et al., 2007; Peña et al., 2009).

Recently, the studies on one of cutting-edge knowledge in the intracellular energy sensors or regulators, 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), were emerged in various cell types. AMPK is a serine/threonine heterotrimeric protein kinase composed of three subunits (catalytic α -subunit bound with β - and γ -regulatory subunit) and responses to changes of adenosine monophosphate (AMP) and ATP (AMP:ATP) ratio in living cells (Bertoldo et al., 2015; Shabani Nashtaei et al., 2016). The AMPK function can be generally induced by pharmacological substances such as 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAR) or Metformin (Bertoldo et al., 2015). The activation of AMPK has been reported to rapidly influence glucose uptake and metabolism in adipocytes leading to the intracellular energy storage (Gaidhu et al., 2006 and 2009). The previous study in human aortic endothelial cell culture presented that AICAR treatment could either activate or down-regulate AMPK function via a signal of ATP generation by OXPHOS (p53 phosphorylation) and glucose uptake pathway (Ido et al., 2012). As in other cell types, AMPK was identified in mammalian gonadal cells in both male and female; testis, ovary and

1 through germ cell maturation stage (Bertoldo et al., 2015). In female, mice oocytes at
2 metaphase-II stage demonstrated that the increase of abnormal mitochondria together with a
3 3-fold lower ATP concentration was observed in α 1AMPK deficient oocytes compared to the
4 control indicating that AMPK plays a crucial role as gamete cell energy regulator (Bertoldo et
5 al., 2015). In male, the alteration of α AMPK gene in murine testes induced the abnormal
6 sperm morphology (Tartarin et al., 2012). The dysfunction of AMPK protein kinase
7 regulation pathway in male mice was associated with the impairment of testicular junctional
8 complex and the abnormal acrosome morphology (Towler et al., 2008). In sperm cell, AMPK
9 mainly presented from mid-piece through sperm flagellum in various species i.e. boar,
10 chicken and human (Hurtado de Llere et al., 2012; Calle-Guisado et al., 2017; Nguyen et al.,
11 2015).

12 Due to the ability to identify the AMPK expression in mammalian sperm, the
13 application of AMPK function-induction to maintain sperm energy was fascinating. AMPK
14 activation has revealed its related functions to sperm quality maintenance after long-term
15 storage (Bertoldo et al., 2015). Besides, AMPK function activated by AMPK activator i.e.
16 AICAR has been reported to be involved with the increase of the intracellular ATP
17 concentration, the decrease of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation reaction
18 (LPO) in post-thaw chicken semen (Nguyen et al., 2015). The study in normospermic human
19 donor with proven fertility revealed the similar results as in chicken study; the AMPK
20 activation could decrease ROS level, apoptotic like-changes and increase mitochondrial
21 membrane potential in cryopreserved sperm whereas fertilizing ability related to AMPK
22 function was absent (Shabani Nashtaei et al., 2016). Until now, although the studies on
23 AMPK in various topics have been conducted in several animal species, AMPK functions, its
24 regulatory kinase effects and AMPK activator agents have not been investigated in felid
25 species, both domestic and non-domestic. Similar to the inbred mice and infertile patients,

sperm derived from epididymis of domestic and ejaculated sperm from non-domestic cats always present high proportions of sperm pleiomorphism leading to conception and pregnancy failure. Furthermore, morphologically abnormal sperm, i.e. mid-piece part, is less tolerance to cryo-induced-damage leading to the limitation of energy production source (Peña et al., 2009). In domestic cat, the sperm mitochondrial membrane potential related to mitochondrial function was, however, remarkably decreased after cryopreservation (Thuwanut et al, 2010). This phenomenon could be hypothesized that energy production might be decreased leading to fertility impairment. From the diverse points of view, the perpetuation of the intracellular energy storage by AMPK activation during sperm cryopreservation might be of interest as an alternative tool to improve post-thaw sperm functions and fertilizing ability in domestic cats as a model for the endangered wild felid species and the infertile patients.

The present study, therefore, aimed to investigate I) the expression of AMPK protein in epididymal sperm, II) the AMPK regulatory kinase pathway and III) the effects of AMPK activation by chemical substance (AICAR) to epididymal sperm quality and fertilizing ability using the domestic cats as research model for the endangered wild felids and the patients with infertility problems.

2. Materials and Methods

Experimental design

Study I: The expression of AMPK α protein in epididymal cat sperm (sperm sample with $\geq 70\%$ motility: $n = 11$; sperm sample with $\leq 50\%$ motility: $n = 6$)

Epididymal sperm from each cat was collected in Tris-base buffer and adjusted to 10×10^6 as the final total number. Sperm morphology and subjective motility were evaluated and then divided the cats into two groups; motility $\geq 70\%$ or $\leq 50\%$. Protein from each sperm

sample was extracted and finally assessed for the expression of AMPK protein and band intensity by western blot analysis.

Study II: AMPK α signalling pathway regulated by AICAR (the expression of phospho-AMPK α : $n = 6$; the expression of glucose transporter 1 protein (GLUT1): $n = 10$ and the intracellular ATP level: $n = 10$)

Epididymal sperm from each cat was retrieved as previously described in Study I, divided into three groups; control, 0.5 mM and 2.0 mM AICAR treatment and finally equilibrated for 30 min (short period) and 60 min (long period) prior to cryopreservation process. The expression of phospho-AMPK α , GLUT1 protein and band intensity were evaluated by western blot analysis. Furthermore, the intracellular ATP level was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique at two-time points (before and after cryopreservation process).

Study III: AMPK α regulatory kinase effects on epididymal cat sperm quality and embryo development ($n = 10$)

Epididymal sperm from each cat was experimentally designed as described in Study II. Sperm quality (subjective motility, progressive motility, motility patterns, integrity of plasma membrane and acrosome including with mitochondrial membrane potential) was evaluated prior to and after sperm cryopreservation process. Besides, fertilizing ability (cleavage rate) of post-thaw sperm was also tested by homologous *in vitro* fertilization (IVF) technique.

Research animals

Fifty-three male cats (n = 53) with unknown age were included in this study. They were subjected to routine castration at the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and the Veterinary Public Health Division of the Bangkok Metropolitan Administration, Thailand. The testes were kept in an isotonic normal saline solution supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and transported to the laboratory at room temperature within 1-3 h. The testes were randomly allocated for three parts of study as described in experimental design. For fertilizing ability test; total number of grade I and II oocytes were collected from female cats (unknown age) after the routine ovariectomy at the Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and the Veterinary Public Health Division of the Bangkok Metropolitan Administration, Thailand.

Sperm cryopreservation and evaluation criteria

All chemical substances were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) unless otherwise indicated.

Sperm cryopreservation

Sperm freezing extenders and thawing media were prepared according to a protocol described by Axnér et al. (2004). For sperm collection and cryopreservation, sperm was collected by cutting the cauda epididymis into small pieces in 0.5 mL of pre-warmed Tris-base buffer. The total number of sperm was adjusted and centrifuged prior to cryopreservation process. The sperm pellet was extended at room temperature with 0.65 mL

of semen extender I (EE-I) with or without AICAR (as described in experimental design). After 1 h of equilibration to 4°C, semen extender II (as equal volume to EE-I) was added to each sperm sample. Extended sperm sample was then loaded into two 0.25 ml straws (approximately 0.125 mL per straw), cryopreserved in liquid nitrogen tank (Rota et al., 1997), plunged into liquid nitrogen where the straws were kept until evaluation. For thawing, each straw was submerged in a water bath at 37 °C for 15 sec and diluted with 0.125 mL of thawing medium (1/1; v/v).

