

Ảnh hưởng của phospholipase C zeta (PLC ζ) đến khả năng thụ tinh và cải thiện kỹ thuật hỗ trợ sinh sản trên người

Nguyễn Thanh Bình^{1,2*}, Ngô Thái Minh Quân², Dương Thị Phương Thanh²

¹Khoa Y Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn On, phường Phú Hòa, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

²Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/10/2021; ngày chuyển phản biện 1/11/2021; ngày nhận phản biện 25/11/2021; ngày chấp nhận đăng 2/12/2021

Tóm tắt:

Sự hình thành sóng dao động nồng độ Ca^{2+} nội bào (Ca^{2+} oscillations) dẫn đến quá trình hoạt hóa noãn và chuẩn bị cho sự hình thành các giai đoạn sớm của phôi. Phospholipase C zeta (PLC ζ) đóng vai trò quan trọng đối với khả năng thụ tinh. Những báo cáo lâm sàng cho thấy, có mối liên hệ giữa PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh ở nam giới. Đặc biệt, thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn (OAD) được đề cập là nguyên nhân gây thất bại của nhiều trường hợp điều trị vô sinh bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Một số kết quả về các tiến bộ trong nghiên cứu và ứng dụng lâm sàng được phân tích tổng hợp trong bài viết này: PLC ζ - yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng, cấu trúc của PLC ζ , kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng, PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh nam, ứng dụng lâm sàng của PLC ζ trong điều trị và cải tiến quy trình thụ tinh trên người. Đồng thời, các tác giả tổng kết và phân tích các kết quả nghiên cứu và ứng dụng hỗ trợ cho quá trình điều trị hiếm muộn trên cơ sở cải tiến về tinh trùng qua yếu tố PLC ζ - tinh trùng. Bên cạnh đó, thảo luận hướng sử dụng PLC ζ nhằm giúp cho các nhà phôi học, lâm sàng, nghiên cứu viên cải tiến quy trình tạo phôi, mang lại kết quả tốt nhất cho bệnh nhân, đặc biệt trong trường hợp phôi hiếm.

Từ khóa: hoạt hóa noãn, kỹ thuật hỗ trợ sinh sản, phospholipase C zeta, sự thụ tinh, tinh trùng.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Ở người và động vật có vú, thụ tinh là một quá trình bao gồm nhiều giai đoạn liên kết, mang ý nghĩa sự kết hợp của tinh trùng với noãn sẽ tạo ra cá thể sinh vật mới. Khi một giai đoạn bất kỳ bị gián đoạn, quá trình thụ tinh sẽ có nguy cơ thất bại [1]. Thuật ngữ “sự hoạt hóa noãn” biểu đạt giai đoạn diễn ra các sự kiện sinh hóa để noãn phát triển thành phôi sau khi 2 giao tử kết hợp [2]. Sự kiện phát tín hiệu đầu tiên và vô cùng quan trọng ở giai đoạn hoạt hóa noãn là hiện tượng gia tăng nồng độ ion canxi (Ca^{2+}) nội bào nhanh chóng rồi tạo thành sóng dao động [2]. Để đáp ứng thay đổi đột ngột về nồng độ Ca^{2+} , các sự kiện sinh hóa xảy ra nhằm chuẩn bị cho giai đoạn phát triển phôi sớm [2, 3]. Hiện tại, PLC ζ trong tinh trùng được ủng hộ mạnh mẽ là yếu tố tạo ra sóng dao động Ca^{2+} nội bào và khởi động giai đoạn hoạt hóa noãn. Các nghiên cứu nổi bật đã đề cập PLC ζ tạo ra sóng dao động Ca^{2+} thông qua con đường tín hiệu inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) [3, 4].

Theo ước tính, cứ 7 cặp vợ chồng sẽ có 1 cặp mắc phải tình trạng hiếm muộn [1]. Các trường hợp vô sinh ở nam giới được đánh giá ngày càng tăng cao khi khoảng 15% cặp vợ chồng gặp khó khăn về sinh sản thì tỷ lệ nam giới mắc vô sinh là khoảng 7% [3, 4]. Việc sử dụng các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (ART) như thụ tinh nhân tạo (IVF) đã mang lại kết quả khả quan cho những cặp vợ chồng hiếm muộn. Dù vậy, vẫn còn nhiều trường hợp chưa điều trị thành công, đáng chú ý, vô sinh nam rất nặng chiếm 19-57% số trường hợp trên [2-4]. Đối với các bệnh nhân nam có rất ít

tinh trùng hoặc tinh trùng rất yếu hay dị dạng nặng, kỹ thuật ICSI được sử dụng để tiêm trực tiếp tinh trùng chọn lọc vào bào tương noãn. Tuy nhiên, 1-5% các chu kỳ điều trị ICSI vẫn thất bại [1, 4]. Nguyên nhân chính cản trở điều trị vô sinh bằng ICSI là do thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn dẫn đến thụ tinh thất bại [1-4].

Mặc dù còn các yếu tố từ noãn hoặc tự nhiên khác cũng có khả năng gây thụ tinh thất bại sau khi ICSI, nhưng PLC ζ trong tinh trùng là yếu tố thường được quan tâm, vì trong các ca bệnh, noãn kết hợp với tinh trùng không chứa hoặc chứa PLC ζ bị khiếm khuyết thì sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng không xuất hiện để khởi động sự hoạt hóa noãn [1, 4].

