



## การศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับการแสดงออกของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอบริเวณพีโอเอและเออาร์ซีของ สมองส่วนไฮโปทาลามัสในโคเนื้อ

เดชกมล ทรงผาสุข<sup>1</sup> นภสรณ์ วรรณพงษ์<sup>1</sup> นฤตม์ ทะนันททอง<sup>2</sup> และสมชัย สัจจาพิทักษ์<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

<sup>2</sup>ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

<sup>3</sup>ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

**บทคัดย่อ:** ปัจจุบันมีการศึกษายีนคิสวันในสมองส่วนไฮโปทาลามัสโดยทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เรียกว่า คิสเพติน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกของยีนคิสวันในตำแหน่งที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด และแตกต่างกันในเพศผู้กับเพศเมีย ซึ่งในโคยังไม่มีการศึกษามากนัก ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาเบื้องต้นของตำแหน่งการแสดงออกของยีนคิสวัน โดยวัดระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคิสวัน ด้วยวิธีโครโมจีนิกอินซิทูไฮบริไดเซชัน เพื่อดูการย้อมติดสีของเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ประสาทคิสเพตินที่บริเวณพีโอเอและเออาร์ซีในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยศึกษาในโคเนื้อ 3 ตัว ได้แก่ โคเพศเมีย โคเพศผู้ที่ตอนแล้ว โคเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน ผลการศึกษาพบว่าสมองส่วนพีโอเอ พบการติดสีของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนคิสวันในโคเพศเมียเท่านั้น จำนวน 64 เซลล์ และสมองส่วนเออาร์ซี พบการติดสีจำนวน 1,127, 1,064 และ 373 เซลล์ ในโคเพศเมีย โคเพศผู้ที่ตอนแล้ว และโคเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน ตามลำดับ ทั้งนี้การศึกษานี้เป็นเพียงการระบุตำแหน่งของคิสวันเอ็มอาร์เอ็นเอในสมองส่วนไฮโปทาลามัสของโคเนื้อเท่านั้น มิได้พิจารณาปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการแสดงออก เช่น ปัจจัยด้านสุขภาพ ความเครียด การเลี้ยงดู และอายุ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปต่อยอดและประยุกต์ใช้ในการจัดการระบบสืบพันธุ์ในโคต่อไป

**คำสำคัญ:** คิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอ คิสวันยีน พีโอเอ เออาร์ซี โคเนื้อ

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2564. 16(1): 99-107.

E-mail address: [fvetscs@ku.ac.th](mailto:fvetscs@ku.ac.th)

## Preliminary Study of Kisspeptin mRNA-expressing Neurons at POA and ARC in Hypothalamus of Beef Cattle

Techaphon Songphasuk<sup>1</sup> Napasaporn Wannapong<sup>1</sup> Narut Thanantong<sup>2</sup> and  
Somchai Sajapitak<sup>3,#</sup>

<sup>1</sup>Master of Science Veterinary Clinical Studies, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand; <sup>2</sup>Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand; <sup>3</sup>Department of Large Animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

**Abstract:** At present, there are more studies about the *Kiss1* gene in the hypothalamus that produce the kisspeptin proteins and have an important role in the reproductive system. The previous research found the location of expression of *Kiss1* gene is different about each species and sex. But, there are a few studies about the location of *Kiss1* gene in cattle. Therefore, the objective of this study was a preliminary study to localize *Kiss1* mRNA expression in the area of POA and ARC nucleus in the hypothalamus. By used a chromogenic *in situ* hybridization staining for *Kiss1* gene in the cattle brain revealed that kisspeptin neuronal populations were localized in the POA and ARC of the hypothalamus. This study used three cattle brains including one female, one castrated male, and one intact male. And the result showed that the expression of kisspeptin mRNA-positive cells in the POA was about 64 cells that only expressed in female cattle. And the expression of kisspeptin mRNA-positive cells in the ARC were 1,127, 1,064, and 373 in female, castrated male, and intact male cattle respectively. However, this study is only to specify the location of kisspeptin mRNA in cattle brains, without considering the factors that may affect the expression of kisspeptin mRNA including, health status, stress-induced, management and age. Therefore, further studies are required for developing and applying to reproductive management in cattle.