The expression of AMPK α protein, Phospho-AMPK α protein and GLUT1 protein

Sperm protein was extracted by incubation with protein lysis buffer (CellLyticTM MT) supplemented with protease inhibitor for 30 min on shaker at room temperature and centrifuged at 12,000 g at 4°C for 10 min. The sperm pellet was discarded whereas the supernatant was measured for total protein amount by NanoDrop 100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The final protein concentration was adjusted to 15 µg/µl by dilution in PBS and stored at -80°C until western blot analysis. Western blot analysis was performed as following; the protein sample was mixed with SDS sample loading buffer (4x Laemmli sample buffer and β-mercaptoethanol; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and processed on SDS-PAGE (4%-15% Miniprotein® TGX Precast Gels; Bio-Rad) for 1 h. Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) loaded into the first lane were used as the molecular weight standard. Gels were then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA.) and blocked with 2.5% skim milk (Bio-Rad) diluted in washing buffer (Tris-buffered saline plus 0.1% ((v/v) Tween) for 1 h at room temperature (25°C) and incubated on shaker in the dark at 4°C overnight with one of the following primary antibodies; (I) alpha-Tubulin Rabbit antibody (1:1000; Cell Signaling

Technology, Inc., Danvers, MA, USA.); (II) AMPK α Rabbit Antibody (1:1000; Cell Signaling Technology) (III) Phospho-AMPK α Thr172 (D76.5E) Rabbit Antibody (1:2000; Cell Signaling Technology) and GLUT1 (D3J3A) Rabbit Antibody (1:1000; Cell Signaling Technology). Sample incubated with normal rabbit IgG (1:1000) served as negative control. After overnight incubation, the blot membrane was incubated with secondary antibody; anti-rabbit IgG antibody (1:2000; Cell Signaling Technology) conjugated with HRP for 1 h at room temperature (25°C). The immunoreactivity was detected by colorimetric method (Opti 4CNTM Substrate Kit, Bio-Rad). The volume intensity of each protein band and background was measured by using Synegen software (Frederick, MD, USA). The relative quantification volume of was normalized by dividing final volume intensity of AMPK α , phospho-AMPK α Thr172 and GLUT1 antibodies (volume intensity of each protein band minus background) by the final alpha-Tubulin volume intensity.

The Intracellular ATP concentration

The sperm intracellular ATP extraction method was repeated from protocol previously described by Thuwanut at al. (2016). In brief, the sperm sample was washed in ice-cold 0.15 M Sodium Chloride by centrifugation. The sperm pellet was resuspended in ice-cold Triton X and 10% Perchloric acid. The sperm pellet was discarded while the supernatant was stored at 4°C and finally evaluated for intracellular ATP concentration within 1 h by high performance liquid chromatography technique (HPLC). The peaks were analyzed by the absorbance at 254 nm with reverse phase HPLC on Ultrasphere 18 mm column. The continuous gradient elution was used for HPLC separation. The elution program for mobile phase A and B was as followed: 0 min 100 % A, 0 %B; 2 min 95 % A, 5 % B; 4 min 80 % A, 20 % B; 5.3 min 75 % A, 25 % B and 6 min 100 % A, 0 % B. The intracellular ATP

concentration was identified by comparison with the external standard method ($r^2 = 0.90$).

Data were present as means of two replication test.

Sperm quality

Subjective, progressive sperm motility and sperm motility patterns and sperm morphology

A 5 μ L of sperm sample was placed on a pre-warmed glass slide and assessed using a phase contrast microscope at 200X magnification, the proportion of sperm motile sperm and progressive sperm motility evaluation (Thuwanut et al., 2015). Sperm motility patterns was evaluated by Sperm Class Analyzer® CASA system (Microptic S.L, Barcelona, Spain).

Three to five randomly selected optical fields of each sperm sample were measured for sperm motility patterns; straight line velocity (VSL); average path velocity (VAP); curve linear velocity (VCL) and amplitude lateral head displacement (ALH)) as described by Thuwanut et al. (2010). For sperm morphology; head, mid-piece and tail was assessed by dried (William's staining) and wet (formol saline fixative) smear, respectively.

Integrity of sperm plasma membrane, acrosome and mitochondrial membrane potential

Sperm plasma membrane and acrosome integrity were determined by the double-fluorescent labelling techniques (sperm membrane integrity: EthD-1 and SYBR-14, Molecular probes Inc., OR, USA and acrosome integrity: FITC-PNA mixed with propidium iodide (PI; Molecular Probes Inc.)) (Axnér et al. 2004). Sperm mitochondrial membrane potential was evaluated by using the fluorochrome 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1; Molecular Probe Inc.) (Thuwanut et al. 2011). For sperm plasma membrane integrity, two hundred sperm were classified into three

categories: live, moribund and dead sperm. To evaluate acrosome integrity status, the sperm sample was classified into three categories: intact acrosome, reacted acrosome, and missing acrosome or acrosomal loss. In addition, two hundred spermatozoa were evaluated and classified into two categories: high and low mitochondrial membrane potential.

Homologous in vitro fertilization

Oocyte recovery and *in vitro* culture (IVM) media were prepared as described by Thuwanut et al. (2015) whereas the *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) media were commercially purchased (Nestle et al., 2012). Total of 513 oocytes with more than two layers of compact cumulus cells and presence of dark homogeneous ooplasm were collected from ovaries of domestic cats after a routine ovariohysterectomy. The selected oocytes were gently washed in oocyte recovery and IVM medium. Approximately 8-10 oocytes were cultured in a drop of 50- μ L IVM medium at 38.5°C under 5% CO₂. Cumulus cells were then partially removed at 24 h post-IVM. The oocytes were washed and cultured in a drop of IVF medium and incubated with post-thawed sperm (0.5×10^6 /mL) supplemented with or without AICAR. After co-incubation with post-thaw sperm for 18 h, all cumulus cells of the oocytes were removed. The oocytes were cultured in IVC medium for another 6 h. The cleavage rate was recorded after 24 h post-insemination.

Statistical analysis

Data analyses were performed using ANOVA with SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The statistical models included the fixed effects of time and extenders. The dependent variables (percentage of motility, motility patterns, percentage of intact plasma membrane, acrosome, mitochondrial activity, relative western blot band intensity and

intracellular ATP level) were analysed by using ANOVA (GLM procedure). Differences between treatments in each evaluation criteria were compared using a Tukey-Kramer test. The level of progressive motility was compared using NPAR1WAY procedure and a Kruskal-Wallis test. The embryo development was analysed by a binomial score (1 or 0) based on the presence or absence in pronuclear formation and cleavage stage of embryo. Values are presented as mean $\pm$ SD. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

3. Results

The expression of AMPK α protein in epididymal cat sperm

The AMPK α protein expression was observed in epididymal cat sperm with high and low motility ($\geq 70\%$ and $\leq 50\%$ motility) (Fig. 1). Relative AMPK α protein band intensity compared with standard protein (α -Tubulin protein) in sperm with $\geq 70\%$ was higher than sperm sample group with $\leq 50\%$ motility ($P \leq 0.05$) (Fig. 1).