Trong phần tổng hợp về vai trò quan trọng của PLC ζ trong thụ tinh, chúng tôi sẽ phân tích và tổng hợp mối liên hệ giữa các dạng PLC ζ bị khiếm khuyết và những trường hợp vô sinh nam. Bên cạnh đó, chúng tôi thảo luận hướng sử dụng những cơ sở khoa học vào việc nghiên cứu PLC ζ cũng như cách ứng dụng chất này để tiếp cận các tiến bộ nhằm cải tiến trong nghiên cứu và thực hành lâm sàng, cải thiện tỷ lệ thụ tinh bằng các kỹ thuật ART.

2. Các tiến bộ trong nghiên cứu

2.1. PLC ζ - yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng

Trong thụ tinh ở người và động vật có vú, tinh trùng có một chức năng quan trọng là hoạt hóa noãn [1]. Sau khi 2 giao tử kết hợp, một sự gia tăng nồng độ Ca^{2+} xuất hiện trong tế bào chất của noãn [2]. Hiện tượng này tạo ra các tín hiệu kích hoạt

*Tác giả liên hệ: Email: binhnt.bmmophoi@pnt.edu.vn

A review: Phospholipase C zeta (PLC ζ) impacts fertilisation and improves human-assisted reproductive technology

Thanh Binh Nguyen^{1,2*}, Thai Minh Quan Ngo²,
Thi Phuong Thanh Duong²

¹Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University,
6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

²Pham Ngoc Thach University of Medicine,
2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 25 October 2021; revised 25 November 2021; accepted 2 December 2021

Abstract:

The change of concentration of intracellular Ca^{2+} oscillations leads to oocyte activation and preparation for early embryogenesis. Phospholipase C zeta (PLC ζ) plays an essential role in fertilisation. Clinical reports have suggested a link between defective PLC ζ and male infertility. In particular, oocyte activation deficiency was mentioned as the cause of failure in many cases of infertility treated with intracytoplasmic sperm injection. Some results about advances in research and clinical applications were reviewed in this article, including PLC ζ - Sperm oocyte activating factor, the structure of PLC ζ , localisation of PLC ζ in sperm, defective PLC ζ and relation to male infertility, and clinical applications of PLC ζ in treatment and improvement of human insemination procedures. At the same time, the authors summarised and analysed research results and applications to support infertility treatment on the basis of sperm improvement through PLC ζ - sperm factor. Finally, the authors discussed the direction of using PLC ζ to help embryologists, clinicians, and researchers improve the embryogenesis process, with the aim to bring the best results for patients, especially in the case of rare embryos.

Keywords: assisted reproductive technology, fertilisation, oocyte activation, phospholipase C zeta, sperm.

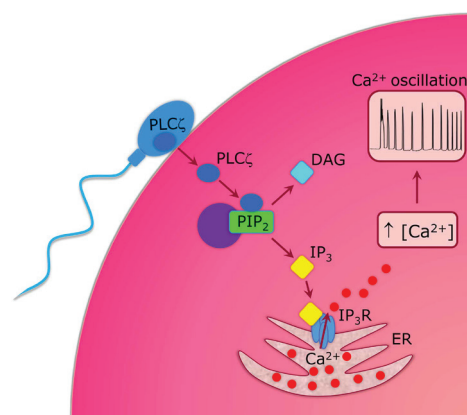
Classification number: 3.1

chuỗi sự kiện trong giai đoạn hoạt hóa noãn như sự xuất bào tế bào hạt để ngăn đa thụ tinh, kế tiếp là sự hoàn thành giảm phân và hình thành các tiền nhân [2]. Quá trình theo dõi cho thấy, tín hiệu Ca^{2+} khởi động sự hoạt hóa noãn có tính chu kỳ và tạo thành một chuỗi bước sóng lặp lại nên được gọi là sóng dao động Ca^{2+} . Thời gian xuất hiện và tần số của sóng dao động Ca^{2+} có tính đặc trưng riêng cho từng loài khác nhau [1, 4].

Trong quá khứ, một số giả thuyết đã được đưa ra để giải thích nguyên nhân xuất hiện sóng dao động Ca^{2+} khi thụ tinh. Theo thời gian, các giả thuyết dần bị bác bỏ nhưng một giả

thuyết gọi là “yếu tố từ tinh trùng” vẫn được ủng hộ nhờ vào các thử nghiệm trên mô hình động vật [1]. Giả thuyết này giải thích một yếu tố có tính hòa tan trong phần đầu tinh trùng được đưa vào tế bào chất của noãn ngay hoặc sau khi 2 giao tử kết hợp [1, 3]. Yếu tố từ tinh trùng được đề xuất có khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} thông qua hình thành IP_3 từ sự thủy phân phosphatidylinositol 4,5- biphosphate (PIP_2). Sự tạo thành sóng dao động Ca^{2+} theo con đường tín hiệu IP_3 làm xuất hiện đề xuất yếu tố từ tinh trùng là một isoform thuộc nhóm enzyme phospholipase C (PLC) [1].

