การตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อสภาพอากาศในรอบวัน

Physiological responses and level of HSP70 in white blood cell of Thai native cattle under diurnal weather

จักรกริช เจริญศิลป์[1], สุภร กตเวทิน[1*], ยุพิน ผาสุข[1] and สุรางคนา สุขเลิศ[1]

Jakrit Charoensin[1], Suporn Katawatin[1*], Yupin Phasuk[1] and Surangkana Suklerd[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในรอบวัน โดยศึกษาในโคพื้นเมืองไทย เพศเมีย จำนวน 5 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 158±5.3 กิโลกรัม อายุ 6 ปี เลี้ยงในคอกกลางแจ้งมีหลังคาบางส่วน บันทึกข้อมูลอุณหภูมิทวารหนัก อัตราการหายใจ อัตราการขับเหงื่อของโค และคำนวณค่าดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์จากค่าอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพอากาศในรอบวัน เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ HSP70 ที่เวลา 07.00, 14.00 และ 21.00 น. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ๆ ละ 1 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพอากาศเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อุณหภูมิทวารหนัก อัตราการหายใจและอัตราการขับเหงื่อของโคพื้นเมืองไทยเพิ่มขึ้น ($p<0.01$) อย่างไรก็ดี จากผลการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปผลของสภาพอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทย

คำสำคัญ : อุณหภูมิทวารหนัก, อัตราการหายใจ, อัตราการขับเหงื่อ,โคพื้นเมืองไทย, HSP70

ABSTRACT: The purpose of this study was to investigate the physiological responses and level of HSP70 in Thai native cattle lymphocytes on the changing of temperature and humidity. Five female Thai native cattle, body weight 158±5.3 kg, 6 years of age, were lived outdoor with partial roof. Rectal temperature, respiration rate, and sweating rate were recorded. Temperature and relative humidity were recorded to calculate temperature humidity index. Blood samples were collected at 07.00, 14.00 and 21.00 for 8 weeks to determine amount of HSP70 in lymphocyte. Results found that rectal temperature, respiration rate and sweating rate of Thai native cattle increased when the temperature humidity index increased ($P<0.01$). However, level of HSP70 was not in accordance with the temperature humidity index.

Keywords: Rectal temperature, Respiration rate, Sweating rate, Thai native cattle, HSP70.

[1] สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Animal Science, Faculty of Agriculture, Khonkaen University

* Corresponding author: supkat@kku.ac.th

บทนำ

ภายใต้สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูงโคจะรักษาสมดุลอุณหภูมิร่างกายโดยระบายความร้อนออกจากร่างกายผ่านทางการเพิ่มอัตราการหายใจและการขับเหงื่อ (อุทัย และคณะ, 2548; Guaghan et al.,1999; McManus et al., 2005; Quintero-Moreno et al., 2007) นอกจากนี้ เซลล์เม็ดเลือดขาวของโคที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสูงจะมีการสังเคราะห์ heat shock proteins (HSPs) โดยเฉพาะ HSP ขนาดมวลโมเลกุล 70 kDa (HSP70) เพิ่มขึ้น เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้โปรตีนในเซลล์ถูกทำลายและช่วยให้โปรตีนที่เสียสภาพไปสามารถคืนสภาพและทำงานได้ (Vince Guerriero and Raynes, 1990; Kamwanja et al., 1994) โคพื้นเมืองไทย ซึ่งเป็นโคที่มีความสามารถในการทนทานต่อความร้อนได้เป็นอย่างดี พบว่าเมื่ออุณหภูมิสภาพอากาศเพิ่มสูงขึ้นโคพื้นเมืองไทยจะระบายความร้อนออกจากร่างกายโดยเพิ่มอัตราการหายใจและการขับเหงื่อ (อุทัย และคณะ, 2548) แต่ยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของ HSP70 ในระดับเซลล์ของโคพื้นเมืองไทยต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่า HSP70 มีบทบาทในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงในระดับเซลล์ของโค ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในรอบวัน

วิธีการศึกษาวิจัย

โคพื้นเมืองไทยเพศเมีย จำนวน 5 ตัว อยู่ในคอกกลางแจ้งมีหลังคาบางส่วน เก็บข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพอากาศเพื่อคำนวณดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (THI) การตอบสนองทางสรีรวิทยาของโคพื้นเมืองไทยประเมินจากอุณหภูมิทวาร อัตราการหายใจ และอัตราการขับเหงื่อ ที่เวลา 07.00, 14.00 และ 21.00 น. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ๆ ละ 1 ครั้ง (มิถุนายน-สิงหาคม 2552) เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากน้ำเลือดด้วย lymphoprep™ (Axis-Shield, 1114547) และสกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วย 2%TritonX-100 ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที แยกเก็บของเหลวด้านบนซึ่งมีโปรตีนอยู่ แล้วนำไปแยกขนาดโปรตีนตามมวลโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE (ดัดแปลงจาก Kamaruddin et al., 2004) ที่มี polyacrylamide gel 4% (w/v) stacking gel และ 12% (w/v) separating gel ใช้กระแสไฟฟ้า 10 mA นาน 1.30 ช.ม. จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ HSP70 ด้วยวิธี western blot โดยย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลที่ผ่านกระบวนการ SDS-PAGE ไปยัง PVDF membrane ด้วยเครื่อง semi-dry transfer cell (trans-blot®SD, bio-rad) ใช้กระแสไฟฟ้า 10 โวลต์ นาน 2 ช.ม. แล้ว blocked ปฏิกิริยาด้วย 2% advance ECL blocking (amersham) บ่ม PVDF membrane ด้วย primary antibody (monoclonal anti-HSP70, H5147 sigma chemical supplies CO., LTD) อัตราส่วนเจือจาง 1:10,000 และ secondary antibody (mouse anti goat horseradish peroxidase conjugated) อัตราส่วนการเจือจาง 1:50,000 ที่อุณหภูมิห้อง 1 ช.ม. ตรวจสอบแถบ HSP70 ด้วยแผ่นฟิล์ม x-ray และประเมินค่าปริมาณ HSP70 ด้วยเครื่อง bio imaging systems ใช้แผนการทดลองที่มีการวัดซ้ำในแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Repeated Measurements in RCBD) โดยกำหนดให้ตัวโคเป็นบล็อก และเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดเป็นทรีตเมนต์ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย GLM และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย orthogonal contrast และศึกษาอิทธิพลของสภาพภูมิอากาศต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ด้วย regression analysis

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (THI) ของสภาพอากาศมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทวารหนัก อัตราการหายใจ และอัตราการขับเหงื่อของโคพื้นเมืองไทย **(Table 1)** ผลกระทบของค่า THI ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของโคแสดงโดยการวิเคราะห์ regression analysis ดังผลแสดงใน Figure 1 ส่วนปริมาณ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ไม่พบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงตามรอบวัน ในลักษณะเดียวกับการตอบสนองทางสรีรวิทยา (Table 1) แต่พบว่าปริมาณ HSP70 มีค่าสูงในช่วงเช้า (7.00 น.) และช่วงบ่าย (14.00 น.) และมีปริมาณลดลงในช่วงค่ำ (21.00 น.) **(Table 1)** นอกจากนี้ การวิเคราะห์ผลกระทบของสภาพภูมิอากาศต่อปริมาณ HSP70 ด้วย regression analysis พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่า THI ไม่มีผลต่อปริมาณ HSP70

Table 1 Mean of Temperature, Relative humidity, Temperature Humidity Index, Rectal temperature, Respiration rate, Sweating rate and HSP70 in Thai native cattle white blood cells.

Parameter	Time			SEM
	07.00	14.00	21.00	
Temperature (°C) [1/]	26.70[c]	32.08[a]	29.00[b]	0.39
Relative Humidity (%)	94.03	73.85	75.55	4.58
Temperature Humidity Index[1/]	79.32[b]	85.17[a]	81.22[b]	0.85
RectalTemperature (°C) [1/]	37.70[b]	38.48[a]	38.51[a]	0.05
Respiration rate (breath/min)[1/]	17.70[b]	28.25[a]	18.15[b]	0.74
Sweating rate (g/m^{2}h)1/	136.96[b]	401.08[a]	149.60[b]	22.3
HSP70 (µg/100 µg protein) [2/]	0.41[a]	0.45[a]	0.31[b]	0.04

[1/] in same row are difference significant at P<0.01., [2/] in same row are difference significant at P<0.05.

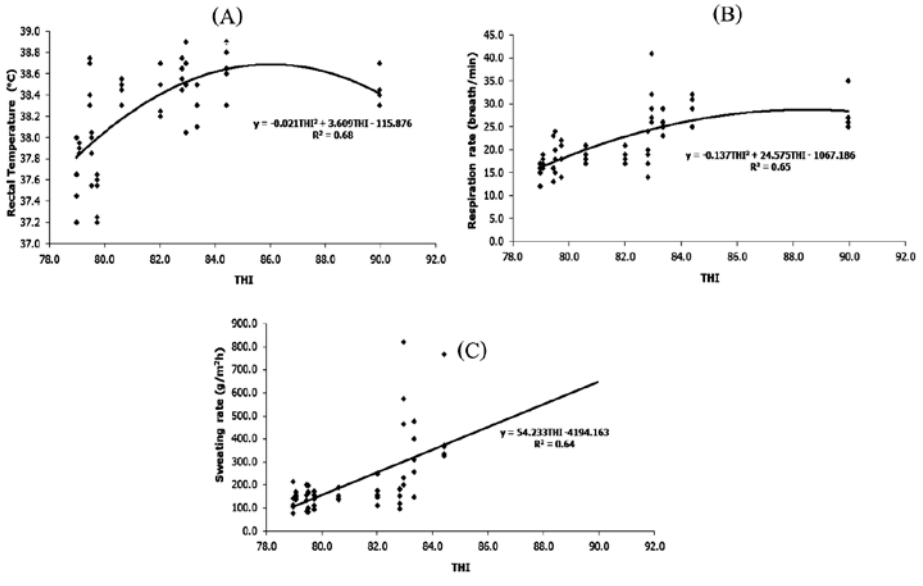

Figure 1 Regression analysis between temperature humidity index and Rectal temperature (A), Respiration rate (B) and Sweating rate (C) of Thai native cattle.

ดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพอากาศที่เพิ่มสูงขึ้นในรอบวัน ส่งผลให้โคเกิดภาวะเครียดจากความร้อน (Ravagnolo et al., 2000; Broncek et al., 2006) สังเกตจากอุณหภูมิทวารหนักของโคที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม โคจะรักษาอุณหภูมิร่างกายให้เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดเพื่อให้ระบบในร่างกายสามารถทำงานได้ โดยเพิ่มการระบายความร้อนออกจากร่างกายผ่านทางการเพิ่มอัตราการหายใจและการขับเหงื่อ (อุทัย และคณะ, 2548; McManus et al., 2005; Quintero-Moreno et al., 2007) อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาความลาดชันของเส้นกราฟใน Figure 1 พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่า THI ส่งผลอย่างชัดเจนต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการขับเหงื่อ ดังจะเห็นได้จากความลาดชันของเส้นกราฟที่เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด เมื่อเทียบกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการหายใจ (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยใช้การขับเหงื่อเป็นเส้นทางสำคัญในการระบายความร้อน (อุทัย และคณะ, 2548)

แม้ว่าผลการศึกษาครั้งนี้จะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ HSP70 ตามรอบวันอย่างที่คาดการณ์ แต่มีข้อสังเกตว่าช่วงเช้า 7.00 น. และช่วงบ่าย 14.00 น.ที่มีปริมาณ HSP70 ที่เท่ากันนั้น มีค่า THI สูงที่ระดับ 80 และ 85 (Table 1) ซึ่งเป็นค่า THI ที่ได้รับการยอมรับว่าทำให้โคเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (Quintero-Moreno et al., 2007) อย่างไรก็ดี ในช่วงเวลาค่ำ (21.00 น.) มีค่า THI ที่ 81 และอุณหภูมิทวารหนักยังคงสูงเท่ากับช่วงบ่ายแสดงการสะสมความร้อน (heat load) ในร่างกายโค แต่พบว่าปริมาณ HSP70 ลดลงเมื่อเทียบกับช่วงเช้าและบ่าย ซึ่งอาจเนื่องจากมีการสังเคราะห์ HSP ลดลงหรือปริมาณ HSP ที่สะสมในเซลล์ลดลง (Diller et al., 2006) ดังนั้นกลไกการสังเคราะห์และการทำงานของ HSP70 ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนยังต้องมีการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

อุทัย โคตรดก, สุภร กตเวทิน, สุจินต์ สิมารักษ์, มนต์ชัย ดวงจินดา, และยุพิน ผาสุข. 2548. การศึกษาเปรียบเทียบกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนระหว่างโคเขตร้อนและโคเขตหนาว. แก่นเกษตร. 34(4):347-354.

Broucek, J., S. Mihina, S. Rybr, P. Tongel, P. Kisac, M. Uhrincat, and A. Hanus. 2006. Effects of high air temperatures on milk efficiency in dairy cows. Czech. J. Anim. Sci. 51(3):93–101.

Diller, K.R. 2006. Stress protein expression kinetics. Annu. Rev. Biomed. Eng. 8:403-424.

Gaughan, J.B., T.L. Mader, S.M. Holts, M.J. Josey, and K.J. Rowan. 1999. Heat tolerrace of Boran and Tuli crossbreed steers. J. Anim. Sci. 17:2398-2405.

Kamwanja, L.A., C.C. Chase, J.A. Gutieerrez, V. Guerriero. T.A. Olson, A.C. Hammond, and P.J. Hansen. 1994. Response of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. J. Anim. Sci. 72: 438-444.

Laceterra, N., U. Bernabucci, D. Scalia, B. Ronchi, G. Kuzminsky, and A. Nardone. 2006. Heat tolerance in brown swiss and Holstein cows. J. Dairy Sci. 89(12):4606-4612.

McManus, C., G.R. Paludo, H. Louvandini, J.A.S. Garcia, A.A. Egito, and A.S. Mariante. 2005. Heat tolerance in naturalised cattle in Brazil: Physical factors. Arch. Zootec. 54:453-458.

Quintero-Moreno, A., D. Calatayud, J. Boscan, N. Rojas, D. Arrieta, R. Palomares, and R. Científica. 2007. Heat tolerance in 1/2 Senepol- and 5/8 Holstein -3/8Brahman crossbred calves. FCV-LUZ. 17(5):473–479.

Ravagnolo, O., I. Mitsztal, and G. Hoogenboom. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle development of heat index function. J. Dariry. Sci. 83:2120–2125.

Vince Guerriero, V. Jr., and D.A. Raynes. 1990. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. J. Anim. Sci. 68:2779–2783.