

ความสัมพันธ์ของปริมาณ Heat Shock Protein 70 (HSP70) กับคุณภาพน้ำเชื้อในพ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน

Association of heat shock protein 70 levels with semen quality in crossbred Holstein Friesian bulls

นิภา นาสินพร้อม¹, สุภร กตเวทิน^{1*}, มนต์ชัย ดวงจินดา¹ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล²

Nipa Nasinprom¹, Suporn Katawatin^{1*}, Monchai Duangjinda¹

and Petcharat Thummabenjapone²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการมีอยู่ของ 70 kDa heat shock protein (HSP70) ในอสุจิและความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซียน โดยเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากพ่อ โค จำนวน 10 ตัว ในช่วงฤดูฝน (THI = 79.06) ฤดูหนาว (THI = 74.30) และฤดูร้อน (THI = 80.05) ฤดูกาลละ 8 ครั้ง เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ ปริมาตรน้ำเชื้อ ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ จำนวนอสุจิทั้งหมด การเคลื่อนที่แบบหมุน การเคลื่อนที่รายตัว จำนวนอสุจิมิชีวิต และจำนวนอสุจิที่ผิดปกติ ผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในฤดูร้อนและฤดูฝนอสุจิมีการเคลื่อนที่แบบหมุนต่ำกว่าฤดูหนาว $P < 0.01$ และในฤดูร้อนมีจำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมดและอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิมากที่สุด ($P < 0.01$) และจากการศึกษาปริมาณ HSP70 ในอสุจิด้วยวิธี Western blot พบว่าปริมาณของ HSP70 ในอสุจิของพ่อโคในฤดูร้อนต่ำกว่าในฤดูหนาวและฤดูฝน ($P < 0.01$) โดยปริมาณ HSP70 ในอสุจิมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเคลื่อนที่แบบหมุน จำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมด และจำนวนอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ($P < 0.01$) การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่ามี HSP70 ปรากฏในอสุจิ และปริมาณ HSP70 ในอสุจิมีความสัมพันธ์กับลักษณะบางประการของคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมโฮลสไตน์ฟรีเซียน

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ, โคนม, HSP70

ABSTRACT: This study attempted to clarify the appearance of 70 kDa heat shock protein (HSP70) in spermatozoa and its relationship with the semen quality in crossbred Holstein Friesian (HF) bulls. Semen from 10 HF bulls was collected 8 weeks during rainy (THI = 79.06), winter (THI = 74.30), and summer (THI = 80.05). Semen quality was evaluated in terms of semen volume, sperm concentration, sperm motility, sperm viability, and percentage of abnormal spermatozoa. It was found that mass movement of sperm in the summer and rainy seasons were significantly lower than in the winter ($P < 0.01$). The percentage of abnormal sperm were significantly lowest in the summer ($P < 0.01$). The western blot analysis of the levels of HSP70 in spermatozoa found that it was significantly lower in summer than during winter and rainy seasons ($P < 0.01$). The results of correlation revealed that the levels of HSP70 in spermatozoa had positive correlation with mass movement, percentage of total abnormal sperm, and percentage of secondary abnormal sperm ($P < 0.01$). In conclusion, this study revealed the presence of HSP70 in the bulls' spermatozoa and it was associated with some traits of semen quality.

Keywords: semen quality, Holstein Friesian bulls, HSP70

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

¹ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kean University, Khon Kean 40002

² Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kean University, Khon Kean 40002

* Corresponding author: supkat@kku.ac.th

บทนำ

กระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดขึ้นภายในอัณฑะที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกาย ประมาณ 2-6 °ซ (Austin and Short 1990) ถ้าอุณหภูมิภายในอัณฑะสูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างอสุจิ (Rockett et al., 2001) ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง (Sailer et al., 1997) ส่งผลสืบเนื่องถึงอัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนเป็นลำดับ

รายงานการศึกษาในเซลล์ร่างกายทั่วไป เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าความร้อนกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า heat shock proteins (HSPs) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Guerriero and Raynes, 1990) โดยเฉพาะ HSPs ขนาด 70 kDa หรือ HSP70 (Sonna et al., 2002) เพื่อปกป้องเซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย อันเนื่องมาจากความร้อน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เซลล์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยความร้อนและสามารถทนร้อนหรือมีชีวิตรอดจะมีปริมาณ HSP70 สูงกว่าเซลล์ที่ไม่เคยได้รับการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน (King et al., 2002) ทำให้มีการใช้ HSP70 เป็นตัวชี้วัดการทนร้อนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Theodorakis et al., 1999)