Năm 2002, dựa trên việc tìm kiếm tính tương đồng với các trình tự mã hóa những PLC isoform đã biết trong cơ sở dữ liệu của chuột nhắt, các nhà khoa học đã phân lập thành công cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) của PLC isoform mới [1, 3, 5]. PLC isoform được phát hiện là PLC ζ . Enzyme này được đề xuất là yếu tố từ tinh trùng chịu trách nhiệm hoạt hóa noãn sau khi nhóm tác giả thực hiện vi tiêm cRNA (Complementary ribonucleic acid) mã hóa PLC ζ vào noãn của chuột nhắt và ghi nhận có sóng dao động Ca^{2+} trong tế bào chất. Mặt khác, tần số của sóng dao động Ca^{2+} đã được chứng minh là tăng lên khi thêm lượng cRNA vi tiêm, ngược lại, sự gia tăng Ca^{2+} nội bào cũng được chứng minh là không xảy ra nếu sử dụng chất ức chế quá trình tổng hợp PLC isoform mới. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu cũng cho thấy noãn của chuột nhắt có thể hình thành các tiền nhân và phát triển đến giai đoạn blastocyst sau khi tiêm cRNA mã hóa PLC ζ [1, 3, 5]. Hiện tại, cơ chế hoạt động của PLC ζ để tạo ra sóng dao động Ca^{2+} đã được đề xuất và có tính phổ biến trong các báo cáo độc lập. Sau khi tinh trùng kết hợp với noãn, PLC ζ được giải phóng từ phần đầu tinh trùng vào tế bào chất của noãn. Enzyme đặc hiệu cho tinh trùng định vị các màng túi nội bào có chứa PIP_2 và thủy phân cơ chất này. Phản ứng xúc tác của PLC ζ tạo ra các chất truyền tin thứ 2 là IP_3 và diacylglycerol (DAG). IP_3 tiếp tục gắn với thụ thể (IP_3R) trên màng lưới nội chất (ER), sự tương tác này khiến kênh ion mở ra và giải phóng Ca^{2+} từ lưới nội chất ra tế bào chất của noãn. Tập hợp các đợt gia tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào tạo thành sóng dao động và đây cũng là tín hiệu để sự hoạt hóa noãn khởi động (hình 1) [2-4].

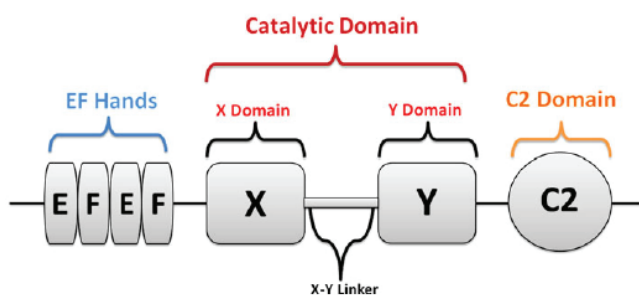


Hình 1. Biểu đồ biểu diễn PLC ζ khởi động sự hoạt hóa noãn [2].

Cấu trúc của PLC ζ

PLC ζ có khả năng tạo sóng dao động Ca^{2+} vượt trội nhưng enzyme này vẫn có hầu hết các loại miền cấu trúc cơ bản như những PLC isoform khác [2, 3]. Điểm khác biệt nổi bật về thành phần cấu trúc của PLC ζ là sự vắng mặt miền PH (Pleckstrin homology) [2, 3]. Ngoài ra, PLC ζ là isoform nhỏ nhất ở các loài, với của người, kích thước là khoảng 70 kDa [4, 6].

Thành phần cấu trúc của PLC ζ bao gồm 4 miền EF-hand ở đầu tận cùng N, 1 miền C2 ở đầu tận cùng C. Ở giữa phân tử là miền xúc tác X và Y cùng liên kết X-Y (hình 2). Các miền cấu trúc của PLC ζ đều có vai trò thiết yếu riêng, giúp enzyme này thực hiện chức năng sinh học và có chế độ điều hòa đặc biệt [2, 3].



Hình 2. Sơ đồ biểu diễn các miền cấu trúc của PLC ζ [6].

Mỗi miền EF-hand có 2 chuỗi xoắn alpha và 1 vòng lặp. Chức năng của các chuỗi này là gắn với các Ca^{2+} , vì thế độ nhạy cảm cao của PLC ζ đối với Ca^{2+} phụ thuộc vào vai trò của các miền EF-hand [1-3]. Khác với các isoform còn lại trong nhóm PLC, độ nhạy cảm cao đối với Ca^{2+} cho phép PLC ζ vẫn hoạt động trong tế bào chất có nồng độ Ca^{2+} thấp. Ngoài ra, miền EF-hand đầu tiên có chứa một số gốc amino acid đặc biệt, cùng với liên kết X-Y, các thành phần cấu trúc này hỗ trợ PLC ζ tương tác với các màng chứa cơ chất PIP_2 [1-3].

Miền X và Y là 2 thành phần cấu trúc thể hiện khả năng xúc tác của PLC ζ . Các miền xúc tác đóng vai trò giúp PLC ζ thực hiện phản ứng thủy phân PIP_2 . Đối với tất cả PLC isoform thuộc động vật có vú, X và Y là các miền được bảo tồn cao nhất. Tuy sự giống nhau về trình tự giữa các miền xúc tác của PLC ζ với các miền xúc tác của PLC isoform khác đạt đến 60% nhưng nếu thay thế 2 miền X và Y (kèm liên kết X-Y) của PLC ζ bằng 2 miền tương ứng của PLC isoform khác thì khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} trong noãn chuột nhắt bị mất đi [1-3].

Khác với 2 miền xúc tác, liên kết X-Y là một đoạn trình tự ngắn có độ bảo tồn thấp. Liên kết X-Y có nhiều vai trò quan trọng khi tham gia hỗ trợ khả năng điều hòa hoạt tính xúc tác và khả năng di chuyển qua lỗ nhân của PLC ζ . Bên cạnh đó, liên kết X-Y chứa các gốc amino acid mang điện tích dương, giúp làm tăng khả năng định vị cơ chất PIP_2 và tạo tương tác tĩnh điện giữa PLC ζ với các màng nội bào [1-3].