Noted: The percentage of sperm head normal morphology in all sperm samples included in this study was 91.3 ± 3.7 whereas the mid-piece and tail normal morphology was 57.4 ± 8.1 .

AMPK α signalling pathway regulated by AICAR

The preliminary results demonstrated that 5.0 mM AICAR performed the negative effects to sperm quality (i.e. subjective sperm motility, sperm motility patterns, sperm membrane and acrosome integrity, mitochondrial membrane potential etc. (Table 2-4)). Thus, AMPK α signalling pathway (phospho-AMPK α Thr172, GLUT1 protein and intracellular ATP level) including embryo development were exempted in 5.0 mM AICAR group. Western blot analysis revealed appreciable levels of phospho-AMPK α Thr 172 and GLUT1

protein band intensity in sperm samples among equilibration time and AICAR concentration (Fig. 2A and 2B). The highest relative phospho-AMPK α Thr172 band intensity was present in sperm incubated with 0.5 mM AICAR for 30 min prior to cryopreservation process (0.27 ± 0.11) which was significantly higher than control group (0.21 ± 0.09) ($P \leq 0.05$) (Fig. 2A). Although the relative phospho-AMPK α Thr172 band intensity did not differ among groups after 60 min equilibration ($P > 0.05$), the significantly lower expression of phospho-AMPK α Thr 172 was observed compared to the samples with 30 min equilibration ($P \leq 0.05$) (Fig. 2A).

Similar to phospho-AMPK α Thr 172, the equilibration time negatively influenced the relative GLUT1 protein band intensity ($P > 0.05$) (Fig. 2B). However, sperm samples equilibrated with 0.5 mM and 2.0 mM AICAR for 30 min expressed the higher relative GLUT1 protein band intensity (0.5 mM AICAR: 0.20 ± 0.17 and 2.0 mM AICAR: 0.21 ± 0.19) compared to control group (0.13 ± 0.15) ($P \leq 0.05$) (Fig. 2B).

For intracellular energy evaluation, sperm samples equilibrated with 0.5 mM (30 min and 60 min) and 2.0 mM AICAR (60 min) had a higher intracellular ATP level compared to control group ($P \leq 0.05$) (Table 1). The equilibration time did, however, affect the intracellular ATP level ($P > 0.05$) (Table 1). Similar to pre-freezing process, the intracellular ATP level of post-thaw sperm significantly increased in 0.5 mM (30 min and 60 min equilibration) ($P \leq 0.05$) whereas the ATP level did not significantly differ between equilibration period ($P > 0.05$) (Table 1).

AMPK α regulatory kinase effects on epididymal cat sperm quality and embryo development

The major effects of AMPK α regulatory kinase effects on epididymal cat sperm quality was obviously observed in post-thaw samples. Supplementation of 0.5 mM ACAR (30 min equilibration group) as AMPK activator promoted post-thaw subjective sperm

motility and sperm motility patterns (VCL and VSL) ($P \leq 0.05$) (Table 2 and 4). For embryo development after homologous IVF, the cleavage rate was significantly higher in 0.5 mM AICAR group (both incubation time; 30 and 60 min) compared to control and 2.0 mM AICAR group ($P \leq 0.05$) (Table 5). Focusing on equilibration time prior to cryopreservation process, the exposure of sperm with AICAR notably reduced sperm quality i.e. sperm subjective motility (2.0 mM AICAR), sperm progressive motility (0.5 and 2.0 mM AICAR), sperm membrane integrity (all sample groups including control), mitochondrial membrane potential (control and 0.5 mM AICAR) and sperm motility patterns (VCL; control and 2.0 mM AICAR) (Table 2-4) ($P \leq 0.05$). It is, however, interesting that AICAR supplementation (0.5 and 2.0 mM) before cryopreservation process did not perform any deleterious effects to sperm membrane integrity when compared during the same equilibration time ($P > 0.05$) (Table 2).

4. Discussion

The regulation of sperm energy level, widely investigated in several mammalian species, has been considered fundamental and essential role for sperm functions, sperm-oocyte interaction and fertilization ability. The present study demonstrated the first report of energy and metabolic sensor expression, AMPK protein (AMPK α subunit isoform), in domestic cat epididymal sperm with high proportion of abnormal sperm morphology. The activation of AMPK α protein by the pharmacological substance, AICAR or AICAR-AMPK regulation pathway, appeared to be involved with the increase of phospho-AMPK α Thr172, GLUT1 protein expression and the intracellular ATP level. In addition, the short activation of AMPK α protein by 0.5 mM AICAR for 30 min prior to cryopreservation process flavoured cat sperm functions (sperm motility, sperm motility patterns and embryo production by

homologous IVF process) without deleterious effects to sperm viability (sperm membrane integrity).

The higher protein band intensity of AMPK α protein expression by western blot analysis was observed in epididymal cat sperm with $\geq 70\%$ compared to sperm with $\leq 50\%$ motility groups. The AMPK protein expression studies were initially conducted in somatic cells (i.e. brain, lung, liver and pancreas) then developed to germ cell (i.e. testis) studies (Cheung et al., 2000). In rat testis, the AMPK activity was associated with one catalytic subunit (α subunit) and two regulatory subunits (γ and β subunit) (Cheung et al., 2000). In sperm, AMPK (α -catalytic subunit) dominantly expressed in various mammalian and avian species (i.e. boar, human and chicken) (Hurtado de Llere et al., 2012; Calle-Guisado et al., 2017; Nguyen et al., 2015). The recent study in human demonstrated that AMPK α protein significantly expressed in high motility sperm fraction compared to low-quality sperm fraction which contained less sperm motility or more immotile sperm (Calle-Guisado et al., 2017). This is in accordance with our present study which strong AMPK α protein expression was investigated in high proportion of sperm motility sample. However, the sperm motility selection process was different between these two studies (sperm selection by density gradient process in human study and proportion of motile sperm cut-off by subjective sperm motility evaluation in the present study). In avian and human sperm, the expression of AMPK α protein markedly localized in post-equatorial or mid-piece and sperm flagellum regions whereas in boar sperm AMPK α protein mainly presented in mid-piece (Hurtado de Llere et al., 2013; Nguyen et al., 2015; Shabani Nashtaei et al., 2016). These findings could imply that the AMPK α protein expression might be possibility related to proportion of sperm motility (Calle-Guisado et al., 2017).

To assess the effects of AMPK modulators, the AMPK agonist (AICAR) was supplemented to sperm samples with different final concentration (0.5 mM and 2.0 mM) for

specified time (30 min and 60 min at 4°C prior to sperm cryopreservation process). Our results by western blot analysis clearly revealed that AMPK α protein in cat sperm was phosphorylated at Thr172. In addition, we demonstrated that the kinase phosphorylation level was decreased by time-dependent manner. In accordance with the activation of AMPK α protein in chicken sperm by AICAR at 35°C, Thr172-phosphorylated AMPK was detectable at 10 min and 25 min incubation but then the amount of Thr172-phosphorylated AMPK was decreased after 40 min activation (Nguyen et al., 2015). However, the present findings in cat sperm study was in contrast to the study in boar which AMPK protein was mainly increased during 60 min period and remained detectable up to 24 hr after 38.5°C incubation (Hurtado de Llere et al., 2012). To date, the research, focused on the correlation between Thr172-phosphorylated AMPK expression and cell incubation under temperature-dependent manner, is limited. Nonetheless, lowering temperature of microenvironment related to the intracellular ATP synthesis should be considered one of factors affecting phospho-AMPK α Thr172 expression. During cooling and cryopreservation process, ATP production in living cell was decreased due to the thermodynamic effect to cell physiology i.e. the inhibition of sodium-potassium ion (Na⁺/K⁺) pump function at cell membrane (Singer and Bretschneider, 1990). Corresponding to the study in frog, hypothermia condition could induce the glial cell-channel functional arrest as an energy-sparing strategy (Donohoe et al., 2000). Furthermore, AMPK α protein expression was reported to positively correlated with the intracellular energy level or ATP content which was confirmed by the study in primary human brain capillary pericytes (Castro et al., 2017). We, hence, could hypothesize that the decrease of phospho-AMPK α Thr172 expression during sperm cooling ramp and different time-manner might be related to ATP production level.