ในเซลล์อสุจิมียารายงานการมีอยู่ของ HSP70 เช่น โคนม (Kamaruddin et al., 2004) สุกร (Huang et al., 2000) คน (Huszar et al., 2000) และหนู (Dix et al., 1996) โดยรายงานในคน และหนู พบว่า HSP70 มีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างอสุจิ ในขณะที่ Matwee et al., (2001) รายงานว่า HSP70 มีบทบาทสำคัญต่อการปฏิสนธิในโคนม นอกจากนี้ในการศึกษาในสุกร Huang et al. (2000) รายงานว่า HSP70 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่าน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมีปริมาณ HSP70 สูง อย่างไรก็ตาม ในรายงานการศึกษาดังกล่าวพบว่า ในช่วงฤดูร้อนอสุจิของสุกรมีปริมาณ HSP70 ต่ำกว่าในฤดูหนาว ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานในเซลล์ร่างกายตามที่ได้กล่าวมาใน

เบื้องต้น ที่พบว่าความร้อนหรืออุณหภูมิสูงกระตุ้นให้เซลล์ร่างกายมีการสร้าง HSP70 มากกว่าในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ (Sonna et al., 2002) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิหรือความร้อนส่งผลกระทบต่อปริมาณ HSP70 ในเซลล์อสุจิแตกต่างจากเซลล์ร่างกาย

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการมีอยู่ของ HSP70 ในอสุจิ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HSP70 ในอสุจิกับคุณภาพน้ำเชื้อ รวมถึงอิทธิพลของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลต่อการมีอยู่ของ HSP70 ในอสุจิและคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมลูกผสมไฮลอสโตน์ ฟรีเซียน ในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

การศึกษาค้นคว้านี้ใช้พ่อพันธุ์โคนมลูกผสมไฮลอสโตน์-ฟรีเซียน ระดับสายเลือด 87.50-96.87% อายุ 6-7 ปี น้ำหนัก 770-860 กก. จำนวน 10 ตัว เลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง พ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี โดยลักษณะโรงเรือนเป็นโรงเรือนแบบเปิด ตั้งอยู่ด้านข้างลานรดน้ำเชื้อ แต่ละโรงเรือนมีคอกกักสัตว์ 2 แถว หันหน้าเข้าหากัน แต่ละคอกมีขนาด 5 x 10 เมตร ส่วนการจัดการด้านอาหาร พ่อพันธุ์โคนมได้รับอาหารหยาบแบบเต็มที่ (ad libitum) ได้รับอาหารข้นวันละ 2 ครั้ง ปริมาณอาหารข้นที่ให้ในแต่ละตัวขึ้นอยู่กับคะแนนร่างกาย (Body Score) ของพ่อพันธุ์โคนม และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

การบันทึกสภาพภูมิอากาศ

บันทึกข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือนพ่อพันธุ์โคนมด้วยเครื่องวัดและบันทึกอัตโนมัติ (Data Logger) เพื่อคำนวณค่าดัชนีอุณหภูมิและความชื้น (Temperature and Humidity Index; THI) ตามสูตรของ

Ravagnolo et al. (2000)

$$THI = (9/5Ta + 32) - (0.55 - 0.55RH) \times (9/5Ta - 26)$$

Ta = อุณหภูมิสภาพแวดล้อม (°ซ)

RH = ความชื้นสัมพัทธ์เป็นจุดทศนิยม

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อและการวิเคราะห์ปริมาณ HSP70 ในอสุจิ

เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 3 มล. จากพ่อโคจำนวน 10 ตัว ในช่วงฤดูฝน (ก.ย.-ต.ค. 2548) ฤดูแล้ง (พ.ย.-ธ.ค. 2548) และฤดูร้อน (มี.ค.-เม.ย. 2549) ฤดูกาลละ 8 ครั้ง ต่อเนื่องกัน เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อและวิเคราะห์หาปริมาณ HSP70

ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ ปริมาตรน้ำเชื้อ (volume) ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (concentration) การเคลื่อนที่แบบหุ้ม (mass movement) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive movement) การมีชีวิตของอสุจิ (live spermatozoa) และความผิดปกติของเซลล์อสุจิ ทั้งแบบปฐมภูมิและทุติยภูมิ (primary and secondary abnormal spermatozoa) ด้วยการย้อมสีไอโซซิน-นิโกรซิน ตามวิธีการของเทวินทร์ (2542)

