ผลของฮอร์โมนคอร์ติซอลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส ในโคเพศผู้

Effects of Cortisol Hormone on Hypothalamic *kiss1* Gene Expression in Bulls

นภสภรณ์ วรรณพงษ์ (Napasaporn Wannapong)* นรุตม์ ทะนานทอง (Narut Thanantong)**
สมชัย สัจจาพิทักษ์ (Somchai Sajapitak)***

บทคัดย่อ

ยีน *kiss1* ในสมองส่วนไฮโปธาลามัสผลิตโปรตีนที่เรียกว่า Kisspeptin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำงานของระบบสืบพันธุ์ การศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนคอร์ติซอลจากภาวะเครียดต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ในโค (*Bos taurus*) เก็บตัวอย่างซีรั่มและสมองไฮโปธาลามัสจากโคเพศผู้ที่จำนวน 5 ตัว ที่ถูกขนส่งมายังโรงฆ่าสัตว์ ซีรั่มใช้เพื่อวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลก่อนเชือด และสมองไฮโปธาลามัสใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *kiss1* ด้วยวิธี In situ hybridization ผลการศึกษาพบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลในโคแต่ละตัวก่อนเข้าเชือดมีความแตกต่าง มีโคจำนวน 3 ตัวที่ระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลสูงขึ้นในระดับภาวะเครียดและมีโค 2 ตัวที่อยู่ในระดับพื้นฐาน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับยีน *kiss1* mRNA expression cells พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากการแสดงออกของยีน *kiss1* นั้นมีปัจจัยทั้งภาวะสมดุลพลังงานในร่างกาย และการทำงานควบคุมย้อนกลับของฮอร์โมนเพศ ดังนั้นในการศึกษาลักษณะนี้ในอนาคตควรควบคุมปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ร่วมด้วย

ABSTRACT

Hypothalamic *kiss1* gene is encoded for Kisspeptin that plays an important role in mammalian reproductive system. The aim this study was to examine the effect of cortisol from stress on hypothalamic *kiss1* gene expression in bull (*Bos taurus*). In this study, we collected samples from five bulls which were transported to slaughterhouse, including serum for measuring cortisol level and hypothalamus brain for evaluating *kiss1* gene expression using In Situ Hybridization. The result of this study revealed that the levels of cortisol were varied among bulls at before slaughtering. Three bulls in this study possessed high cortisol levels similar to those of bulls under stress condition. While two other bulls showed a baseline level of cortisol. Surprisingly, the correlation between cortisol and *kiss1* mRNA-positive cells was not observed in this study. Future study should control factors that can regulate *kiss1* gene function such as body energy balance and sex steroid hormone feedback regulation as the effects of expression of the *kiss1* gene in this experiment might be interfered by these factors

คำสำคัญ: คิสเปปติน ยีนคิสวัน ภาวะเครียด ฮอร์โมนคอร์ติซอล

Keywords: Kisspeptin, *kiss1* gene, Stress, Cortisol

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
*** อาจารย์ ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

บทนำ

การเลี้ยงโคเป็นอาชีพที่สำคัญสำหรับเกษตรกรไทย ซึ่งการที่โคจะมีผลผลิตที่ดีนั้น มาจากความสมบูรณ์พันธุ์ทั้งในพ่อโคและแม่โคซึ่งในระบบสืบพันธุ์จะถูกควบคุมจากสมองส่วนไฮโปธาลามัสและต่อมใต้สมอง (hypothalamo pituitary gonadal axis: HPG axis) ภายในสมองส่วนไฮโปธาลามัสมีเซลล์ประสาทที่สังเคราะห์นิวโรเพปไทด์ (neuropeptide) ชนิดหนึ่งเรียกว่า Kisspeptin โดยแปลรหัสจากยีน *kiss1* และเรียกเซลล์ประสาทที่ผลิตนิวโรเพปไทด์นี้ว่าเซลล์ประสาท Kisspeptin เช่นกัน นิวโรเพปไทด์ Kisspeptin นี้มีตัวรับที่ชื่อว่า G protein coupled receptor (GPR54) หรือ *kiss1* receptor (Ohtaki et al., 2001) นิวโรเพปไทด์ Kisspeptin ที่ถูกหลั่งออกมาจะไปควบคุมการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง (gonadotropin releasing hormone: GnRH) เพื่อควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ผ่านทาง HPG axis โดยกลุ่มเซลล์ประสาท Kisspeptin จะพบอยู่สองบริเวณหลักในสมองส่วนไฮโปธาลามัส บริเวณแรก คือ Anteroventral periventricular nucleus (AVPV) เป็นกลุ่มนิวเคลียสของเซลล์ประสาททางด้านหน้าของสมองส่วนไฮโปธาลามัส และบริเวณที่สอง คือ Arcuate nucleus (ARC) เป็นนิวเคลียสส่วนท้ายของสมองส่วนไฮโปธาลามัส (de Tassigny, Colledge, 2010)