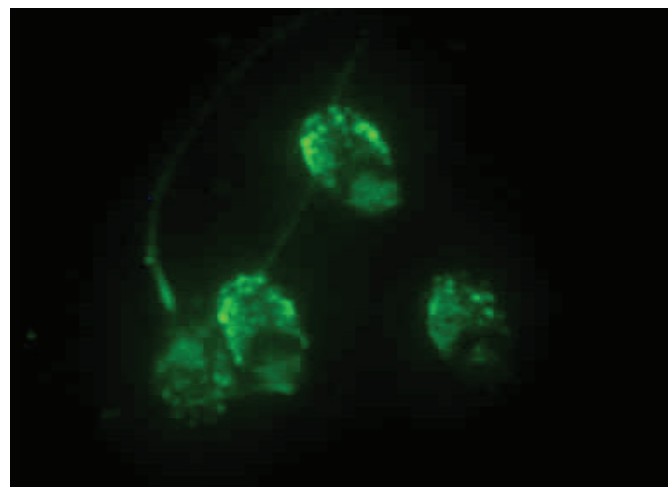
Số lượng amino acid của miền C2 gồm khoảng 120 gốc đơn vị. Dù vai trò chính của miền C2 vẫn chưa được kết luận, nhưng

miền này được cho là có ảnh hưởng mạnh đến chức năng khởi động sự hoạt hóa noãn của PLC ζ . Vì khi xóa bỏ hoặc thay thế miền C2 của PLC ζ với C2 của PLC $\delta 1$ thì khả năng tạo ra sóng dao động Ca^{2+} của PLC ζ bị mất, nhưng hoạt tính xúc tác và độ nhạy cảm với Ca^{2+} là không đổi. Sau khi phát hiện miền C2 có tương tác với phospholipid trên màng sinh chất như phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) hay phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P), đã có nhận xét cho rằng miền C2 có thể đóng vai trò hỗ trợ PLC ζ định vị màng chứa cơ chất hoặc miền này có thể tham gia vào sự điều hòa hoạt tính của PLC ζ [1-3].

2.3. Sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng

Kết quả phân tích sinh học phân tử trong báo cáo phát hiện PLC ζ cho thấy, mRNA mã hóa PLC ζ và sự biểu hiện của PLC ζ lần lượt cho phản ứng ở tinh hoàn và tinh trùng của chuột nhắt [5]. Các kết quả phân tích tương tự ở lợn và ngựa sau đó cho thấy, sự tổng hợp PLC ζ có tính đặc hiệu cho từng loài và liên quan đến quá trình sinh tinh của động vật có vú nói chung [3, 6]. Đến nay, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang đã được sử dụng rộng rãi để xác định kiểu khu trú (hay sự định vị) của PLC ζ trong tinh trùng của các loài, đặc biệt là trong tinh trùng của người [3, 4].

PLC ζ được xác định phổ biến nhất ở các vùng khác nhau thuộc phần đầu tinh trùng, điều này có thể lý giải chức năng của PLC ζ được thể hiện ngay lập tức hoặc không quá lâu sau khi 2 giao tử kết hợp [1, 3]. Ngoài ra, một số báo cáo ghi nhận tín hiệu hiển thị của PLC ζ có ở phần thân và đuôi tinh trùng [1, 3]. Đối với chuột nhắt, các báo cáo đạt thống nhất khi đều xác định PLC ζ có ở các vị trí trong vùng acrosome và thuộc phần đầu tinh trùng. Tuy nhiên, đối với tinh trùng của người và động vật có vú khác, các vị trí tạo thành kiểu khu trú đặc trưng của PLC ζ vẫn đang gây tranh cãi. Theo một loạt các báo cáo độc lập, PLC ζ trong tinh trùng của người từng được ghi nhận phân bố trong vùng acrosome, post-acrosome, đoạn xích đạo (equatorial segment) và cả phần đuôi [1, 3, 4, 6]. Trong tinh trùng đầu tròn của một số bệnh nhân vô sinh, PLC ζ được xác định phân bố ở đoạn midpiece thuộc phần thân và có một số tín hiệu hiển thị ở phần đầu [3, 7].



Hình 3. Sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng lợn được phát hiện bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

Hình 3 thể hiện sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng lợn được phát hiện bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang.

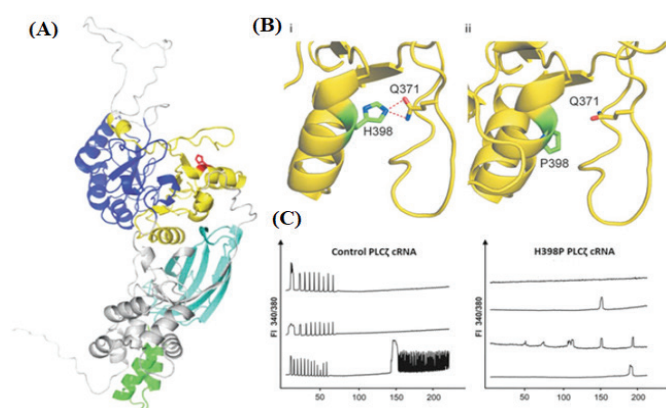
PLC ζ được tìm thấy có mặt ở đầu tinh trùng, trong acrosome và post-acrosome (20X10). Cần lưu ý sự mâu thuẫn giữa những kết quả nghiên cứu về kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của người vì các báo cáo ghi nhận chỉ một loại kháng thể được sử dụng [1, 3, 4]. Có khả năng mỗi nghiên cứu thực hiện các protocol khác nhau hoặc sử dụng các kháng thể đa dòng có tính đặc hiệu thấp là nguyên nhân gây ra mâu thuẫn về sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng. Từ vấn đề này, các kháng thể đa dòng có tính đặc hiệu cao với epitope trong PLC ζ của người và động vật có vú đã được phát triển và tạo ra hy vọng về việc các báo cáo nơi phân bố của PLC ζ trong tinh trùng, đặc biệt là của người sẽ có tính thống nhất hơn [1, 3, 4]. Tiêu biểu cho cải tiến phương pháp nghiên cứu, J. Kashir và cs (2017, 2020) [4, 8] đã kết hợp protocol antigen unmasking (AUM) với kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang để xác định và tăng cường khả năng hiển thị kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của người, lợn và chuột nhắt.