การวิเคราะห์ปริมาณ HSP70 ในอสุจิ ใช้เทคนิค western blot ซึ่งดัดแปลงจาก Kamaruddin et al. (2000) มีลำดับขั้นตอนดังนี้ นำน้ำเชื้อมาแยกเซลล์อสุจิออกจากน้ำกามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์อสุจิด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง และเก็บไว้ที่ -20°ซ เพื่อรอการสกัดโปรตีน ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์อสุจิจำนวน 1.5×10^8 ตัว โดยใช้ 0.02% Triton X-100 ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดโดยชุดตรวจวัด (Bio-Rad, 500-0002) ตามวิธีการของ Bradford (1976) จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นเท่ากัน มาแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี one-dimension SDS-PAGE โดยใช้ 4% stacking gel และ 12% resolving gel กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ

ห้อง เคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปสู่แผ่น PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้า 12 โวลท์ เป็นเวลา 90 นาที ล้างแผ่น PVDF ด้วย STBST และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2% Blocking advance ECL ใน STBST ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 60 นาที จากนั้นบ่มแผ่น PVDF membrane กับแอนติบอดีปฐมภูมิ (Monoclonal anti-(HSP70); Sigma, H5145) สัดส่วน 1:15,000 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 60 นาที ล้างแผ่น PVDF ด้วย STBST 3 ครั้ง และบ่มต่อด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Mouse anti goat horseradish peroxidase conjugated; Sigma, A2254) สัดส่วน 1:50,000 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์ผลการมีอยู่ของ HSP70 ด้วยวิธี Chemiluminescent detection บนแผ่นฟิล์มเนกาทีฟ ตรวจจสอบ HSP70 บนแผ่นฟิล์มโดยเครื่อง Bio Imaging Systems (Syngene, a division of Synoptics Limited) และคำนวณปริมาณ HSP70 จากกราฟมาตรฐานที่ได้ จาก recombinant rat HSP70 (HSP72) protein (Stressgen, SPP-758)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และปริมาณ HSP70 โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยมีโมเดลทางสถิติเป็น $Y_{ijk} = \mu + Sire_i + Season_j + Eijk$ เมื่อ $Sire_i$ เป็นอิทธิพลเนื่องจากพ่อพันธุ์ ($i = 1, \dots, 10$); $Season_j$ เป็นอิทธิพลเนื่องจากฤดูกาล ($j =$ ฤดูร้อน ฤดูแล้ง และฤดูหนาว) และ $Eijk$ เป็นความคลาดเคลื่อนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสี่สแควร์ (least square means) ของฤดูกาลด้วยวิธี least significant difference และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื้อ ใช้การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปทางสถิติ SAS (SAS, 1985)

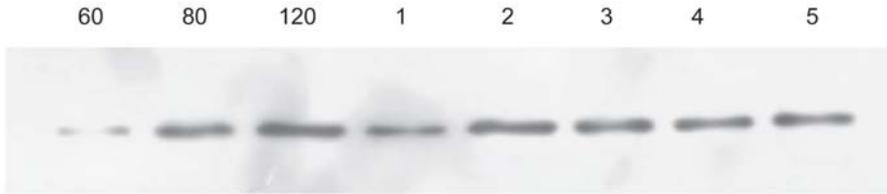


Figure 1 The western blot analysis of HSP70 in the HF crossbred bulls' spermatozoa. The first three lanes are 60, 80, 120 ng of standard recombinant HSP70. Lanes 1-5 depict the five representative bulls.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

HSP70 ในอสุจิของพ่อโคนม และผลของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ

ผลการศึกษาจากเทคนิค Western blot โดยใช้ monoclonal anti-HSP70 พบว่าอสุจิของพ่อพันธุ์โคนม ลูกผสมไฮลด์ไทร์ ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้มีการปรากฏของ HSP70 (Figure 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kamaruddin et al. (2004) และเมื่อคำนวณปริมาณ HSP70 ในอสุจิ โดยกราฟมาตรฐานที่ได้จากการใช้ recombinant rat HSP70 (HSP72) protein เป็นค่าอ้างอิง พบว่าปริมาณ HSP70 ในอสุจิของพ่อพันธุ์โคนม ลูกผสมไฮลด์ไทร์ ฟรีเซียน มีค่าอยู่ระหว่าง 3.15-14.02 ng/mg protein (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)

ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศต่อปริมาณ HSP70 ในอสุจิ

สภาพภูมิอากาศในโรงเรือนเลี้ยงพ่อโคนม (Table 1) มีอุณหภูมิเฉลี่ยในฤดูร้อนสูงกว่าฤดูฝนและฤดูหนาว ($P < 0.01$) ในขณะที่ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยในฤดูฝนสูงกว่าฤดูร้อนและฤดูหนาว ($P < 0.01$) โดยค่า THI เฉลี่ยในฤดูร้อนและฤดูฝนสูงกว่าในฤดูหนาว ($P < 0.01$) (Table 2) ซึ่งการวิเคราะห์ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศพบว่า มีอิทธิพลต่อปริมาณ HSP70 โดยพบว่าปริมาณ HSP70 ในอสุจิ ช่วงฤดูร้อนต่ำกว่าในฤดูฝนและในฤดูหนาว ($P < 0.01$) ตามลำดับ (Table 2)

ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละฤดูกาล ส่งผลกระทบต่อภาวะร่างกายของ

ร่างกาย ทำให้โคนมมีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางสรีรวิทยา เพื่อรักษาอุณหภูมิร่างกายให้คงที่ (Cunningham, 2002) โดยเมื่อค่า THI เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ความร้อนในร่างกายเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นร่างกายโคนมจำเป็นต้องมีการระบายความร้อน โดยใช้การเพิ่มอัตราการหายใจเป็นกลไกหลักในการระบายความร้อน (Koatdoko, 2008) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการตอบสนองต่อความร้อนในระดับเซลล์พบว่า ในเซลล์ร่างกายมีการตอบสนองต่อความร้อนโดยการปรับเปลี่ยนการสร้างโปรตีนขนาด 70 kDa ชนิด HSP70 เพิ่มสูงขึ้น เพื่อปกป้องเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อน (King et al., 2002; Sonna et al., 2002)

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณ HSP70 ในอสุจิต่ำในช่วงฤดูร้อน อาจไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในเซลล์ร่างกายตามที่ได้กล่าวไปแล้วเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม เป็นการศึกษาที่สอดคล้องกับการรายงานการศึกษาในเซลล์อสุจิของสุกรที่พบว่าปริมาณ HSP70 ในเซลล์อสุจิของสุกรในฤดูร้อนต่ำกว่าในฤดูหนาว (Huang et al., 2000) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าผลกระทบของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศต่อการมีอยู่ของ HSP70 ในเซลล์อสุจิอาจแตกต่างจากเซลล์ร่างกาย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์อสุจิมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนในกระบวนการสร้างอสุจิ เช่น การแบ่งตัวแบบไมโอซิสเพื่อลดโครโมโซมและการปรับเปลี่ยนรูปร่างให้กะทัดรัดโดยการจับไซโทพลาสซึมออกนอกเซลล์ (Parks et al., 2003) ส่งผลให้กระบวนการแสดงออกของยีน ได้แก่ การถอดรหัสและการแปลรหัสไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งอาจอธิบาย

Table 1 Mean, maximum, and minimum of temperature and humidity Index (THI), temperature, and humidity in the bull stall during the experimental period.

	Seasons			SEM
	Rainy	Winter	Summer	
Temperature and Humidity Index (THI)				
Mean	79.06 a	74.30 b	80.05 a	0.77
Maximum	83.71 a	79.08 b	86.01 a	0.89
Minimum	75.90 a	69.93 b	74.45 a	0.85
Temperature (°C)				
Mean	27.83 b	25.92 b	30.05 a	0.50
Maximum	32.43 b	30.60 b	37.18 a	0.74
Minimum	25.06 a	21.77 b	24.55 a	0.48
Humidity (%RH)				
Mean	78.91 a	64.37 b	62.30 b	2.31
Maximum	90.68 a	73.86 b	89.08 a	2.31
Minimum	60.86 a	48.26 b	40.22 c	2.31

Means within the same row with different letters differ significantly (P<0.01)

Table 2 Seasonal variation in least squares means of the level of HSP70 and semen quality traits in Holstein Friesian crossbred bulls.

	Seasons			SEM
	Rainy	Winter	Summer	
HSP70 (ng/μg protein)	6.70b	9.63 a	5.54 c	1.15
Volume (ml)	6.44	6.60	6.00	0.14
Sperm concentration (x 10 ⁶ /ml)	848.80	947.26	1040.10	29.62
Total sperm number per ejaculate (x 10 ⁶)	5670.60	6013.78	6226.31	218.00
Mass movement score (1-5)	2.32 b	2.92 a	2.05 b	0.12
Motility score (%)	73.15 a	70.15 b	69.74 b	0.53
Viable spermatozoa (%)	86.43	85.37	85.95	0.39
Total abnormal spermatozoa (%)	17.43 a	20.34 a	7.11 b	0.78
Primary abnormal spermatozoa (%)	1.42	1.41	1.76	0.09
Secondary abnormal spermatozoa (%)	16.00 a	18.92 a	5.73 b	0.72