การศึกษาการทำงานของเซลล์ประสาท Kisspeptin ของเพศผู้และเมียในหนูทดลอง พบว่าในสมองไฮโปธาลามัส ที่บริเวณ AVPV ในเพศเมียมีเซลล์ประสาท Kisspeptin มากกว่าเพศผู้ ซึ่งเป็นส่วนที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน GnRH และ ฮอร์โมนลูทิไนซิง (luteinizing hormone: LH) ให้หลั่งในลักษณะแบบ surge เป็นผลให้เกิดการตกไข่ (ovulation) ในเพศเมีย ซึ่งในเพศผู้จะไม่พบการหลั่งฮอร์โมนเพศแบบ surge (Kauffman et al., 2007) เซลล์ประสาท Kisspeptin ที่บริเวณ ARC จะควบคุมการหลั่งฮอร์โมน GnRH และ LH ให้หลั่งในลักษณะ pulse ทำให้เกิดการพัฒนาของรังไข่ในเพศเมียและอัณฑะในเพศผู้ และการสร้างฮอร์โมนเพศ (gonadal hormone) (de Tassigny, Colledge, 2010)

ภาวะเครียดในการเลี้ยงโคเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อผลผลิตและความสมบูรณ์พันธุ์ เมื่อมีภาวะเครียดจะไปกระตุ้น การทำงานของสมองส่วนไฮโปธาลามัส ต่อมใต้สมอง และต่อมหมวกไต (hypothalamo pituitary adrenadal axis: HPA) เริ่มต้นจากฮอร์โมนคอร์ติโคโทรปิน รีลิสซิงฮอร์โมน (corticotropin-releasing hormone: CRH) ที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส ไปกระตุ้นการหลั่งแอดรีโนคอร์ติโคทรอพิกฮอร์โมน (adrenocorticotropic: ACTH) ที่ต่อมใต้สมอง ซึ่งจะไปกระตุ้นต่อมหมวกไตให้สร้างฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) (Tsigos, Chrousos, 2002) ฮอร์โมนคอร์ติซอลที่ถูกสร้างสูงขึ้นจากภาวะเครียดจะไปมีผลต่อการทำงานในหลายระบบของร่างกายรวมถึงระบบสืบพันธุ์ (Chrousos, 2009) และมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับการลดลงของฮอร์โมน GnRH และ LH (Breen et al., 2005; Cates et al., 2004) ทำให้ระบบสืบพันธุ์ทำงานผิดปกติ ไม่เกิดการตกไข่ในแกะเพศเมีย เมื่อลองชักนำให้เกิดภาวะเครียดต่างๆ เช่นการให้สารพิษจำพวก Lipopolysaccharide (LPS), การจับบังคับ (Restrain) หรือการทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ภายใต้ภาวะเครียดเหล่านี้ ทำให้การหลั่ง LH pulse ลดลง รวมถึงลดการแสดงออกของยีน *kiss1* ที่สมองส่วนไฮโปธาลามัสเช่นเดียวกัน (Grachev et al., 2013; Kinsey-Jones et al., 2009)

นอกจากภาวะเครียดที่กล่าวดังข้างต้น ยังมีภาวะเครียดจากการเผาผลาญพลังงาน(metabolic stress) มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ โดยมีการทำงานของเซลล์ประสาท Kisspeptin เป็นตัวกลางเชื่อมระหว่างความสมดุลของพลังงานกับระบบสืบพันธุ์ (De Bond, Smith, 2014) ในโคนมเพศเมียที่มีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ (negative energy balance: NEB) พบว่ามีการหลั่งฮอร์โมน LH ลดลง และการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นของฮอร์โมน LH ลดลง ระดับของกลูโคส และ ฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ในพลาสมานั้นก็ลดลงเช่นเดียวกัน (Butler, 2000) นอกจากนี้ภาวะภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ ในโคนมหลังคลอดยังทำให้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระที่ไม่สำคัญ (non-esterified fatty

acid: NEFA) สูงขึ้น และความเข้มข้นของฮอร์โมนเลปติน (leptin) ต่ำลงเมื่อเทียบกับช่วงก่อนคลอด (Block et al., 2001) ฮอร์โมนเลปตินจากเซลล์ไขมัน (adipocyte) บ่งบอกถึงการสำรองพลังงานในร่างกาย และมีความสำคัญในการควบคุมการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์อีกด้วย (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2013) ก่อนหน้านี้มีการศึกษาในแกะพบว่า แกะในกลุ่มที่จำกัดอาหารมีการแสดงออกของยีน *kiss1* ที่ ARC ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าแกะในกลุ่มที่จำกัดอาหารร่วมเมื่อได้รับ exogenous leptin มีการแสดงออกของยีน *kiss1* มากกกว่ากลุ่มที่จำกัดอาหารเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นถึงผลภาวะเครียดจากการเผาผลาญพลังงานต่อการทำงานของเซลล์ประสาท Kisspeptin (Backholer et al., 2010) ในภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ ในโคสามารถประเมินได้จากระดับน้ำตาลกลูโคส กรดไขมันอิสระที่ไม่สำคัญ และเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (β-hydroxylbutyrate) ซึ่งเป็นคีโตนบอดี้ (ketone body)ในซีรั่ม ในการเกิดภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบเป็นเวลานานจะทำให้มีคีโตนบอดี้สูงขึ้นและเรียกภาวะนี้ว่า คีโตซิส (Ketosis) (Duffield, 2000)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ที่บริเวณ ARC (Arcuate nucleus) ในสมองส่วนไฮโปธาลามัสในโคเพศผู้

วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากโค เพศผู้ ยังไม่ได้ตอน อายุ 1.5-2 ปี และ เก็บตัวอย่างสมองโค และตัวอย่างซีรั่มจากโรงฆ่าสัตว์ โคจะถูกเคลื่อนย้ายจากฟาร์มมารอเข้าฆ่าที่โรงฆ่าสัตว์ และถูกฆ่า ณ เวลา 15.00 น. ในกระบวนการเชือดโคถูกทำให้สลบ (stunning) แล้วนำเลือดออกทันที และเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำใหญ่ jugular vein ใส่หลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ทำการเก็บสมองโคหลังตายภายใน 15 นาที โดยเปิดสมองและเก็บสมองส่วนไฮโปธาลามัสที่ตำแหน่ง ARC อยู่ซึ่งอยู่หลังจาก Optic chiasma ไปจนสิ้นสุด Mammilary body (Salehi et al., 2013) ตัดสมองให้มีขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารรักษาชิ้นเนื้อ (Tissue-Tek® O.C.T. Compound) แล้วเก็บรักษาไว้เหนือไนโตรเจนเหลว 8 เซนติเมตร เมื่อชิ้นเนื้อสมองแข็งตัวให้เก็บที่ -80°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค In Situ Hybridization

การวัดระดับ glucose, BHBA, NEFA และฮอร์โมน cortisol

ตรวจระดับความเข้มข้นของ glucose, BHBA และ NEFA ในซีรั่ม โดยการใช้ชุดทดสอบวิธี Enzymatic-spectrophotometric method สำหรับความเข้มข้นของ glucose ใช้ชุดทดสอบ GOD-POD method. (Erba Diagnostics) และสำหรับตรวจระดับ BHBA และ NEFA นั้นใช้ชุดทดสอบ D-3-hydroxybutyrate kit and a NEFA Kit (Randox Laboratories Ltd, Ardmore, UK) ในการวัดระดับฮอร์โมน cortisol คือวิธี Chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยห้องปฏิบัติการ BRIA, BANGKOK R.I.A. GROUP

การวิเคราะห์ *kiss1* mRNA expression cells ด้วยเทคนิค In Situ Hybridization

นำสมองมาตัดแบบ coronal section จากด้านหน้า (anterior) ไปทางด้านท้าย (posterior) จนสุด Mammillary body โดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อแช่แข็ง (Semi-Automatic Cryostat Microtome) และใช้สไลด์เก็บชิ้นเนื้อ (Positive charge microscope slide) โดยเนื้อเยื่อสมองมีความหนา 20 µm (Yang et al., 2017)

เทคนิค In situ hybridization เพื่อศึกษา *kiss1* mRNA expression cell ในส่วนขั้นตอน pre hybridization สไลด์เนื้อเยื่อจะถูกเตรียมให้คงสภาพ mRNA โดย 4%PFA แล้วล้างในสารละลาย PBS ทำการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ 1 µg/mL

Proteinase, สารละลาย 0.2% Glycine และสารละลาย 0.2N HCl ตามลำดับ (Ichimura et al., 2015) หลังจากนั้นเนื้อเยื่อจะถูกทำการ Hybidization กับ Probe ที่ถูกติดฉลากด้วย DIG-labeled anti-sense RNA probe (sequence position 150-474, GenBank accession No. AB46631) โดยใช้ความเข้มข้นของProbe 1μg/สไลด์ ใช้อุณหภูมิ 64°C นาน 15 ชั่วโมง ภายในกล่องรักษาความชื้น หลังจากนั้นนำสไลด์มาล้างด้วยสารละลาย 5x SSC/50%formamide กำจัด probe ส่วนเกิน โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ RNase (1μg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วล้างด้วย 2xSSC, และ 0.2xSSC ตามลำดับ หลังจากนั้น นำสไลด์มา blocked ด้วยสารละลาย 2% BSA ใน hybridization buffer แล้ว Incubate ด้วย anti-DIG antibody (1:250, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) หลังจากนั้นเติมsubstrate คือ NBT/BCIP solution (Roche Applied Science) incubate นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อสมองที่ได้มานับ Kisspeptin positive cell ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสีที่ได้คือสีม่วงเข้ม การนับจำนวน *kiss1* mRNA expression cell จะติดสีม่วงเข้มที่บริเวณ cytoplasm มีลักษณะที่ล้อมรอบ นิวเคลียส (Ichimura et al., 2015) ในการนับจำนวน *kiss1* mRNA expression cell จะนับจากทุกสไลด์