2.4. PLC ζ bị khiếm khuyết và vô sinh nam

Đã có những bằng chứng khoa học cho thấy, hàm lượng và trạng thái của PLC ζ mang ý nghĩa quyết định tinh trùng kích hoạt noãn thành công. Khi đánh giá những trường hợp vô sinh nam, các dạng PLC ζ bị khiếm khuyết thường được đề cập với tinh trùng có tính chất sinh lý và sinh hóa bất thường [1, 3, 4].

Tinh trùng của một số bệnh nhân điều trị ICSI thất bại đã được Yoon và cs (2008) [9] tiêm vào noãn của chuột nhắt, nhưng kết quả không có sự xuất hiện của sóng dao động Ca^{2+} . Bên cạnh việc không tìm thấy sự hiện diện của PLC ζ trong tinh trùng của các bệnh nhân, nhóm tác giả báo cáo PLC ζ có mức độ biểu hiện rất thấp hoặc không biểu hiện khi thực hiện phân tích định lượng.

Lần đầu tiên trình tự mã hóa PLC ζ bị khiếm khuyết được xác định là khi các nhà khoa học phát hiện một đột biến dị hợp tử ở một bệnh nhân nam có tinh trùng không thể kích hoạt noãn bình thường sau khi ICSI [1, 3, 10]. Bằng cách mô hình hóa cấu trúc của PLC ζ , nhóm tác giả mô tả đột biến này làm Histidine ở vị trí 389 thuộc miền xúc tác Y bị thay thế thành Proline (H389P) (hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của đột biến H389P đến PLC ζ [10]. (A) Mô hình 3D mô tả các miền cấu trúc của PLC ζ ; **(B)** Đột biến trên trình tự mã hóa PLC ζ làm Histidine ở vị trí 389 thuộc miền xúc tác Y bị thay thế thành Proline; **(C)** Tín hiệu Ca^{2+} trong noãn chuột sau khi vi tiêm cRNA mã hóa PLC ζ và cRNA mã hóa PLC ζ bị khiếm khuyết do đột biến.

Không lâu sau đó, Saleh và cs (2020) [3] và J. Kashir và cs (2012b) [11] đã báo cáo đột biến dị hợp tử thứ hai được di truyền theo dòng mẹ ở cùng bệnh nhân trên. Kết quả giải trình tự cho thấy, đột biến này xuất hiện tại trình tự khung đọc mở (ORF) và làm Histidine tại vị trí 233 thuộc miền xúc tác X bị thay thế thành Leucine (H233L). Giống như đột biến H389P, amino acid tại vị trí xảy ra sự thay thế do đột biến H233L cũng mất đi các liên kết với amino acid bên cạnh (hình 4). Mặt khác, khi thử nghiệm trên noãn của chuột nhắt, các PLC ζ được mã hóa từ cRNA mang 2 đột biến trên không cho thấy khả năng hoạt hóa noãn. Nguyên nhân ảnh hưởng đến chức năng sinh học của PLC ζ là do 2 đột biến làm xuất hiện các sự thay thế trên miền xúc tác X và Y, hậu quả là cấu trúc của enzyme bị phá vỡ dẫn đến hoạt tính thủy phân PIP_2 bị suy giảm và không thể tạo sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng [1, 3, 11].

Đột biến đồng hợp tử ở trình tự mã hóa PLC ζ được báo cáo từ một nghiên cứu về trường hợp 2 anh em cùng bị vô sinh và tinh trùng của họ không thể thụ tinh sau khi ICSI [1, 3, 12]. Đột biến này làm Isoleucine ở vị trí 489 trên miền C2 bị thay thế thành Phenylalanine (I489F). Kết quả từ nghiên cứu cho thấy, PLC ζ bị ảnh hưởng bởi đột biến I489F tạo ra sóng dao động Ca^{2+} bất thường, vì thế giai đoạn hoạt hóa noãn bị lỗi dẫn đến các giai đoạn phát triển sớm của phôi bị dừng lại. Nghiên cứu cũng xác nhận không có mối liên hệ nào giữa trường hợp vô sinh trên và PAWP - 1 protein khác cũng được đề xuất là yếu tố hoạt hóa noãn từ tinh trùng, qua đó góp phần làm bằng chứng ủng hộ vai trò đặc biệt quan trọng của PLC ζ trong thụ tinh [1, 3, 12].

Trong một báo cáo gần đây [4], số lượng đột biến trên trình tự mã hóa PLC ζ được phát hiện nhiều hơn ở các nghiên cứu độc lập. Phần lớn các đột biến xuất hiện ở những bệnh nhân nam có tinh trùng không chứa hoặc chứa rất ít hàm lượng PLC ζ và họ được chẩn đoán vô sinh do mắc phải tình trạng không có hoặc có sự hoạt hóa noãn lỗi dẫn đến thụ tinh thất bại. Phân tích ở mức độ phân tử đã giải thích các đột biến làm xuất hiện những thay đổi tiêu cực trên các miền cấu trúc như mất đi một đoạn hoặc cả miền, khiến vai trò thiết yếu của các miền này đối với chức năng và sự điều hòa hoạt động của PLC ζ bị ảnh hưởng. Ở một số trường hợp vô sinh nam khác, mức độ liên hệ đáng kể được thể hiện giữa hàm lượng, sự phân bố bất thường của PLC ζ và các tình trạng ảnh hưởng xấu đến sinh sản như phân mảnh DNA tinh trùng hoặc chỉ số xét nghiệm tinh dịch đồ có giá trị thấp [4].