Means within the same row with different letters differ significantly (P<0.01)

ได้ด้วยการศึกษาแบบ *in vitro* ในหนู mouse ที่รายงานว่าภายหลังจากเหนี่ยวนำเนื้อเยื่ออัณฑะด้วยความร้อน 43 °ซ พบว่า ปริมาณ HSP70 มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและตรวจไม่พบ HSP70mRNA ซึ่งงานทดลองดังกล่าวเสนอแนะว่า เซลล์อสุจิไม่สามารถตอบสนองต่อความร้อนได้ด้วยการสร้าง HSP70 (Zakeri et al., 1990)

ดังนั้น HSP70 ในเซลล์อสุจิอาจถูกสร้างขึ้นก่อนที่จะมีการหลั่งออกมาภายนอกร่างกาย ดังเช่นที่มีรายงานในคนและม้าที่พบว่า มีการสร้าง HSP70 ออกมาในช่วงปลายของขั้นตอน spermiogenesis (Huszar et al., 1998) และรายงานในหนูพบว่า มีการสร้าง HSP70 ออกมาในช่วงกระบวนการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (Eddy, 1998)

ปัจจัยทางสภาวะภูมิอากาศต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโคพบว่า ฤดูกาลมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิทั้ง การเคลื่อนที่แบบหมุนและการเคลื่อนที่รายตัว และมีอิทธิพลต่อจำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมด และอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ($P < 0.01$) โดยพบว่าในฤดูร้อนและฤดูฝน อสุจิมีการเคลื่อนที่แบบหมุนต่ำกว่าฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) (Table 2) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Moyerhoeffer et al. (1985) และ Soderquist et al. (1996) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (sperm plasma membrane) และกระทบต่อการแลกเปลี่ยนไอออนต่างๆ เช่น แคลเซียม (calcium channels) ซึ่งส่งผลต่อเนื้อทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง (Ladha et al., 1997; Si, 1997)

ข้อสังเกตสำคัญที่พบจากผลการศึกษาในครั้งนี้คือการพบว่าจำนวนอสุจิที่มีความผิดปกติทั้งหมดและอสุจิที่มีความผิดปกติแบบทุติยภูมิ ในฤดูหนาวและฤดูฝนสูงกว่าในฤดูร้อน ($P < 0.01$) (Table 2) ซึ่งเป็นผลที่อาจไม่สอดคล้องกับข้อสมมุติฐานเบื้องต้นว่า น้ำเชื้อโคมีคุณภาพต่ำในช่วงฤดูร้อน แม้ว่าจะไม่สามารถเชื่อมโยงความ เป็นเหตุเป็นผลของฤดูกาลต่อความผิดปกติของอสุจิในการศึกษาครั้งนี้ได้ชัดเจน แต่มีประเด็นที่น่าสนใจแต่มีประเด็นที่น่าสนใจคือ ความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงในช่วงฤดูฝนอาจส่งผลกระทบต่อความผิดปกติของอสุจิ (จตุพร และคณะ, 2545)

ความผิดปกติแบบทุติยภูมิ หมายถึง ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ในขณะที่อสุจิอยู่บริเวณท่อเอพิไดมิส และในการศึกษากับกลุ่มโคเดียวกันนี้มีรายงานความผิดปกติที่พบส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณหาง (สุรางคนา และคณะ, 2551) อย่างไรก็ตาม การศึกษาอิทธิพลของฤดูกาลต่อความผิดปกติของอสุจิโคนมในต่างประเทศ เช่น Soderquist et al. (1996) ที่ศึกษาในโคนมสวีเดนพบว่า ฤดูร้อนและฤดูใบไม้ผลิทำให้อสุจิมีความผิดปกติในส่วนหัวและส่วนหางเพิ่มสูงกว่าในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง

ความสัมพันธ์ระหว่าง HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื้อ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ HSP70 ในอสุจิกับคุณภาพน้ำเชื้อพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างปริมาณ HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื้อมีค่าค่อนข้างต่ำ (Table 3) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ามีปัจจัยหลายประการที่มีความเกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อ โดยเฉพาะปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อคุณภาพ (Fuerst-Waltl et al., 2006) และเมื่อพิจารณาในส่วนของโปรตีนพบว่า นอกจาก HSP70 ที่มีความเกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อ (Huszar et al., 1998; Huang et al., 2000, Turba et al., 2007) แล้วยังมีโปรตีนอื่นๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนม เช่น bovine seminal plasma protein (BSP) (Nauc and Manjunath, 2000) และโปรตีนจาก cauda epididymis fluid (CEF) (Moura et al., 2006) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า ปริมาณ HSP70 ในอสุจิมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเคลื่อนที่แบบหมุน จำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมดและอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ($P < 0.01$) (Table 3)