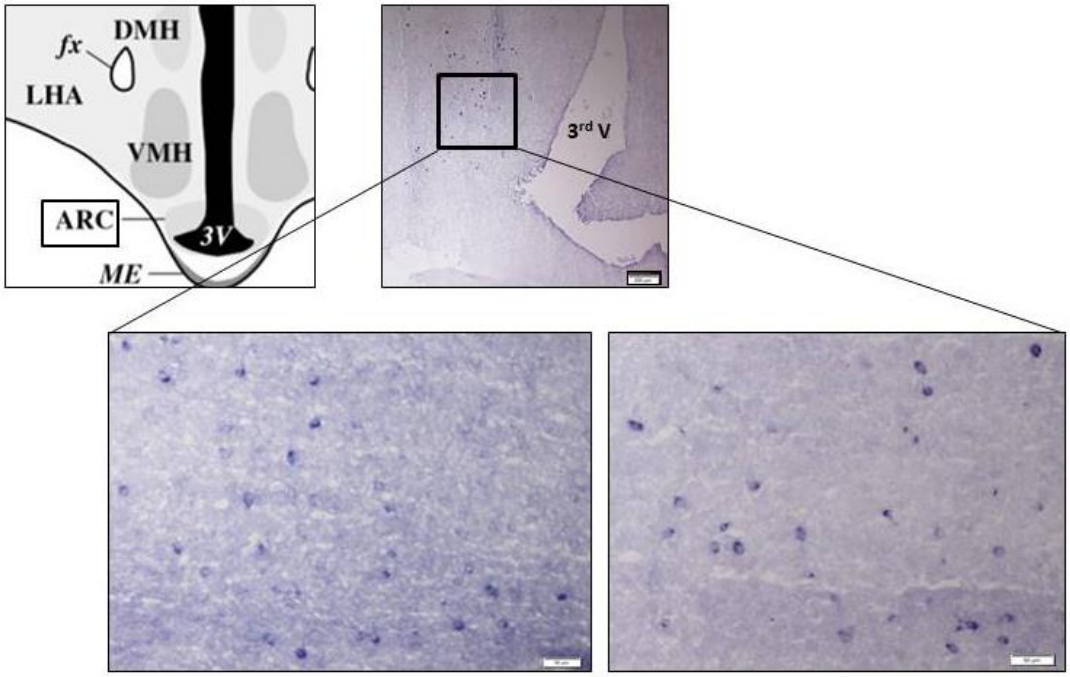
ผลการวิจัย

จากภาพที่ 1 คือเนื้อเยื่อสมองที่ตัดได้เปรียบเทียบตำแหน่งจากการศึกษาของ Okamura (2002) ในภาพที่ 1 โดยเรียงลำดับเนื้อเยื่อสมองบริเวณ ARC ตั้งแต่ส่วน anterior สังเกตได้จากลักษณะของ 3rd ventricle อยู่ตรงกลางและรูปร่างยาวตั้งแต่ด้าน dorsal จนถึงด้าน ventral ของสมอง เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อสมองไปทางด้าน posterior รูปร่างของ 3rd ventricle เล็กลงจนกระทั่งสิ้นสุด 3rd ventricle ก็จะสิ้นสุดสมองส่วน ARC นอกจากนี้สามารถสังเกตได้จากการตัดเนื้อเยื่อสมองถึงส่วนของ Mammilary body (MM) ก็จะสิ้นสุดบริเวณ ARC เช่นเดียวกัน

จากตารางที่ 1 ผลการนับ *kiss1* mRNA expression cell จากการทำ In situ hybridization ในโคเพศผู้ ยังไม่ได้ตอน อายุ 1.5-2 ปี ที่สมองส่วน ARC พบว่ามีจำนวน *kiss1* mRNA expression cell ที่แสดงออกแตกต่างกันในโคแต่ละตัว โดยพบว่ามีการแสดงออกของยีน *kiss1* mRNA expression cell ที่พบมากที่สุดคือ 248 เซลล์ และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่พบผลของ *kiss1* mRNA expression cell จากการทำ In situ hybridization

ผลความเข้มข้นฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่เก็บตัวอย่างทันทีหลังการเชือด โดยทั่วไปโคมีความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล ในระดับพื้นฐาน อยู่ที่ <5 ng/mL ในผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า มีโคสองตัวที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนน้อยกว่าระดับพื้นฐาน คือ <2.3 ng/mL ในตัวอย่างที่เหลือนั้นมีความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล มากกว่าพื้นฐาน