In general, the glycolysis pathway and GLUT1 protein activity at cell membrane could be regulated by the AMPK activation (Bertoldo et al., 2015). For example, the study in

1 rat Sertoli cell culture, AMPK could enhance the increase of lactate production which was
2 related with the increase in glucose uptake and levels of GLUT1 protein expression (Galardo
3 et al., 2007). In murine brain microvasculature endothelium bEnd.3 cell line, the increase of
4 endothelial glucose transport capacity was directly caused by the AMPK activation in blood-
5 brain barrier-derived endothelial cells leading to GLUT1 protein and intracellular energy
6 triggering (Cura and Carruthers, 2012). According to the present study, GLUT1 protein
7 expression level in the epididymal cat sperm treated with AICAR for 30 min was higher than
8 control group. The findings might indicate that the AMPK activation by AICAR could trigger
9 translocation of GLUT1 protein in the epididymal cat sperm which was similar to other
10 somatic cell types. After 60 min sperm sample equilibration, GLUT1 protein expression level
11 was not, however, significantly different among groups but remarkably decreased due to
12 time-dependent manner. This finding was comparable with the result of phospho-AMPK α
13 Thr172 protein expression level which was decreased after 60 min equilibration. Previous
14 attempts to stallion sperm study revealed that the AMPK activation by antidiabetic compound
15 (rosiglitazone) dramatically increased phospho-AMPK α signalling as well as ATP content
16 and glucose uptake (Swegen et al., 2016) supporting the evidence of the positive correlation
17 between phospho-AMPK α Thr172 and GLUT1 expression level in living cell homeostasis.
18 Given the positive role of AMPK on intracellular ATP content in the epididymal cat sperm as
19 presented in this study, the explanation for this phenomemnon was that AICAR was
20 converted by adenosine kinase to monophosphorylated nucleotide (ZMP) leading to the
21 binding between ZMP/AMPK and allosteric activation of phospho-AMPK α Thr172 (Corton
22 et al., 1995). Glucose metabolism and glycolysis pathway, triggered by phospho-AMPK α
23 Thr172, mainly regulated ATP synthesis (Mihaylova and Shaw, 2011). In murine pericytes,
24 the pharmacological activation of AMPK elevated ATP content by 50% when compared to
25 control (Castro et al., 2018) which was similar to stallion sperm study (Swegen et al., 2016).

1 The intracellular ATP level was 2-time increased by AMPK activator potency (Swegen et al.,
2 2016). Hence, the present findings supported the previous reports in the correlation between
3 the AMPK activation and the ATP regulation in gamete and somatic cells.

4 Up to date, AMPK α regulatory kinase effects on epididymal cat sperm quality and
5 embryo development have never been conducted. According to the findings from our present
6 study, the AMPK activation mostly notably emerged post-thaw sperm motility, progressive
7 motility, sperm motility patterns (VCL and VSL) and embryo development after homologous
8 IVF. Noted to the potential side of somatic and gamete cells treatment with the AMPK
9 pharmacological activator, the AMPK stimulation has been considered the energy-regulator
10 role including glycolysis pathway (Marsin et al., 2002). As previously described from our
11 findings, AICAR could activate phospho-AMPK α Thr172 leading to GLUT1 protein
12 expression and ATP production activation. These findings could be hypothesized that
13 GLUT1 protein expression and ATP production activation might be related in the epididymal
14 cat sperm glycolysis. Generally, glycolysis is the process that glucose is converted into
15 pyruvate following by the release of energy in form of ATP (2 ATP molecules per glucose)
16 and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Consequently, the growing hypothesis for
17 the source of ATP in mammalian sperm was executively focused on either glycolysis or
18 OXPHOS pathways at the sperm mid-piece region (mitochondria) or at sperm flagellum
19 (Ruiz-Pesini et al., 2007; Amaral et al., 2013). In stallion, OXPHOS pathway was considered
20 the main energy source for sperm flagella sliding and movement (Plaza Daliva et al., 2015).
21 To clarify the role of glycolysis, the same research group inhibited the glycolysis pathway by
22 glucose analogue (2-deoxy-D-glucose) via its actions on hexokinase enzyme which
23 performed the negatively effects to stallion sperm motility and sperm motility patterns (VCL,
24 VSL and VAP) (Plaza Daliva et al., 2015). Similar to human, the decrease of sperm motility
25 was exhibited after sperm the deprive of glucose or the inhibition of glycolysis pathway

(Barbonetti et al., 2010). Furthermore, the glucose substrate-free medium incubation for 30 min, mouse sperm was non-motile indicating that glycolysis was essentially acquired for mouse sperm motility (Mukai and Okuno, 2004). In domestic cat, the glucose uptake: lactate production ratio in the normospermic cats (mean of sperm motility index: 80) was ~60% higher than teratospermic cats (mean of sperm motility index: 66) supporting the previous studies in horse, human and mouse on the crucial role of glucose uptake in sperm flagella movement (Terrell et al., 2010). To study the effects of AMPK and sperm fertilizing ability, the homologous IVF by AMPK activated-sperm was investigated in the present study.

Fertilization process is generally known as a sequence of molecular events merging between male and female gamete cells (sperm and oocyte). In male, several process has been involved i.e. sperm motility, hyperactivation, acrosomal capacitation and reaction as well as the other molecular events occurred during sperm-oocyte penetration process; the elevation of the intracellular pH and calcium levels or membrane potential hyperpolarization (Georgadaki et al., 2016). However, the most common and important sperm characteristics correlated with fertility is sperm motility (Hirano et al., 2001). The previous study in at least 130 of *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) cycles in human presented that proportion of sperm motility and two sperm velocity parameters (VCL and VSL) before swim-up process positively correlated with fertilization rate (cleavage stage) which could represent the good indicator of the fertilization outcome (Hirano et al., 2001). Furthermore, the metabolic peculiarity by pyruvate-glycolysis enhanced ATP production was revealed to be vital for human and murine sperm under high energy phase of vigorous flagella movement, sperm capacitation, hyperactivation, tyrosine phosphorylation leading to the success of fertilization process ((Travis et al., 2001; Hereng et al., 2011). Hence, these previous informative data could be supportive for our present findings on the influence of AMPK-AICAR regulation pathway to fertilizing ability.