ความสัมพันธ์ของ HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโคที่พบในการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Turba et al. (2007) ที่พบว่า ปริมาณ HSP70 ในอสุจิมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเคลื่อนที่แบบหมุน โดยหากเซลล์อสุจิมีปริมาณ HSP70 สูงเซลล์อสุจิจะมีการเคลื่อนที่ที่ดี ซึ่งกลไกที่อาจอธิบายความสัมพันธ์นี้เป็นรายงานการศึกษาในคนและม้าที่พบว่า HSP70 มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนปรับเปลี่ยนรูปร่าง (spermiogenesis) โดยเซลล์อสุจิของคนและม้าจะมีการสร้าง HSP70 (ชนิดที่พบเฉพาะในเซลล์อสุจิ) ออกมาในช่วงปลายของขั้นตอน spermiogenesis เพื่อทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์อสุจิจากเซลล์ spermatid เป็น spermatozoa และเคลื่อนที่เข้าสู่เอพิไดมิส โดยในขั้นตอนนี้ไซโทพลาสซึมจะถูกบีบไล่ออกไปจากเซลล์อสุจิ ตามด้วยการเกิด plasma membrane remodeling ซึ่งต้องใช้ HSP70 ชนิด

Table 3 Correlation coefficients (r) of the level of HSP70 and semen quality traits in Holstein Friesian crossbred bulls.

Semen quality traits	r
Volume (ml)	0.02
Sperm concentration (x 10 ⁶ /ml)	-0.02
Total sperm number per ejaculate (x 10 ⁶)	-0.03
Mass movement score (1-5)	0.36**
Motility score (%)	-0.02
Viable spermatozoa (%)	-0.06
Total abnormal spermatozoa (%)	0.47**
Primary abnormal spermatozoa (%)	0.05
Secondary abnormal spermatozoa (%)	0.47**

** P<0.01

ดังกล่าวช่วยในการเคลื่อนย้ายโปรตีนจึงจะทำให้กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (Huszar et al., 1998) ดังนั้นการขาด HSP70 จะทำให้อสุจิที่เข้าสู่เอพิไดโดมิส เป็นอสุจิที่ยังไม่มีการพัฒนาโตเต็มที่ ยังมีส่วนของไซโทพลาสซึมติดค้างอยู่ (cytoplasm retention) และอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของอสุจิ อย่างไรก็ตามในโคนมยังไม่มีการศึกษาถึงชนิดและการสังเคราะห์ของ HSP70 ในขั้นตอน spermiogenesis และขั้นตอนอื่นๆในกระบวนการสร้างอสุจิ แต่มีความเป็นไปได้ว่าอาจมีการกลไกที่เหมือนกัน เนื่องจาก Kamaruddin (2004) รายงานว่ามีการปรากฏของ HSP70 ในเซลล์อสุจิระยะ spermatid

ในการทำงานเดียวกัน ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณ HSP70 ในเซลล์อสุจิกับอสุจิผิดปกติทั้งหมดและอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ (P<0.01) (Table 3) ของโคนมในครั้งนี้สอดคล้องกับที่มีการศึกษาในคนและสัตว์ตระกูลฟันแทะ พบว่าการมีอยู่ของ HSP70 ในอสุจิ อาจมีความจำเพาะต่อหน้าที่เฉพาะในกระบวนการสร้างอสุจิ เช่นเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิของหนู (Dix et al., 1996) การปรับเปลี่ยนรูปร่างในกระบวนการสร้างอสุจิของคน (Huszar et al., 2000) ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว และในคนยังพบว่าการขาด HSP70 มีผลให้เกิด