ผลความเข้มข้นของกลูโคส โดยปกติความเข้มข้นกลูโคส ในโคอยู่ระหว่าง 33-66 mMol/dL และในการศึกษาครั้งนี้พบว่า โคทุกตัวนั้นอยู่ในภาวะกลูโคสสูง (hyperglycemia) ในส่วนของความเข้มข้นของ BHBA ใช้บ่งบอกภาวะ Ketosis ในโคได้ โดยปกติแล้วโคมีความเข้มข้นของ BHBA ไม่เกิน 1.4 mMol/dL และจากผลการศึกษาพบว่าไม่มีโคที่เกิดภาวะ Ketosis อยู่ในการศึกษา และผลความเข้มข้นของ NEFA ที่มากกว่า 0.3 mMol/dL บ่งบอกถึงการสลายไขมันมาใช้เป็นพลังงาน หรือมีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบเล็กน้อย (mild-negative energy balance) ผลในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีโคที่ความเข้มข้น NEFA มากกว่า 0.3 mMol/dL คือ C1-C4



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบกับภาพจำลองจากOkamura. (2002) ของบริเวณ ARC ในสมองโค (scale bar 200 µm) และผล *kiss1* mRNA expression cell จากการทำ In Situ Hybridization (scale bar 50 µm)

ตารางที่ 1 แสดงผล ยีน *kiss1* mRNA expression cell ที่สมองส่วน ARC และ ฮอร์โมนคอร์ติซอล, กลูโคส, BHBA และ NEFA

Sample	*kiss1* mRNA positive cells (Cell)	Cortisol (ng/ml)	Glucose mMol/dL	BHBA mMol/dL	NEFA mMol/dL
C1	248	33	74.910	0.305	0.924
C2	4	< 2.3	260.076	0.184	0.339
C3	149	10	112.571	0.226	0.591
C4	0	< 2.3	429.265	0.039	0.435
C5	52	19	201.017	0.209	0.257

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล ในการตรวจแบบครั้งเดียว (single point) สามารถพบระดับฮอร์โมนได้กว้างตั้งแต่ 0-20 ng/mL (Mormède et al., 2007) และจากผลการวัดระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล แบบ single point นั้นสามารถวัดได้ตั้งแต่ระดับ <2.3-33 ng/mL ในระดับพื้นฐาน (baseline) ของฮอร์โมนคอร์ติซอล อยู่ที่ < 5ng/mL (Mormède et al., 2007) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ มีโคสองตัวที่มีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล อยู่ในช่วงระดับพื้นฐาน ได้แก่ C2 และC4 (<2.3 ng/mL) ในขณะอีกสามตัวนั้น มีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่สูงกว่าพื้นฐาน และอยู่ในระดับที่กระตุ้นจากภาวะเครียด (Bristow, Holmes, 2007) จากการศึกษาระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล หลังการกระตุ้นภาวะ

ความเครียดของ Negrao et al. (2004) พบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล สูงขึ้นทันทีภายใน 30 นาที หลังกระตุ้นและสูงขึ้นตลอดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และลดลงเข้าสู่ระดับพื้นฐานก่อนหน้า 4-5 ชั่วโมง

ในส่วนระบบสืบพันธุ์ถูกควบคุมการทำงานโดยเซลล์ประสาท Kisspeptin และทำงานโดยการควบคุมของยีน *kiss1* ซึ่งบริเวณหลักที่พบในเพศผู้คือบริเวณ ARC และการทำงานของเซลล์ประสาท Kisspeptin บริเวณนี้คือควบคุมการหลั่งฮอร์โมน GnRH pulse จากการศึกษาของ Kinsey-Jones et al. (2009) ได้ทำการชักนำให้หนูทดลองเกิดภาวะเครียด ผลที่ได้คือหนูที่อยู่ใต้ภาวะเครียดมีการแสดงออกของยีน *kiss1* ลดลง และ ยังทดลองโดยให้คอร์ติโคโทรปินรีลิสซิงแฟคเตอร์ (Corticotropin releasing factor: CRF) โดยตรงที่สมองส่วนหน้า ผลคือการแสดงออกของยีน *kiss1* ลดลง เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการทดลองโดยการให้ฮอร์โมนคอร์ติซอล ในระบบหมุนเวียนเลือดและผลการทดลองพบว่าเมื่อมีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล สูงขึ้น ยีน *kiss1* มีการแสดงออกลดลง และยังมีการทดลองที่ได้ผลไปในทางเดียวกัน คือความเครียดที่เกิดขึ้นทันที (Acute stress) ในหนู พบว่าไปมีผลลดการแสดงออกยีน *kiss1* ได้เช่นกัน (Yang et al., 2017) จากการที่ภาวะเครียดไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ดังการศึกษาข้างต้นนั้น มีการศึกษาที่สนับสนุนคือ พบว่าที่สมองส่วน ARC ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเซลล์ประสาท Kisspeptin อยู่นั้นมีการแสดงออกของยีนคอร์ติโคโทรปินรีลิสซิงแฟคเตอร์ รีเซพเตอร์ (Corticotropin releasing factor receptor: CRF-R) ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณของภาวะเครียด แสดงให้เห็นว่าความเครียดมีผลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* ในระดับของการควบคุมที่สมองโดย CRF (Li et al., 2010)

จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล ของกลุ่มที่สูงกว่าระดับพื้นฐานในโค C1, C3 และ C5 (33, 10 และ 19 ng/ml ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคที่มีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล ระดับต่ำกว่าพื้นฐานคือ C2 และ C4 (<2.3 ng/mL) พบว่าการแสดงออกของ *kiss1* mRNA expression cell ไม่สัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล เมื่อเทียบจำนวน *kiss1* mRNA expression cell ที่มีการศึกษาก่อนหน้าในโคเพศผู้ที่ยังไม่ได้ตอนโดยใช้วิธีเดียวกันนี้ พบว่ามีจำนวน 299 เซลล์ (Sajapitak et al., 2016) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *kiss1* mRNA expression cell มีจำนวนอยู่ในช่วง 0-248 เซลล์ ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยกว่าการศึกษาของ Sajapitak et al. (2016) ซึ่งเป็นไปได้ว่าในการแสดงออกของยีน *kiss1* นอกจากปัจจัยด้านความเครียดมีปัจจัยอื่นอีก

ในการศึกษาของ Kinsey-Jone et al. (2009) ที่ได้ชักนำให้เกิดภาวะเครียดในหนูทดลอง และพบว่ายีน *kiss1* บริเวณ ARC มีการแสดงออกลดลงหลังการกระตุ้นภาวะเครียดผ่านไปแล้ว 6 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yang et al. (2017) กระตุ้นภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นทันที ในหนูทดลองแล้วเก็บตัวอย่างหลังจากกระตุ้นความเครียด 3 กลุ่ม ได้แก่ ที่ 45, 90 และ 180 นาที พบว่ายีน *kiss1* บริเวณ ARC มีการลดการแสดงออกในทั้งสามกลุ่ม หลังกระตุ้นความเครียด จากการศึกษาทั้งสองที่กล่าวมาพบว่าเมื่อเกิดกระบวนการของภาวะเครียดผ่านไปแล้ว 3-6 ชั่วโมง พบว่ายังสามารถลดการแสดงออกของยีน *kiss1* ได้ (Karamikheirabad et al., 2013; Kinsey-Jones et al., 2009; Yang et al., 2017) ซึ่งจากการที่พบ จำนวน *kiss1* mRNA expression cell ที่น้อย (C2-C5) ในครั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่า โคได้ผ่านภาวะการกระตุ้นความเครียดมาแล้วจึงทำให้พบการแสดงออกของยีน *kiss1* ลดลง และจากการที่วัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล ได้ <2.3 ng/mL (C2 และ C4) เป็นความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่ลดลงจนถึงระดับพื้นฐานหลังกระตุ้นภาวะเครียดจากการขนส่งและรอเข้าฆ่า ในกรณีของ C1 ซึ่งพบว่ามีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล สูงถึง 33ng/mL เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Negrao et al. (2004) พบว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล อยู่ในระดับสูง หลังกระตุ้นภาวะเครียด 1-2 ชั่วโมง ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถพบการลดการแสดงออกของยีน *kiss1* ได้ จึงมีผล *kiss1* mRNA expression cell ที่สูง

เมื่อประเมินภาวะเครียดจากการเผาผลาญพลังงาน โดยใช้ระดับ BHBA ในซีรัมของโคพบว่า ไม่เกิดภาวะคีโตซิส โดยโคทุกตัวมีระดับ BHBA น้อยกว่า 1.4 mmol/L (Duffield et al., 2009) และผลการวัดระดับของ NEFA ในซีรัมพบว่า โค C1, C2, C3 และ C4 มีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบเล็กน้อยโดยมีระดับ NEFA ในเลือดสูงกว่า 0.3 mmol/l (Fenwick et al., 2008) และจากการผลการวัดระดับน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีความเข้มข้นสูงขึ้นกว่าค่าปกติในโคทุกตัว โดยปกติแล้วจะอยู่ในช่วง 33-66 mg/dL (Smith, 2008) จากการที่ความเข้มข้นของ NEFA สูงขึ้นในซีรัมบอกได้ว่าโคอยู่ในภาวะที่สลายพลังงานจากไขมันมาใช้ ซึ่งโดยปกติแล้ว การเกิดภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบจะพบการลดลงของกลูโคส และการเพิ่มขึ้นของ BHBA ในซีรั่มร่วมด้วย แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าโคทุกตัว มีระดับกลูโคสที่สูงกว่าปกติ ในการทดลองนี้โคที่ศึกษาไม่มีภาวะภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบและการเพิ่มสูงขึ้นของกลูโคสนั้น ที่พบเป็นผลจากการเกิดกลูโคนีโอจินิซิส (gluconeogenesis) ของฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่มาจากความเครียดของโค (Baxter, Forsham, 1972) ซึ่งระดับของกลูโคสจะมีระดับสูงขึ้นและสามารถมีความเข้มข้นที่สูงได้นานกว่าระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล (Kainuma et al., 2009; Maplesden et al., 1960) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ที่พบภาวะกลูโคสที่สูงกว่าปกติ ในขณะที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอล ต่ำนั้นจึงสามารถพบได้จการเกิดกลูโคนีโอจินิซิส ที่เกิดขึ้นได้นาน