1 In conclusion, the present study principally points to the regulatory kinase role of
2 AMPK in the domestic cat sperm with the presence of high proportion of pleomorphism, as
3 research model for the endangered wild felid species and the infertile patients. Our research
4 team gradually revealed I) the AMPK expression in the domestic cat sperm II) the AMPK
5 activation pathway regarding to the intracellular energy production and III) the AMPK
6 regulatory kinase effects on sperm quality. The major findings suggested that the AMPK
7 activity could be considered one of male cat gamete cell regulators i.e. sperm which will be
8 the worthwhile influence of fertilizing ability in the endangered wild felids and the infertile
9 patients.

11 **5. Conflict of interest**

12 None

14 **6. Acknowledgements**

15 The present study was financially supported by The Thailand Research Fund (Contract No.
16 MRG 5980231), Faculty of Veterinary Science and Faculty of Medicine, Chulalongkorn
17 University, Bangkok, Thailand. The authors are thankful for Dr. Em-Orn Olanrattamanee for
18 statistical analysis.

20 **7. References**

21 Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. 2013. Mitochondria functionality and
22 sperm quality. *Reproduction*. 146(5):R163-74.

1 Axnér E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm
2 morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod*
3 *Sci.*84:179-91.

4 Barbonetti A, Vassallo MR, Fortunato D, Francavilla S, Maccarrone M, Francavilla F. 2010.
5 Energetic metabolism and human sperm motility: impact of CB₁ receptor activation.
6 *Endocrinology.*151(12):5882-92.

7 Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, Dupont J, Froment P. 2015.
8 Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in murine oocytes
9 alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. *PLoS*
10 *One.*13;10(3):e0119680.

11 Castro V, Skowronska M, Lombardi J, He J, Seth N, Velichkovska M, Toborek M. 2018.
12 Occludin regulates glucose uptake and ATP production in pericytes by influencing
13 AMP-activated protein kinase activity. *J Cereb Blood Flow Metab.*38(2):317-332.

14 Calle-Guisado V, de Llera AH, Martin-Hidalgo D, Mijares J, Gil MC, Alvarez IS, Bragado
15 MJ, Garcia-Marin LJ. 2017. AMP-activated kinase in human spermatozoa:
16 identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm
17 motility. *Asian J Androl.*19(6):707-14.

18 Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide
19 ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in
20 intact cells? *Eur J Biochem.*15;229(2):558-65.

21 Cura AJ, Carruthers A. 2012. AMP kinase regulation of sugar transport in brain capillary
22 endothelial cells during acute metabolic stress. *Am J Physiol Cell Physiol.*
23 15;303(8):C806-14.

- 1 Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. 2000. Characterization of AMP-
2 activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding.
3 Biochem J.15;346 Pt 3:659-69.
- 4 Donohoe PH1, West TG, Boutilier RG. 2000. Factors affecting membrane permeability and
5 ionic homeostasis in the cold-submerged frog. J Exp Biol.203(Pt 2):405-14.
- 6 Gaidhu MP, Fediuc S, Ceddia RB. 2006. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-
7 ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal
8 and insulin-stimulated glucose uptake, lipid synthesis, and fatty acid oxidation in
9 isolated rat adipocytes. J Biol Chem.281(36):25956-64.
- 10 Gaidhu MP, Fediuc S, Anthony NM, So M, Mirpourian M, Perry RL, Ceddia RB. 2009.
11 Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in
12 white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. J Lipid Res.
13 50(4):704-15.
- 14 Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. 2007. The AMP-activated
15 protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-b-D-ribonucleoside,
16 regulates lactate production in rat Sertoli cells. J Mol Endocrinol.39(4):279-88.
- 17 Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. 2016. The molecular basis of
18 fertilization (Review). Int J Mol Med.38(4):979-86.
- 19 Hereng TH, Elgstøen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR.
20 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human
21 spermatozoa. Hum Reprod.26(12):3249-63.
- 22 Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato
23 I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the

1 computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. J Assist
2 Reprod Genet.18(4):213-8.

3 Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. 2012. AMP-
4 activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility.
5 PLoS One.7(6):e38840.

6 Ido Y, Duranton A, Lan F, Cacicedo JM, Chen TC, Breton L, Ruderman NB. 2012. Acute
7 activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature
8 senescence in primary human keratinocytes. PLoS One.7(4):e35092.

9 Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L, Hue L. 2002. The stimulation of glycolysis by hypoxia in
10 activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-
11 phosphofructo-2-kinase. J Biol Chem. 23;277(34):30778-83.

12 Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate
13 supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol Reprod. 71:540-47.

14 Nestle E, Graves-Herring J, Keefer C, Comizzoli P, 2012. Source of protein supplementation
15 during in vitro culture does not affect the quality of resulting blastocysts in the
16 domestic cat. Reprod Domest Anim Suppl 6:152-55.

17 Nguyen TM, Seigneurin F, Froment P, Combarnous Y, Blesbois E. 2015. The 5'-AMP-
18 Activated Protein Kinase (AMPK) Is Involved in the Augmentation of Antioxidant
19 Defenses in Cryopreserved Chicken Sperm. PLoS One. 29;10(7):e0134420.

20 Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L,
21 Macías García B. 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and
22 pathology: a review. Reprod Domest Anim.44(2):345-9.

- 1 Plaza Davila M, Martin Muñoz P, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva C C, Peña
2 FJ. 2015. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and
3 Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced ATP
4 Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility.
5 PLoS One. 10(9):e0138777.
- 6 Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of equex STM
7 paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38
8 degrees C. Theriogenology.47:1093-101.
- 9 Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Enríquez JA. 2007. The role of the
10 mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is
11 this a purely glycolytic process? (Review). Curr Top Dev Biol.77:3-19.
- 12 Singer D, Bretschneider HJ. 1990. Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological
13 problems and natural examples--Part 1. Thorac Cardiovasc Surg.38(4):205-11.
- 14 Shabani Nashtaei M, Nekoonam S, Naji M, Bakhshalizadeh S, Amidi F. 2017.
15 Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm
16 messenger RNAs, possibly through 5' AMP-activated protein kinase activation. Cell
17 Tissue Bank. Jul 26. doi: 10.1007/s10561-017-9642-5.
- 18 Swegen A, Lambourne SR, Aitken RJ, Gibb Z. 2016. Rosiglitazone improves stallion sperm
19 motility, ATP content, and mitochondrial function. Biol Reprod. 95(5):107;1-12.
- 20 Tartarin P, Guibert E, Touré A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, Brière S, Dacheux JL, Delaleu
21 B, McNeilly JR, McNeilly AS, Brillard JP, Dupont J, Foretz M, Viollet B, Froment P.
22 2012. Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa
23 morphology. Endocrinology.153(7):3468-81.

1 Terrell KA, Wildt DE, Anthony NM, Bavister BD, Leibo SP, Penfold LM, Marker LL,
 2 Crosier AE. 2010. Evidence for compromised metabolic function and limited glucose
 3 uptake in spermatozoa from the teratospermic domestic cat (*Felis catus*) and cheetah
 4 (*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod.* 83(5):833-41.

5 Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DM, Morrice NA, McCarthy A,
 6 Galardo MN, Meroni SB, Cigorruga SB, Ashworth A, Sakamoto K, Hardie DG. 2008.
 7 A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for
 8 spermiogenesis. *Biochem J.* 416(1):1-14.