ความผิดปกติของโครโมโซมแบบ aneuploidy (Kovanci et al., 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาเรื่องบทบาทของ HSP70 ในคน และกลุ่มสัตว์ทดลอง เช่น หนู ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางและลึกซึ้ง ทำให้ทราบว่า HSP70 ที่พบในเซลล์อสุจิมียหลายชนิด ตัวอย่างเช่นในเซลล์อสุจิของคนพบว่า HSP70 ชนิด HspA2 (human homologue of mouse Hsp70-2) เป็นชนิดที่พบเฉพาะในเซลล์อสุจิเท่านั้นและมีการสังเคราะห์ขึ้นในช่วงกระบวนการ spermeiogenesis มีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายโปรตีน (Huszar et al., 1998) และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับอสุจิผิดปกติ (Gergely et al., 1999) ในขณะที่เซลล์อสุจิหนู mouse พบ HSP70 อย่างน้อย 4 ชนิด คือ HSP70-1, HSP70-2, HSP70-3 และ HSP70.2 โดยชนิด HSP70.2 พบเฉพาะในอสุจิ และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการ meiosis (Rockett et al., 2001) นอกจากนี้ในเซลล์อสุจิของสุกรยังพบ HSP70 จำนวน 4 ชนิด คือ HSC70a, HSC70c, HSP70e และ P70t โดยชนิด P70t เป็นชนิดที่พบเฉพาะในเซลล์อสุจิ (Huang et al., 2005) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์อสุจิของพ่อโคนมพันธุ์ไฮลส์ไตน์ ฟรีเซียน อาจมี HSP70 หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีการสังเคราะห์และมีความสัมพันธ์อย่างไรกับคุณภาพน้ำเชื้อในแต่ละลักษณะจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามี HSP70 ในเซลล์อสุจิของพ่อพันธุ์โคนมลูกผสมไฮลด์สไตน์ ฟรีเซียน โดยพบว่าในฤดูร้อนมีปริมาณ HSP70 ต่ำกว่าในฤดูหนาวและฤดูฝน ในทำนองเดียวกัน ในฤดูร้อนและฤดูฝน อสุจิมีการเคลื่อนที่แบบหุ้มต่ำกว่าในฤดูหนาว และในฤดูร้อนมีจำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมดและอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิต่ำที่สุด โดยพบว่าปริมาณ HSP70 ในอสุจิมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเคลื่อนที่แบบหุ้มจำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมดและอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ดังนั้น จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จึงอาจกล่าวได้ว่า การมีปริมาณ HSP70 ต่ำในช่วงฤดูร้อน ทำให้เซลล์อสุจิมีการเคลื่อนที่แบบหุ้มต่ำและมีจำนวนอสุจิผิดปกติน้อย

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืนและศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (มหาวิทยาลัยขอนแก่น) โครงการพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และขอขอบคุณศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมผสมเทียมล้าพญากลาง จ.ลพบุรี ที่สนับสนุนน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมไฮลด์สไตน์ ฟรีเซียน

เอกสารอ้างอิง

- จตุพร สิงห์ศักดิ์, สุภร กตเวทิน, สุจินต์ สิมารักษ์, มงคล ไปรงเจริญ, มนต์ชัย ดวงจินดา, ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง, และ สินชัย วิโรจน์วุฒิกุล. 2545. ผลของอุณหภูมิและความชื้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ในพ่อพันธุ์โคนมไฮลด์สไตน์ ฟรีเซียน. ใน: ประชุมวิชาการสัตวแพทย์ สัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3 28-29 มกราคม 2545. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- สุรางคณา สุขเลิศ, สุภร กตเวทิน, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, และ ยุพิน ผาสุข. 2551. ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพแวดล้อมในช่วงเวลาการพัฒนาอสุจิระยะต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโคไฮลด์สไตน์ ฟรีเซียน. น. 225-228. ใน: ประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 4 เรื่องพลังงานทดแทน แก่นเกษตรยั่งยืน พื้นที่วังเวียงสวรรค์ น้อมรับพระราชดำริ 31 ม.ค. 2551. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- Austin, C.R., and R.V.Short. 1990. Germ cell and fertilization. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bradford, M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Casady, R.B., R.M. Myers, and J.E.legates. 1953. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. *J. Dairy Sci.* 36: 14-23.
- Cunningham, J.G. (2002). *Textbook of Veterinary Physiology*. 3rded. Philadelphia. Pennsylvania: An imprint of Elsevier Science.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collin, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding, and E.M. Eddy. 1996. Targeted gene disruption of Hsp70.2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Dev. Biol.* 93: 3264-3268.
- Eddy, E.M. 1998. HSP70-2 heat shock protein of mouse spermatogenic cells. *J. Exp. Zool.* 282: 261. (Abstr.).
- Fuerst-Waltl, B., H. Schwarzenbacher, C. Perner, and J. Solkner. 2006. Effect of age and environment factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 95: 27-37.
- Gergely, A., J. Szollosi, G. Falkai, B. Resch, L. Kovacs, and G. Huszar. 1999. Sperm creatine kinase activity in normospermic and oligospermic hungarian men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16: 35-40.
- Guerriero, J.R., and D.A. Raynes. 1990. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. *J. Anim. Sci.* 68: 2779-2783.