นอกจากปัจจัยทางด้านภาวะเครียดและความสมดุลของพลังงานดังที่กล่าวมาข้างต้น ในโคตัวผู้ที่ไม่ได้ทำหมัน ผลของฮอร์โมนเทสโทสเทอโรล (testosterone) ที่มีอยู่สามารถมีผลต่อการแสดงออกของยีน *kiss1* โดยจะเกิดการควบคุมแบบย้อนกลับ (negative feedback)ไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท Kisspeptin ลดการหลั่งฮอร์โมน GnRH และ LH (de Tassigny, Colledge, 2010; Ohkura et al., 2009)

จากผลการศึกษาที่ใช้วิธี In Situ Hybridization ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *kiss1* นั้น สามารถบอกตำแหน่งการแสดงออก (localization) และบอกปริมาณการแสดงออกได้อย่างคร่าว (Semi-quantitative detection) (Farrell, 2009) ดังนั้น การไม่พบ *kiss1* mRNA expression cell จากวิธี In Situ Hybridization นั้นไม่ได้หมายถึงไม่มีการแสดงออกของยีน *kiss1* หรือมีการแสดงออกที่น้อยจนไม่สามารถพบโดยวิธี In Situ Hybridization เนื่องจากมีการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) เทียบกับการทำ In Situ Hybridization มีความไว หรือ sensitivity น้อยกว่าวิธี qPCR (Bates et al., 1997)

สรุปผลจากการศึกษาครั้งนี้ ระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล ในโคแต่ละตัวก่อนเข้าฆ่าพบว่ามีระดับที่สูงอยู่ในระดับภาวะเครียด และอยู่ในระดับพื้นฐาน แสดงให้เห็นว่าก่อนเข้าฆ่าของโคในครั้งนี้กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอลได้แตกต่างกันในโคแต่ละตัว และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับ *kiss1* mRNA expression cell พบว่าผลคือไม่พบความสัมพันธ์กัน เนื่องจากการแสดงออกของยีน *kiss1* นั้นมีปัจจัยหลายอย่างในการควบคุม ทั้งภาวะสมดุลพลังงานในร่างกาย และการทำงานลักษณะควบคุมย้อนกลับของฮอร์โมนเพศ ผลของการแสดงออกของยีน *kiss1* ในการทดลองครั้งนี้ถูกรบกวนด้วยปัจจัยเหล่านี้ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า หน่วยงานคอกสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และ บริษัทบริษัท กรีน อินโนเวทีฟ ไบโอเทคโนโลยี จำกัด ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Backholer, K., J.T. Smith, A. Rao, A. Pereira, J. Iqbal, S. Ogawa, Q. Li and I.J. Clarke. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. Endocrinology. 2010; 151(5): 2233-2243.

Bates, P., G. Sanderson, S. Holgate and S. Johnston. A comparison of RT-PCR, In-Situ Hybridisation and In-Situ RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections. J. Virol. Methods. 1997; 67(2): 153-160.

Baxter, J.D. and P.H. Forsham. Tissue effects of glucocorticoids. Am. J. Med. 1972; 53(5): 573-589.

Block, S., W. Butler, R. Ehrhardt, A. Bell, M. Van Amburgh and Y. Boisclair. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. J. Endocrinol. 2001; 171(2): 339-348.

Breen, K.M., H.J. Billings, E.R. Wagenmaker, E.W. Wessinger and F.J. Karsch. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. Endocrinology. 2005; 146(4): 2107-2115.

Bristow, D.J. and D.S. Holmes. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. Physiol. Behav. 2007; 90(4): 626-628.

Butler, W. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. Animal Reproduction Sci. 2000; 60-61: 449-457.

Cates, P., X. Li and K. O'Byrne. The Influence of 17β-Oestradiol on corticotrophin-releasing hormone induced suppression of luteinising hormone pulses and the role of CRH in hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile LH secretion in the female rat. Stress. 2004; 7(2): 113-118.

Chrousos, G.P. Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrinol. 2009; 5(7): 374.