3. Ứng dụng lâm sàng của PLC ζ

3.1. Phương pháp điều trị thiếu hụt hoạt hóa noãn

Ở một số quốc gia đang phát triển, ART làm tăng tỷ lệ sinh lên khoảng 7% nên những cặp vợ chồng hiếm muộn thường tìm kiếm sự giúp đỡ ở các cơ sở hỗ trợ sinh sản [4, 13]. Để khắc phục tình trạng các chu kỳ điều trị ICSI thất bại do thiếu hụt hoạt hóa noãn, những phương pháp hoạt hóa noãn nhân tạo (AOA) đã được sử dụng trong các phòng khám thụ tinh nhân tạo [1, 4, 13]. Thực tế, phương pháp AOA sử dụng hóa chất được xem là áp dụng thành công ở các trường hợp thụ tinh thất bại do không thể khởi động sự hoạt hóa noãn bình thường. Với phương pháp AOA này, noãn được xử lý bằng các hóa chất như calcium ionophore A23187,

ionomycin, purimycin, strontium chloride để làm tăng nồng độ Ca^{2+} bên trong tế bào chất [1, 4, 13]. Tuy nhiên, độ an toàn khi sử dụng phương pháp này tạo ra nỗi lo lắng cho người thực hiện và người điều trị. Sự hoài nghi về việc liệu phôi và trẻ em sẽ phát triển khỏe mạnh không là dễ hiểu khi các yếu tố hóa học có thể tiềm ẩn khả năng gây độc tế bào, gây đột biến hoặc gây quái thai [1, 6]. Mặc dù một số báo cáo đã nhận xét việc kết hợp phương pháp AOA này và kỹ thuật ICSI không gây ảnh hưởng xấu lên noãn, thậm chí còn cải thiện đáng kể tỷ lệ thụ tinh và sinh nhưng việc kết hợp này vẫn được báo cáo là không áp dụng thành công ở tất cả các trường hợp gặp khó khăn về hoạt hóa noãn [1, 3, 13]. Bên cạnh đó, tính hiệu quả của phương pháp AOA sử dụng hóa chất cũng không đạt tuyệt đối khi calcium ionophore và strontium chloride không tạo ra sóng dao động Ca^{2+} mang tính sinh lý đặc trưng như trong sự hoạt hóa noãn bình thường [1, 3].

Để bổ sung cho những khía cạnh còn gây tranh cãi của phương pháp AOA sử dụng hóa chất, PLC ζ tái tổ hợp của người (hPLC ζ) là chất đầy tiềm năng cho các phương pháp điều trị lâm sàng ở những trường hợp xảy ra thiếu hụt hoạt hóa noãn [1, 3, 4]. Hơn một thập kỷ qua, việc sản xuất hPLC ζ tinh khiết và mang hoạt tính cao đã đạt thành tựu nhất định [3]. Năm 2013, M. Nomikos và cs (2013) [14] đã sản xuất thành công hPLC ζ và chứng minh sản phẩm này có thể tạo ra sóng dao động Ca^{2+} đặc trưng trong noãn chuột nhắt và noãn người. Nhóm tác giả cũng đã chứng minh hPLC ζ có khả năng khắc phục sự hoạt hóa noãn bị lỗi do đột biến và giúp sự phát triển phôi tiếp tục tiến đến giai đoạn blastocyst [14]. Trong một báo cáo [15] nhằm đánh giá hiệu quả cải thiện tỷ lệ thụ tinh và sự phát triển phôi đối với noãn đã ICSI kết hợp xử lý nhiệt, phương pháp vi tiêm hPLC ζ vào noãn đã được so sánh với phương pháp xử lý noãn bằng calcium ionophores. Kết quả cho thấy, cả 2 phương pháp đều cải thiện sự hoạt hóa noãn nhưng hPLC ζ được đánh giá có tính hiệu quả cao hơn calcium ionophores.