**Keywords:** Kisspeptin mRNA, *Kiss1* gene, POA, ARC, Beef cattle

<sup>#</sup>Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2021 16(1): 99-107.

E-mail address: [fvetscs@ku.ac.th](mailto:fvetscs@ku.ac.th)

### บทนำ

ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยการทำงานเป็นขั้นตอนต่อเนื่องกันของ สมองส่วนไฮโปทาลามัส ต่อมใต้สมองส่วนหน้า อัณฑะ

(เพศผู้) มดลูกและรังไข่ (เพศเมีย) โดยฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ที่สังเคราะห์มาจากรังไข่มีผลต่อการ ควบคุมแบบย้อนกลับเชิงบวก (positive feedback) และการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ (negative

feedback) ต่อการผลิตและหลั่งสารสื่อประสาท โกลาโดโทรปิน รีลีสซิงฮอว์โมน (gonadotropin releasing hormone, GnRH) มากระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้สร้างและหลั่งฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอว์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) และฮอว์โมนลูทิไนซิง (lutinizing hormone, LH) ซึ่งถูกควบคุมด้วยรูปแบบ pulse mode และ surge mode ( Chaikhun, Sotthibandhu, & Suadsong, 2013)

จากการศึกษาในหนูพบว่า เซลล์ประสาท GnRH ไม่มีการแสดงออกของตัวรับต่อฮอว์โมนเอสโตรเจนชนิดแอลฟา (alpha-estrogen receptor), ฮอว์โมนโปรเจสเตอโรน และฮอว์โมนแอนโดรเจน แต่พบการแสดงออกของตัวรับต่อฮอว์โมนดังกล่าวบนเซลล์ประสาทคิสเพปติน (kisspeptin neuron) และหากถูกกระตุ้นจะเกิดการหลั่งเพปไทด์ฮอว์โมน คือ คิสเพปติน ไปจับกับตัวรับจีพีอาร์<sup>54</sup> (glycoprotein coupled receptor, GPR-54) ที่อยู่บนเซลล์ประสาท GnRH (Pinilla, Aguilar, Dieguez, Millar, & Tena-Sempere, 2012) ซึ่งเซลล์ประสาทคิสเพปตินพบ อยู่ภายในสมองส่วนแอนเทอโรเวนทรัล เพอริเวนทริคิวลาร์ (anteroventral periventricular nucleus, AVPV) เป็นกลุ่มนิวเคลียสของเซลล์ประสาททางด้านหน้าของสมองส่วนไฮโปทาลามัส และ อาร์คิวเอต (arcuate nucleus, ARC) เป็นนิวเคลียสส่วนท้ายของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (d'Anglemont de Tassigny & Colledge, 2010) โดยบริเวณที่พบเซลล์ประสาทคิสเพปตินจะเป็นบริเวณ ARC และ AVPV หรือ POA จะแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด เช่น ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เคยมีการศึกษาในแกะเป็นหลัก บางส่วนในแพะและโค พบว่าในแกะมีการแสดงออกของคิสเพปตินในอาร์คิวเอตนิวเคลียส เป็นต้น (Chaikhun et al., 2013)

เซลล์ประสาทคิสเพปตินที่อยู่ภายในสมองส่วน ARC เกี่ยวข้องกับการหลั่งฮอว์โมน GnRH, LH และ FSH ในรูปแบบ pulse mode ซึ่งอยู่ภายใต้อิทธิพลการ

ควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ ของฮอว์โมนเอสโตรเจน และแอนโดรเจน ก่อให้เกิดการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล (follicle) ในรังไข่ของเพศเมีย และ กระตุ้นการทำงานของเซลล์เลย์ดิก (leydig cell) ในอัณฑะของเพศผู้ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ประสาทคิสเพปตินที่อยู่ภายในสมองส่วน AVPV และ POA จะเกี่ยวข้องกับการหลั่งฮอว์โมน GnRH ในรูปแบบ surge mode ซึ่งอยู่ภายใต้อิทธิพลการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงบวก ของฮอว์โมนเอสโตรเจน ทำให้เกิดการตกไข่ (ovulation) ในเพศเมีย (Chaikhun et al., 2013)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ได้มีการศึกษาในสัตว์ประเภทกระบือ สุกร แกะ แพะ หนูบ้าน หนูหริ่ง และคน (Chaikhun-Marcou et al., 2016; Chaikhun et al., 2013; Pinilla et al., 2012; Sajapitak et al., 2014) มาแล้ว ซึ่งยังไม่มีการศึกษาโดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ POA ในสมองส่วนไฮโปทาลามัสในโค แต่บริเวณตำแหน่งของ ARC ได้มีการศึกษามาบางส่วน (Sajapitak, Lertwatcharasarakul, Phattanakunanan, Moonjit, & Thanantong, 2016) ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงตำแหน่งการแสดงออกของคิสวันเอ็มอาร์เอ็นเอ (*Kiss1* mRNA) ที่บริเวณของ POA และ ARC ด้วยวิธีโครโมจินคินฮิโตไฮบริไดเซชัน (chromogenic *in situ* hybridization) เพื่อดูการย้อมติดสีของ *Kiss1* mRNA ในเซลล์ประสาทคิสเพปติน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การคัดเลือกโคและเก็บตัวอย่าง

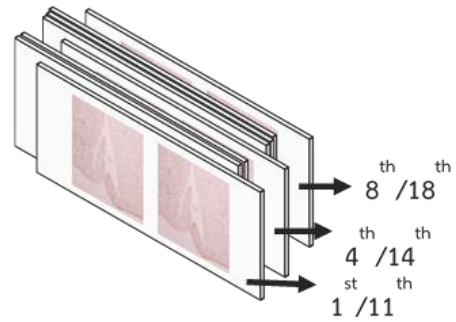
เก็บตัวอย่างสมองจากโคเนื้อพันธุ์ผสม 3 ตัว ได้แก่ โคเพศเมียที่อยู่ในระยะลูทีล (luteal phase) ของวงจรการเป็นสัด โคเพศผู้ที่ถูกตอนที่อายุประมาณ 1 ปีและโคเพศผู้ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (โคเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน) โดยโคทั้งสามตัวมีช่วงอายุ 1.5-2 ปี มาจากฟาร์มและโรงฆ่าสัตว์แห่งเดียวกัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการประเมินสุขภาพของโค และเก็บตัวอย่างสมอง

ไฮโปทาลามัส บริเวณที่เป็นส่วนขยายจากตำแหน่งของออฟติกไคแอสมา (optic chiasma) จนถึงส่วนท้ายของแมมมิลลารีบอดี (nucleus of the mammillary body) (Salehi, 2013) หลังจากที่ถูกเสียชีวิตภายใน 15 นาที นำตัวอย่างมาเก็บรักษาในแม่พิมพ์ความเย็น (cryoblock) ที่มีสารรักษารักษาชิ้นเนื้อ (embedded cryostat medium; Killik®) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่กระบวนการถัดไป