De Bond, J.-A.P. and J.T. Smith. Kisspeptin and energy balance in reproduction. Reproduction. 2014; 147(3): R53-R63.

de Tassigny, X.d.A. and W.H. Colledge. The role of kisspeptin signaling in reproduction. Physiology. 2010; 25(4): 207-217.

Duffield, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2000; 16(2): 231-253.

Duffield, T., K. Lissemore, B. McBride and K. Leslie. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J. Dairy Sci. 2009; 92(2): 571-580.

Farrell JR, R.E. RNA methodologies: laboratory guide for isolation and characterization. San Diego, California, Academic Press, 2009.

Fenwick, M.A., R. Fitzpatrick, D.A. Kenny, M.G. Diskin, J. Patton, J.J. Murphy and D.C. Wathes Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. Domest. Anim. Endocrinol. 2008; 34(1): 31-44.

Grachev, P., X.F. Li and K. O'Byrne. Stress regulation of kisspeptin in the modulation of reproductive function. Adv. Exp. Med. Biol. 2013; 784: 431-54.

Ichimura, R., M. Takahashi, T. Morikawa, K. Inoue, J. Maeda, K. Usuda, M.Yokosuka, G. Watanabe and M. Yoshida. Prior attenuation of Kiss1/Gpr54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. Reproductive Toxicol. 2015; 51: 145-156.

Kainuma, E., M. Watanabe, C. Tomiyama-Miyaji, M. Inoue, Y. Kuwano, H. Ren and T. Abo. Association of glucocorticoid with stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. Psychoneuroendocrinology. 2009; 34(10): 1459-1468.

Karamikheirabad, M., G. Behzadi, M. Faghihi, R. Raoofian, S. Ejtemaei Mehr, W.A. Zuure and H.R. Sadeghipour. A role for endocannabinoids in acute stress-induced suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male rats. Clin. Exp. Reprod. Med. 2013; 40(4): 155-162.

Kauffman, A.S., M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton, G.E. Hoffman, R.A. Steiner and M. Tena-Sempere. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. Endocrinology. 2007; 148(4): 1774-1783.

Kinsey-Jones, J., X. Li, A. Knox, E. Wilkinson, X. Zhu, A. Chaudhary, S. Milligan, S. Lightman and K. O'byrne. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. J. Neuroendocrinol. 2009; 21(1): 20-29.

Li, X., A. Knox and K. O'byrne. Corticotrophin-releasing factor and stress induced inhibition of the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator in the female. Brain Res. 2010; 1364: 153-163.

Maplesden, D., B. McSherry and J. Stone. Blood sugar levels in normal cows before and after treatment with prednisolone and dexamethasone. Can. Vet J. 1960; 1(7): 309.

Mormède, P., S. Andanson, B. Aupérin, B. Beerda, D. Guémené, J. Malmkvist, X. Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet and C.G. van Reenen. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal Function as a tool to evaluate animal welfare. Physiol Behav. 2007; 92(3): 317-339.

Negrao, J., M. P orcionato, A. De Passille and J. Rushen. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. J. Dairy Sci. 2004; 87(6): 1713-1718.

Ohkura, S., Y. Uenoyama, S. Yamada, T. Homma, K. Takase, N. Inoue, K.I. Maeda and H. Tsukamura. Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. Peptides. 2009; 30(1): 49-56.

Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu and Y. Masuda. Metastasis suppressor gene Kiss-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature. 2001; 411(6837): 613.

Okamura, H. Brain atlas of cattle. Tokyo. n.p., 2002

True, C., M. Kirigiti, P. Kievit, K. Grove and M.S. Smith. Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinising hormone restoration during exit from negative energy balance. J. Neurosci. 2011; 23(11): 1099-1112.

Tsigos, C. and G.P. Chrousos. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J. Psychosom Res. 2002; 53(4): 865-871.

Sajapitak, S., P. Lertwatcharasarakul, S. Phattanakunanan, P. Moonjit and N. Thanantong. Preliminary study of kisspeptin neurons in the ARC of the hypothalamus in beef cattle. Kasetsart J. 2016; 26(1): 24-33.

Salehi, M.S., M.R. Namavar, M.R.J. Shirazi, F. Rahmanifar and A. Tamadon. A simple technique for separation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei in the rat hypothalamus. Anatomy. 2013; 6-7: 48-51.

Sanchez-Garrido, M.A. and M. Tena-Sempere. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. Horm Behav. 2013; 64(2): 187-194.

Smith, B.P. Large animal internal medicine. 4th ed. Mosby, St. Louis, MO. 2008.

Yang, J.A., C.I. Song, J.K. Hughes, M.J. Kreisman, R.A. Parra, D.J. Haisenleder, A.S. Kauffman and K.M. Breen. Acute psychosocial stress inhibits LH pulsatility and Kiss1 neuronal activation in female mice. Endocrinology. 2017; 158(11): 3716-3723.