- Huang, S.Y., M. Tam, Y. Hsu, J. Lin, H. Chen, C. Chuang, M. Chen, Y. King, and W. Lee. 2005. Developmental changes of heat-shock proteins in porcine testis by a proteomic analysis. *Theriogenology* 64: 1940-1955.
- Huang, S.Y., Y.H. Kuo, Y.P. Lee, H.L. Tsou, E.C. Lin, C.C. Ju, and W.C. Lee. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 231-240.
- Husza, G., K. Stone, D. Dix, and L. Vigue. 2000. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol. Reprod.* 63: 925-932.
- Husza, G., P. Patrizio, L. Vigue, M. Willets, C. Wilker, D. Adhoot, and L. Johnson. 1998. Cytoplasmic extrusion and switch from creatine kinase b to m isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. *J. Androl.* 19: 11-20.
- Kamaruddin, M., T. Kroethch, P.K. Basrur, P.J. Hansen, and W.A. King. 2004. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia.* 36: 327-334.
- King, Y.T., C.S. Lin, J.H. Lin, and W.C. Lee. 2002. Whole-body hyperthermia-induced thermotolerance is associated with the induction of heat shock protein 70 in mice. *J. Exp. Biol.* 205: 273-278.
- Koatdoke, U. (2008). Comparative study on physiological mechanism and cellular responses related to heat tolerance between *Bos indicus* and *Bos taurus*. Ph.D. Thesis in Animal Science The Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen.
- Kovanci, E., L. Vigue, P. Bray-Ward, D.C. Ward, and G. Huszar. 2000. Lack of the HSP70-2 chaperone is associated with meiotic defects and cytoplasmic retention in human sperm: relationship chromosomal aneuploidy and sperm immaturity. *Fertil. Steril. (Suppl):* S29.
- Ladha, s., P. S. James, D. C. Clark, E. A. Howes, and R. Jones. 1997. Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. *J. Cell Sci.* 110: 1041-1050.
- Matwee, C., M. Kamaruddin, D.H. Betts, P.K. Basrur, and W.A. King. 2001. The effect of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 829-837.
- Moura, A. A., D. A. Chapman, H. KOC, and G. J. Killain. 2006. Proteins of the Cauda Epididymal Fluid Associated With Fertility of Mature Dairy Bulls. *J Androl.* 2006;27: 534-541.
- Moyerhoeffer, D.C., R.P. Wettemann, S.W. Coleman, and M.E. Wells. 1985. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. *J. Anim. Sci.* 60:352. (Abstr.).
- Nauc, V., and P. Manjunath. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 63: 1058-1066.
- Parks, J. E., D. R. Lee, S. Huang, and M. T. Kaproth. 2003. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 59: 73-86.
- Ravagnolo, O., I. Miszal, and G. Hoogenboomt. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci.* 83: 2120-2125.
- Rockett, J.C., F.L. Mapp, J.B. Garges, J.C. Luft, C. Mori, and D.J. Dix. 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol. Reprod.* 65: 229-239.
- Sailer, B.L., L.J. Sarkar, J.A. Bjordahl, L.K. Jost, and D.P. Evenson. 1997. Effect of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J. Androl.* 18: 294-301.
- SAS. 1985. SAS/STAT.™Guide for Personal Computer. Version 6 ed., SAS institute INC., North Carolina.
- Si, Y. 1997. Temperature-Dependent Hyperactivated Movement of Hamster Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 1407-1402.
- Soderquist, L., L. Janson, M. Haard, and S. Einarsson. 1996. Influence of season, breed and some other factor on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I.bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 44: 91- 98.
- Sonna, L.A., S.L. Gaffin, R.E. Prattand, M.L. Cullivan, K.C. Angel, and C.M. Lilly. 2002. Molecular biology of thermotolerance selected contribution: effects of acute heat shock on gene expression by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* 92: 2208-2220.
- Theodorakis, N.G., D. Drujan, and A.D.Maio. 1999. Thermotolerant cells show an attenuated expression of HSP70 after heat shock. *J. Biol. Chem.* 274: 12082-12086.

- Turba, M. E., P. Fantinati, C. B. F. Gentilini, M. L. Bacci, and M. Forni. 2007. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 99: 72-81.
- Zakeri, Z.E., W.J. Welch, and D.J. Wolgemuth. 1990. Characterization and inducibility of hsp 70 proteins in the male mouse germ line. *J. Cell Biol.* 111: 1785-1792.