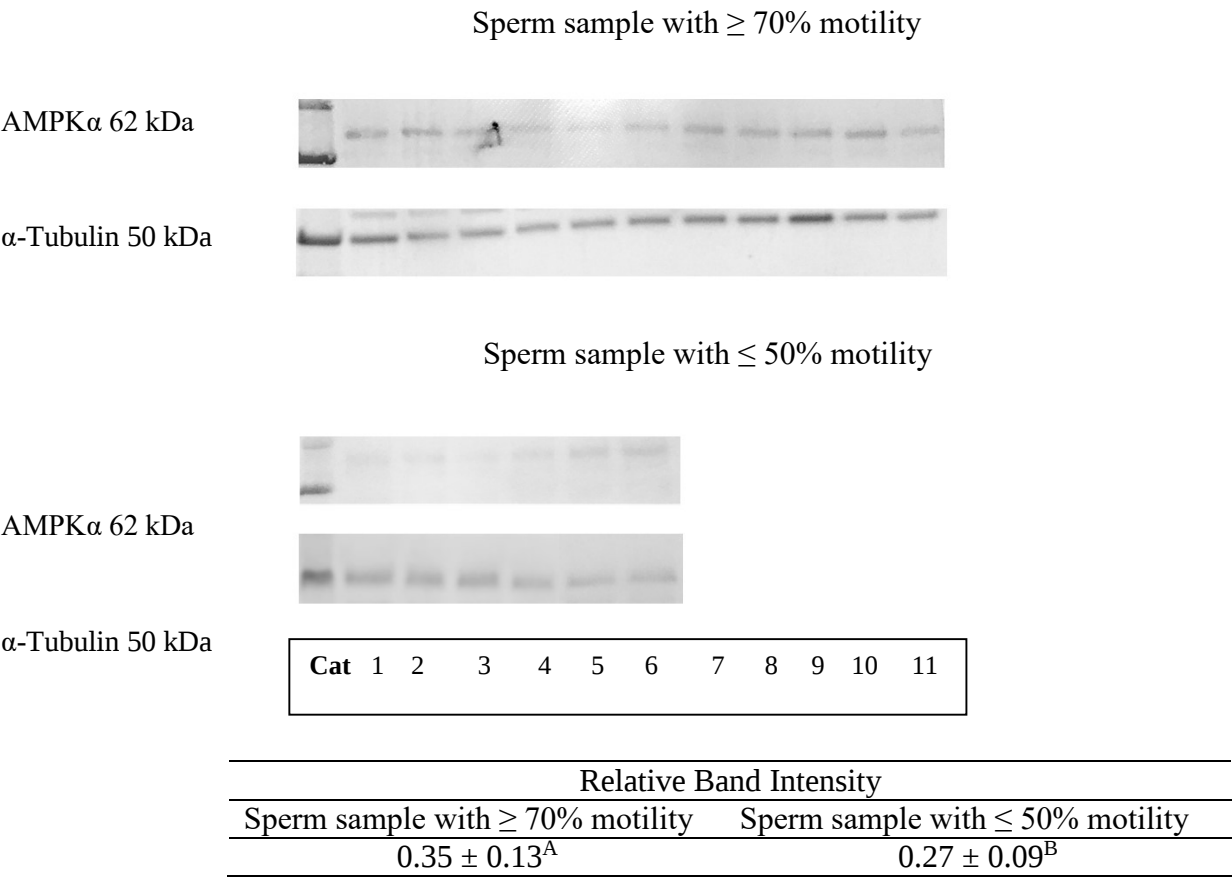
9 Travis AJ, Jorgez CJ, Merdushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf
 10 GS, Moss SB. 2001. Functional relationships between capacitation-dependent cell
 11 signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol*
 12 *Chem.* 276(10):7630-6.

13 Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, Bergqvist AS, Söderquist L, Axné E. 2010.
 14 Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative
 15 enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology.* 73(8):
 16 1076-87.

17 Thuwanut P, Chatdarong K, Bergqvist AS, Söderquist L, Thiangtum K, Tongthainan D,
 18 Axné E. 2011. The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing
 19 ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*).
 20 *Theriogenology.* 76(1):115-25.

21 Thuwanut P, Arya N, Comizzoli P, Chatdarong K. 2015. Effect of extracellular adenosine 5'-
 22 triphosphate on cryopreserved epididymal cat sperm intracellular ATP concentration,
 23 sperm quality, and in vitro fertilizing ability. *Theriogenology.* 84(5):702-9.

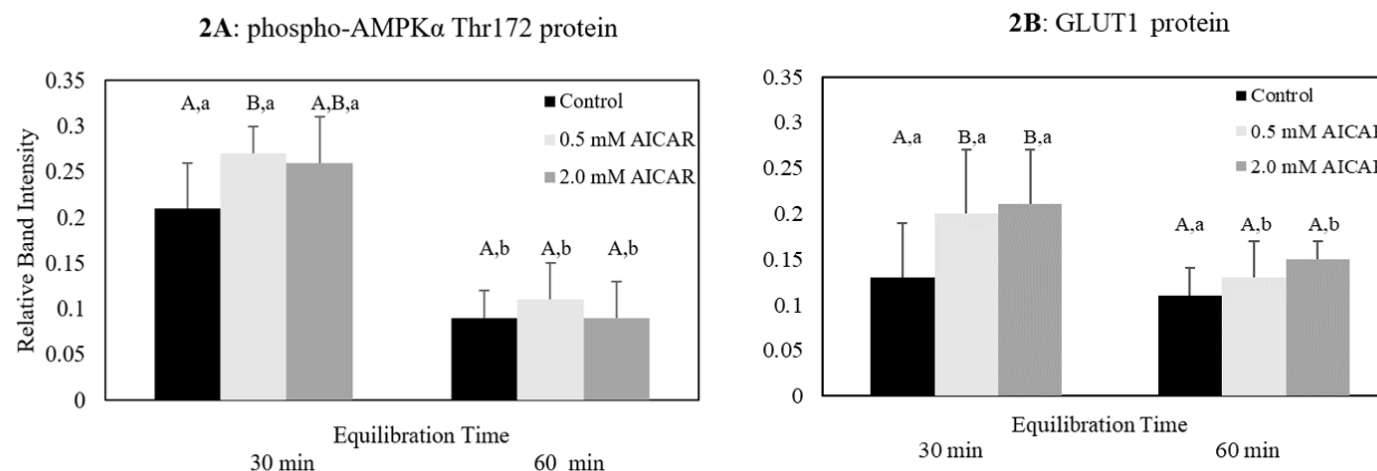
1 **Figure 1.** Western blot analysis of AMPK α protein in fresh epididymal cat sperm (sperm sample with $\geq 70\%$ motility: n = 11; sperm sample
 2 with $\leq 50\%$ motility: n = 6)



7

8 * Different letters indicate the statistical difference of the data in the same row ($P \leq 0.05$).

1 **Figure 2.** Relative band intensity of phospho-AMPK α Thr172 protein (n =6; 2A) and GLUT1 protein (n = 6; 2B) in epididymal cat sperm
2 equilibrated with AICAR (0.5 and 2.0 mM) for 30 and 60 min before cryopreservation process (mean $\pm$ SD)



3
4 * Capital letters indicate the statistical difference of the data in each sample group during the same equilibration time whereas small letters
5 indicate the difference between equilibration time ($P \leq 0.05$).

Table 1. Intracellular ATP level extracted from cold stored and frozen-thaw epididymal cat sperm under various concentrations (0.5 and 2.0 mM) of AICAR condition and cold storage time (group I: 30 min and II: 60 min). Mean $\pm$ SD. n=10.