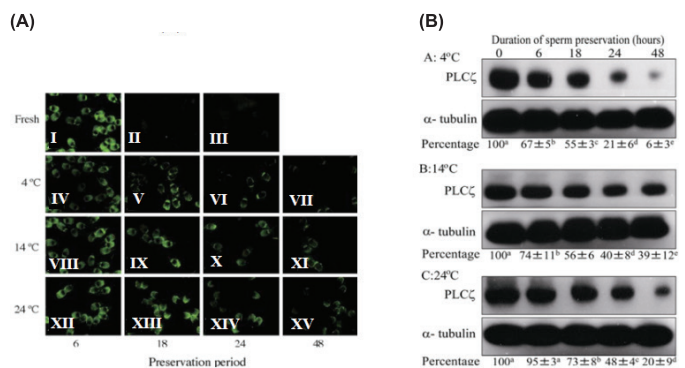
3.2. Dấu ấn sinh học

Tiềm năng sử dụng PLC ζ như một dấu ấn sinh học đã được thể hiện trong các nghiên cứu về phân tích và đánh giá hình thái cùng chức năng của tinh trùng ở người. PLC ζ đã làm dấu ấn biểu hiện trong một nghiên cứu áp dụng kỹ thuật đánh giá hình thái tinh trùng đi động (MSOME) trên các tinh trùng đầu tròn [7]. Các kết quả phân tích định lượng đối với tinh trùng đã được xử lý bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cho thấy, tổng hàm lượng của PLC ζ biểu hiện trong tinh trùng đầu tròn được và không được lựa chọn bởi MSOME có sự khác biệt đáng kể [4, 7]. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu còn cho biết, việc lựa chọn tinh trùng đầu tròn có sự biểu hiện của PLC ζ bằng MSOME có thể tác động đến hiệu quả điều trị của một ART khác là kỹ thuật tiêm tinh trùng có chọn lọc (IMSI). Theo đó, MSOME có thể lựa chọn những tinh trùng đầu tròn có hàm lượng PLC ζ đủ để kích hoạt noãn, khi những tinh trùng này được sử dụng trong IMSI thì tỷ lệ thụ tinh được cải thiện mà không cần áp dụng phương pháp AOA sử dụng hóa chất [7].

Trong một báo cáo, J. Kashir và cs (2013) [16] đã trình bày kết quả phân tích định lượng huỳnh quang đối với PLC ζ trong tinh trùng của những người đàn ông có khả năng sinh sản bình thường và những bệnh nhân nam điều trị ICSI thất bại do thiếu hụt yếu tố hoạt hóa noãn. Cụ thể, tỷ lệ trung bình của tinh trùng khỏe mạnh có sự biểu hiện của PLC ζ (82,6%) cao hơn tỷ lệ trung bình của tinh trùng có sự biểu hiện PLC ζ ở những bệnh nhân (27,4%) ($p \leq 0,05$). Trong một báo cáo khác, S. Yelumalai và cs (2015) [17] nhận xét có tương quan đồng biến giữa tỷ lệ thụ tinh sau ICSI với tổng hàm lượng của PLC ζ , kiểu khu trú của PLC ζ và tỷ lệ tinh trùng dùng để điều trị ICSI có sự biểu hiện của PLC ζ . Việc phân tích và đánh giá các biến định lượng của PLC ζ trong các báo cáo trên cho thấy, enzyme này có thể thực hiện vai trò như một dấu ấn sinh học để tiên lượng tỷ lệ thụ tinh của những bệnh nhân điều trị ICSI [1, 3, 4].

Trước đây, chúng tôi đã sử dụng PLC ζ như một dấu ấn sinh học để đánh giá sự ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản tinh trùng bằng hóa chất lỏng đến khả năng hoạt hóa noãn và khởi động sự phát triển phôi sớm [18]. Để thực hiện mục tiêu nghiên cứu, chúng tôi tiến hành bảo quản tinh trùng của lợn trong hóa chất ở các nhiệt độ 4, 14 và 24°C với thời gian bảo quản tối đa là 48 giờ. Bằng cách sử dụng các chất nhuộm huỳnh quang, chúng tôi nhận thấy màng sinh chất bao quanh khu vực acrosome và post-acrosome của tinh trùng dần bị phá hủy nếu kéo dài thời gian bảo quản. Chúng tôi cũng đã xác định kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của lợn là khu vực acrosome và khu vực post-acrosome. Đáng chú ý, cường độ tín hiệu huỳnh quang hiển thị kiểu khu trú của PLC ζ và hàm lượng PLC ζ trong tinh trùng được bảo quản ở các mức nhiệt độ đều bị suy giảm theo các mức độ khác nhau khi tăng thời gian bảo quản (hình 5).

Sau khi sử dụng các tinh trùng đã bảo quản để thực hiện ICSI, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ hoạt hóa noãn, tỷ lệ hình thành tiền nhân được, tỷ lệ phát triển phôi đến giai đoạn blastocyst đạt giá trị cao nhất đối với trường hợp tinh trùng được bảo quản ở 24°C trong 18 giờ. Như vậy, chúng tôi kết luận rằng, việc bảo quản tinh trùng của lợn bằng hóa chất lỏng trong điều kiện thích hợp sẽ phá hủy màng sinh chất của tinh trùng, phóng thích nhanh hàm lượng PLC ζ vừa đủ để hoạt hóa noãn và cải thiện sự phát triển phôi sau khi ICSI [18].



Hình 5. Kiểu khu trú của PLC ζ trong tinh trùng của lợn sau khi bảo quản ở nhiệt độ theo thời gian (A) và ảnh hưởng của hàm lượng PLC ζ đến kết quả thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi nang sau khi ICSI (B) [18].

4. Kết luận

Khi giai đoạn hoạt hóa noãn không thể diễn ra theo cách tự nhiên do yếu tố khởi động bị khiếm khuyết thì các phương pháp tạo sóng dao động Ca^{2+} nhân tạo có thể được xem xét sử dụng để khắc phục vấn đề. Việc chưa có bất kỳ nghiên cứu nào trong nước hoặc quốc tế chứng minh xử lý noãn bằng hóa chất sẽ có hại cho phôi và các thể hệ trẻ em sinh ra là tín hiệu đáng mừng cho các cặp vợ chồng có ý định điều trị hiếm muộn bằng phương pháp AOA này. Trong khi chờ đợi những nghiên cứu đánh giá toàn diện hơn về tính hiệu quả và độ an toàn của các phương pháp AOA, một giải pháp tiềm năng khác cho các trường hợp mắc hoạt hóa noãn là sử dụng hPLC ζ như công cụ hỗ trợ điều trị lâm sàng. Tuy nhiên, bên cạnh kế hoạch ứng dụng hPLC ζ từ mô hình thí nghiệm đến việc sử dụng rộng rãi trong các cơ sở hỗ trợ sinh sản, quá trình nghiên cứu hPLC ζ cần được thực hiện cẩn thận hơn nhằm loại bỏ các khả năng gây hại cho tế bào hay phôi.