Intracellular ATP level ($\mu\text{g}/1 \times 10^6$ sperm)			
Time	Control	AICAR 0.5 mM	AICAR 2.0 mM
Before freezing			
30 min	$0.09 \pm 0.02^{A,a}$	$0.18 \pm 0.03^{B,a}$	$0.17 \pm 0.05^{B,a}$
60 min	$0.08 \pm 0.03^{A,a}$	$0.15 \pm 0.04^{B,a}$	$0.11 \pm 0.03^{A,B,a}$
After thawing			
30 min	$0.05 \pm 0.009^{A,a}$	$0.11 \pm 0.03^{B,a}$	$0.09 \pm 0.02^{B,a}$
60 min	$0.04 \pm 0.01^{A,a}$	$0.07 \pm 0.03^{A,a}$	$0.08 \pm 0.04^{A,,a}$

* Capital letters indicate the statistical difference of the data in the same row whereas small letters indicate the difference between column ($P \leq 0.05$).

Table 2. Proportion of motile sperm, score of progressive motility and percentage of membrane integrity in fresh, cold stored and frozen-thawed epididymal cat sperm under various concentrations (0.5, 2.0 and 5.0 mM) of AICAR condition and cold storage time (group I: 30 min and II: 60 min). Mean $\pm$ SD. n=10.

Sperm quality parameter	Time group	Fresh	Control	AICAR 0.5 mM	AICAR 2.0 mM	AICAR 5.0 mM
Subjective motility (%)	Before freezing	74.0 $\pm$ 5.4 ^A				
	Group I:30 min		68.0 $\pm$ 4.5 ^{A,B,a}	71.0 $\pm$ 4.2 ^{A,B,a}	68.0 $\pm$ 4.5 ^{A,B,a}	63.0 $\pm$ 5.0 ^{B,a}
	Group II:60 min		67.0 $\pm$ 9.7 ^{A,a}	65.0 $\pm$ 7.1 ^{A,B,a}	57.0 $\pm$ 3.3 ^{B,b}	46.0 $\pm$ 5.5 ^{C,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		59.3 $\pm$ 2.1 ^{A,a}	65.6 $\pm$ 3.2 ^{B,a}	60.2 $\pm$ 3.9 ^{A,B,a}	50.3 $\pm$ 2.4 ^{C,a}
	Group II:60 min		56.5 $\pm$ 4.2 ^{A,a}	59.7 $\pm$ 2.9 ^{A,b}	50.1 $\pm$ 4.5 ^{B,b}	40.7 $\pm$ 4.9 ^{C,b}
Score of progressive motility	Before freezing	3.8 $\pm$ 0.4 ^A				
	Group I:30 min		3.9 $\pm$ 0.2 ^{A,a}	3.8 $\pm$ 0.3 ^{A,a}	3.6 $\pm$ 0.5 ^{A,a}	3.4 $\pm$ 0.5 ^{A,a}
	Group II:60 min		3.5 $\pm$ 0.4 ^{A,a}	3.5 $\pm$ 0.4 ^{A,a}	2.9 $\pm$ 0.2 ^{B,b}	3.0 $\pm$ 0.3 ^{B,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		3.1 $\pm$ 0.3 ^{A,B,a}	3.2 $\pm$ 0.2 ^{A,a}	3.2 $\pm$ 0.1 ^{A,a}	2.8 $\pm$ 0.3 ^{B,a}
	Group II:60 min		3.0 $\pm$ 0.2 ^{A,a}	3.1 $\pm$ 0.1 ^{A,a}	2.5 $\pm$ 0.3 ^{B,b}	2.4 $\pm$ 0.2 ^{B,b}
Membrane integrity (%)	Before freezing	72.2 $\pm$ 3.9 ^A				
	Group I:30 min		66.5 $\pm$ 1.9 ^{A,a}	66.4 $\pm$ 4.7 ^{A,a}	64.5 $\pm$ 1.8 ^{A,a}	56.8 $\pm$ 9.0 ^{B,a}
	Group II:60 min		60.3 $\pm$ 2.3 ^{B,b}	60.1 $\pm$ 6.2 ^{B,b}	59.5 $\pm$ 3.7 ^{B,b}	52.9 $\pm$ 2.9 ^{C,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		57.7 $\pm$ 3.3 ^{A,a}	59.1 $\pm$ 5.4 ^{A,a}	56.6 $\pm$ 2.9 ^{A,a}	49.4 $\pm$ 5.6 ^{B,a}
	Group II:60 min		52.5 $\pm$ 2.8 ^{A,b}	50.2 $\pm$ 3.2 ^{A,b}	50.2 $\pm$ 1.7 ^{A,b}	44.3 $\pm$ 4.3 ^{B,a}

* Capital letters indicate the statistical difference of the data in the same row whereas small letters indicate the difference between column ($P \leq 0.05$).

1 ** Sperm quality from fresh samples was statistically compared with sperm samples that were equilibrated prior to cryopreservation process.

2

3 **Table 3.** Percentage of acrosome integrity, acrosome reaction and high mitochondrial membrane potential in fresh, cold stored and frozen-thaw
4 epididymal cat sperm under various concentrations (0.5, 2.0 and 5.0 mM) of AICAR condition and cold storage time (group I: 30 min and II: 60
5 min). Mean $\pm$ SD. n=10.

Sperm quality parameter	Time group	Fresh	Control	AICAR 0.5 mM	AICAR 2.0 mM	AICAR 5.0 mM
Acrosome integrity (%)	Before freezing	66.4 $\pm$ 7.2 ^A				
	Group I:30 min		54.0 $\pm$ 4.6 ^{B,C,a}	55.6 $\pm$ 2.6 ^{B,C,a}	50.6 $\pm$ 6.3 ^{C,a}	46.6 $\pm$ 7.2 ^{C,a}
	Group II:60 min		55.7 $\pm$ 2.2 ^{B,C,a}	50.5 $\pm$ 4.6 ^{C,a}	51.1 $\pm$ 4.1 ^{C,a}	41.0 $\pm$ 4.8 ^{D,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		46.4 $\pm$ 3.1 ^{A,B,a}	49.5 $\pm$ 4.4 ^{B,a}	43.7 $\pm$ 5.6 ^{A,C,a}	40.1 $\pm$ 3.8 ^{C,a}
	Group II:60 min		43.1 $\pm$ 5.2 ^{A,a}	43.2 $\pm$ 2.9 ^{A,b}	42.9 $\pm$ 4.9 ^{A,a}	37.8 $\pm$ 1.5 ^{B,a}
Acrosome reaction (%)	Before freezing	24.2 $\pm$ 5.2 ^A				
	Group I:30 min		32.4 $\pm$ 3.8 ^{A,B,a}	38.3 $\pm$ 5.1 ^{B,a}	36.7 $\pm$ 6.6 ^{A,a}	45.4 $\pm$ 6.2 ^{C,a}
	Group II:60 min		38.2 $\pm$ 3.7 ^{B,b}	40.2 $\pm$ 3.9 ^{B,a}	37.9 $\pm$ 3.1 ^{B,a}	45.6 $\pm$ 6.2 ^{C,a}
	After thawing					
	Group I:30 min		37.5 $\pm$ 4.4 ^{A,a}	41.2 $\pm$ 4.9 ^{A,B,a}	39.6 $\pm$ 5.8 ^{A,a}	45.3 $\pm$ 1.5 ^{B,a}
	Group II:60 min		45.8 $\pm$ 3.7 ^{A,b}	47.3 $\pm$ 5.6 ^{A,b}	40.4 $\pm$ 2.3 ^{B,a}	49.9 $\pm$ 4.7 ^{A,a}
Mitochondrial membrane potential (%)	Before freezing	67.6 $\pm$ 3.9 ^A				
	Group I:30 min		62.8 $\pm$ 2.6 ^{A,a}	63.4 $\pm$ 4.5 ^{A,a}	55.2 $\pm$ 4.1 ^{B,a}	51.6 $\pm$ 4.4 ^{B,a}
	Group II:60 min		54.1 $\pm$ 2.7 ^{B,b}	55.8 $\pm$ 4.0 ^{B,b}	53.5 $\pm$ 4.5 ^{B,a}	47.3 $\pm$ 4.5 ^{C,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		53.7 $\pm$ 3.7 ^{A,a}	55.8 $\pm$ 5.3 ^{A,a}	50.1 $\pm$ 3.9 ^{A,a}	44.1 $\pm$ 4.2 ^{B,a}
	Group II:60 min		49.8 $\pm$ 2.2 ^{A,a}	51.1 $\pm$ 4.6 ^{A,a}	49.5 $\pm$ 4.8 ^{A,a}	41.3 $\pm$ 5.1 ^{B,a}

6

* Capital letters indicate the statistical difference of the data in the same row whereas small letters indicate the difference between column ($P \leq 0.05$).

** Sperm quality from fresh samples was statistically compared with sperm samples that were equilibrated prior to cryopreservation process.

4

Table 4. Sperm motility patterns (SCA program analysis) in fresh, cold stored and frozen-thaw epididymal cat sperm under various concentrations (0.5, 2.0 and 5.0 mM) of AICAR condition and cold storage time (group I: 30 min and II: 60 min). Mean $\pm$ SD. n=10.

Sperm quality parameter	Time group	Fresh	Control	AICAR 0.5 mM	AICAR 2.0 mM	AICAR 5.0 mM
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Before freezing	69.3 $\pm$ 5.5 ^A				
	Group I:30 min		68.1 $\pm$ 13.3 ^{A,a}	70.9 $\pm$ 10.7 ^{A,a}	66.5 $\pm$ 9.4 ^{A,a}	57.3 $\pm$ 17.1 ^{B,a}
	Group II:60 min		60.3 $\pm$ 2.9 ^{B,b}	71.5 $\pm$ 2.1 ^{A,a}	58.1 $\pm$ 0.7 ^{B,b}	49.5 $\pm$ 2.3 ^{C,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		58.2 $\pm$ 2.2 ^{A,a}	65.7 $\pm$ 4.4 ^{B,a}	61.3 $\pm$ 9.1 ^{A,B,a}	48.7 $\pm$ 11.2 ^{B,a}
	Group II:60 min		57.4 $\pm$ 4.9 ^{A,a}	64.3 $\pm$ 5.1 ^{B,a}	54.4 $\pm$ 8.3 ^{A,a}	44.1 $\pm$ 6.6 ^{C,a}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	Before freezing	36.1 $\pm$ 5.1 ^A				
	Group I:30 min		39.1 $\pm$ 6.5 ^{A,a}	40.2 $\pm$ 6.1 ^{A,a}	34.3 $\pm$ 3.4 ^{A,a}	32.5 $\pm$ 6.7 ^{A,a}
	Group II:60 min		35.9 $\pm$ 1.1 ^{A,a}	34.8 $\pm$ 2.8 ^{A,a}	33.9 $\pm$ 1.6 ^{A,a}	25.2 $\pm$ 4.5 ^{B,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		30.7 $\pm$ 7.8 ^{A,B,a}	32.9 $\pm$ 6.2 ^{A,a}	29.6 $\pm$ 4.1 ^{A,B,a}	27.5 $\pm$ 3.8 ^{B,a}
	Group II:60 min		31.1 $\pm$ 5.8 ^{A,a}	29.2 $\pm$ 4.5 ^{A,a}	28.4 $\pm$ 6.7 ^{A,a}	22.6 $\pm$ 5.9 ^{B,a}
VSL ($\mu\text{m/s}$)	Before freezing	48.3 $\pm$ 2.6 ^A				
	Group I:30 min		46.3 $\pm$ 3.7 ^{A,a}	47.3 $\pm$ 4.0 ^{A,a}	44.8 $\pm$ 2.6 ^{A,a}	41.2 $\pm$ 1.1 ^{B,a}
	Group II:60 min		44.9 $\pm$ 3.4 ^{A,a}	48.1 $\pm$ 2.2 ^{A,a}	38.8 $\pm$ 3.1 ^{B,b}	35.4 $\pm$ 3.7 ^{B,b}
	After thawing					
	Group I:30 min		38.2 $\pm$ 2.2 ^{A,a}	43.9 $\pm$ 2.1 ^{B,a}	39.3 $\pm$ 3.6 ^{A,B,a}	34.8 $\pm$ 5.7 ^{B,a}

	Group II:60 min	39.1 ± 3.8 ^{A,a}	42.9 ± 3.4 ^{A,a}	34.7 ± 4.4 ^{B,a}	30.8 ± 6.9 ^{B,a}
ALH (µm)	Before freezing	2.3 ± 0.9 ^A			
	Group I:30 min	2.5 ± 0.7 ^{A,a}	2.7 ± 0.7 ^{A,a}	2.8 ± 0.6 ^{A,a}	3.1 ± 0.7 ^{B,a}
	Group II:60 min	3.3 ± 0.4 ^{B,a}	3.3 ± 0.7 ^{B,a}	2.9 ± 0.5 ^{A,a}	3.3 ± 0.5 ^{B,a}
	After thawing				
	Group I:30 min	2.6 ± 0.3 ^{A,a}	2.7 ± 0.9 ^{A,a}	3.1 ± 0.7 ^{A,a}	3.3 ± 0.4 ^{A,a}
	Group II:60 min	3.5 ± 0.6 ^{A,b}	3.0 ± 0.8 ^{A,a}	3.0 ± 0.3 ^{A,a}	3.7 ± 0.6 ^{A,a}

* Capital letters indicate the statistical difference of the data in the same row whereas small letters indicate the difference between column (P ≤ 0.05).

** Sperm quality from fresh samples was statistically compared with sperm samples that were equilibrated prior to cryopreservation process.

Table 5. Percent stage of embryo development (cleavage rate) after homologous *in vitro* fertilization (homologous IVF) with frozen-thaw epididymal cat sperm (Group I: 30 min and Group II: 60 min cold-storage before cryopreservation without or with various concentrations; 0.5 and 2.0 mM of AICAR). Mean ± SD. n=10.

		Cleavage rate		
Time	Number of oocytes	Control	AICAR 0.5 mM	AICAR 2.0 mM
Group I:30 min	261	61.1 ± 3.1 ^A	68.6 ± 2.2 ^B	60.3 ± 4.4 ^A
GroupII:60 min	252	58.3 ± 4.2 ^A	67.4 ± 3.2 ^B	58.4 ± 3.7 ^A

Different letters indicate the statistical difference of the data in the same row (P ≤ 0.05).