Việc sử dụng PLC ζ như một dấu ấn sinh học chẩn đoán mang tính khả thi cao vì các phương pháp phân tích định lượng chất này thường chỉ yêu cầu áp dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang. Bằng cách sử dụng PLC ζ như một công cụ tiên lượng tỷ lệ hoạt hóa noãn, tỷ lệ thụ tinh, phát triển phôi, các quy trình ART như ICSI sẽ được thiết kế và thực hiện hợp lý hơn, từ đó tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc điều trị các trường hợp vô sinh nam. Hơn thế nữa, sự so sánh kết quả phân tích PLC ζ với tinh dịch đồ có thể dùng để đánh giá sức khỏe tinh trùng của cả nam giới khỏe mạnh và vô sinh.

Khả năng tạo Ca^{2+} vượt trội trong noãn nhưng lại không thể hiện bất kỳ hoạt tính xúc tác nào trong tinh trùng đã đặt ra câu hỏi liệu trong tinh trùng có chất ức chế hoạt động của PLC ζ hoặc có tồn tại một yếu tố chưa được biết từ noãn có thể tương tác với PLC ζ và cùng tham gia khởi động sự hoạt hóa noãn trong thụ tinh? Rõ ràng, những thành tựu về sinh học phân tử, sinh học tế bào, sinh học sinh sản cần được áp dụng đối với các nghiên cứu về PLC ζ trong tương lai vì việc khám phá enzyme này không chỉ có ý nghĩa bổ sung những hiểu biết về sự thụ tinh của động vật có vú mà còn thể hiện các tiến bộ lớn trong nghiên cứu và thực hành lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Nomikos, K. Swann, F.A. Lai (2017), "Fundamental role for sperm phospholipase C ζ at mammalian fertilization", *The Sperm Cell*, Cambridge University Press, **12**, pp.177-192.
- [2] M. Nomikos, J. Kashir, F.A. Lai (2017), "The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation", *Biochemical Journal*, **474**(21), pp.3659-3673, DOI: 10.1042/BCJ20160521.
- [3] A. Saleh, J. Kashir, A. Thanassoulas, et al. (2020), "Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: An update", *Frontier in Cell and Developmental Biology*, **8**(28), DOI: 10.3389/fcell.2020.00028.
- [4] J. Kashir (2020), "Increasing associations between defects in phospholipase C zeta and conditions of male infertility: Not just ICSI failure?", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **37**(6), pp.1273- 1293, DOI: 10.1007/s10815-020-01748-z.

- [5] C.M. Saunders, M.G. Larman, J. Parrington, et al. (2002), "PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development", *Development*, **129**(15), pp.3533-3544, DOI: 10.1242/dev.129.15.3533.
- [6] W.M. Ramadan, J. Kashir, C. Jones, et al. (2012), "Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): Diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology", *Cell Communication and Signaling*, **10**(12), DOI: 10.1186/1478-811X-10-12.
- [7] J. Kashir, N. Sermondade, C. Sifer, et al. (2012a), "Motile sperm organelle morphology evaluation-selected globozoospermic human sperm with an acrosomal bud exhibits novel patterns and higher levels of phospholipase C zeta", *Human Reproduction*, **27**(11), pp.3150-3160, DOI: 10.1093/humrep/der312.
- [8] J. Kashir, L. Buntwal, M. Nomikos, et al. (2017), "Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm", *Molecular Human Reproduction*, **23**(1), pp.54-67, DOI: 10.1093/molehr/gaw073.
- [9] S.Y. Yoon, T. Jellerette, A.M. Salicioni, et al. (2008), "Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development", *The Journal of Clinical Investigation*, **118**(11), pp.3671-3681, DOI: 10.1172/JCI36942.
- [10] E. Heytens, J. Parrington, K. Coward, et al. (2009), "Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men", *Human Reproduction*, **24**(10), pp.2417-2428, DOI: 10.1093/humrep/dep207.
- [11] J. Kashir, M. Konstantinidis, C. Jones, et al. (2012b), "A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility", *Human Reproduction*, **27**(1), pp.222-231, DOI: 10.1093/humrep/der384.
- [12] J. Escoffier, H.C. Lee, S. Yassine, et al. (2016), "Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP", *Human Molecular Genetics*, **25**(5), pp.878-891, DOI: 10.1093/hmg/ddv617.
- [13] N.T.T. Lan, M.C.M. Tam, T.T.T. Binh, et al. (2011), "Oocyte activation with calcium ionophore after sperm injection into the oocyte cytoplasm", *Medical News*, **66**(11), pp.3-6 (in Vietnamese).
- [14] M. Nomikos, Y. Yu, K. Elgmati, et al. (2013), "Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility", *Fertility and Sterility*, **99**(1), pp.76-85, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.035.
- [15] R. Sanusi, Y. Yu, M. Nomikos, et al. (2015), "Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ ", *Molecular Human Reproduction*, **21**(10), pp.783-791, DOI: 10.1093/molehr/gav042.
- [16] J. Kashir, C. Jones, G. Mounce, et al. (2013), "Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability", *Fertility and Sterility*, **99**(1), pp.107-117, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.001.
- [17] S. Yelumalai, M. Yeste, C. Jones, et al. (2015), "Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and Sterility*, **104**(3), pp.561-568, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.018.
- [18] N.T. Binh, N.V. Thuan, M. Miyake (2009), "Effects of liquid preservation of sperm on their ability to activate oocytes and initiate preimplantational development after intracytoplasmic sperm injection in the pig", *Theriogenology*, **71**(9), pp.1440-1450, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.018.