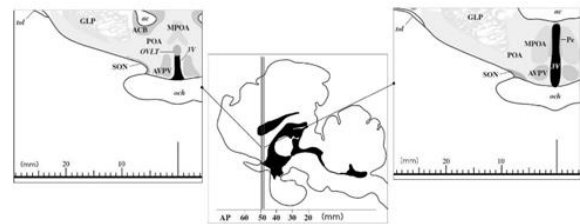
#### การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างสมองออกจากแม่พิมพ์ความเย็น แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแช่แข็ง (Semi-Automatic Cryostat Microtome) ที่ความหนา 20 ไมครอน ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเริ่มเก็บตัวอย่างสมองตรงตำแหน่งที่มีนิวเคลียสของ POA ด้วยการตัดขวางขึ้นตัวอย่างสมองตั้งแต่บริเวณที่พบโพรงสมองที่ 3 (3<sup>rd</sup> ventricle) และออฟติกไคแอสมา (optic chiasma) จนถึงสิ้นสุดการตัดเมื่อไม่พบออฟติกไคแอสมาปรากฏบนหน้าตัดชิ้นตัวอย่าง ดังรูปที่ 2 (Salehi, 2013) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสมองตำแหน่งที่มีนิวเคลียส ARC โดยตัดตัวอย่างสมองต่อจากกระบวนการก่อนหน้านี้ และสิ้นสุดการตัดเมื่อถึงตำแหน่งของแมมมิลลารีบอดี (nucleus of the mammillary body) ซึ่งถือเป็นตำแหน่งที่บ่งชี้ว่าสิ้นสุดบริเวณที่มีนิวเคลียส ARC แล้วดังรูปที่ 3 อ้างอิงตำแหน่งจากแผนภาพแสดงตำแหน่งนิวเคลียสในสมองโค

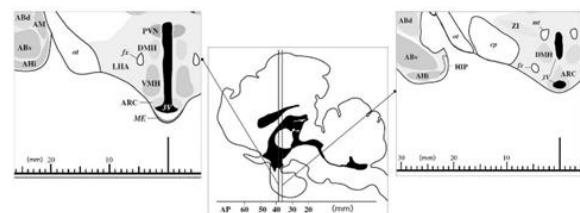
สุมเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองด้วยวิธี systematic sampling โดยทุกๆความหนา 200 ไมครอน จะเก็บเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น (ดังรูปที่ 1) โดยเนื้อเยื่อจะถูกวางลงบนสไลด์ที่มีประจุไฟฟ้าเป็นบวก (positive charge microscope slides) สไลด์ละ 2 ชิ้นเนื้อ ได้ทั้งหมด 18 สไลด์ เป็นจำนวน 36 ชิ้นเนื้อต่อนิวเคลียส จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อสมองไปทำการตรวจหาเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอต่อไป



รูปที่ 1 ภาพการสุมตัวอย่างสไลด์ของเนื้อเยื่อสมอง



รูปที่ 2 แผนผังแสดงบริเวณพื้นที่การตัดขวางชิ้นตัวอย่างสมอง ตั้งแต่บริเวณขอบเขตของเพอริเวนทริคิวลาร์นิวเคลียส (anteroventral periventricular nucleus, AVPV) ในตัวอย่างสมองโคเนื้อ (ลูกศร), ที่มา: Okamura (2002)



รูปที่ 3 แผนผังแสดงบริเวณพื้นที่การตัดขวางชิ้นตัวอย่างสมองตั้งแต่บริเวณขอบเขตของอาร์คิวเอตนิวเคลียส (arcuate nucleus, ARC) ในตัวอย่างสมองโคเนื้อ (ลูกศร), ที่มา: Okamura (2002)

#### การวัดระดับการแสดงออกของ *Kiss1* mRNA

ด้วยวิธี Chromogenic *in situ* hybridization สังเคราะห์ RNA probe ซึ่งติดฉลากด้วย DIG (Digoxigenin,

DIG) โดยมีลำดับเบสตาม GenBank accession No. AB466319.1 ณ ตำแหน่งเบสที่ 150 – 474

ขั้นตอน pre-hybridization นำสไลด์มาแช่ในสารละลาย 4% PFA พร้อมเขย่า 65 RPM ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 1xPBS แล้วนำสไลด์ที่ได้มา incubate ด้วย PBS ที่มี proteinaseK ที่มีความเข้มข้น 1 µg/mL ล้างด้วย 1xPBS จากนั้นนำมาจุ่มลง 4% PFA อีกครั้ง ล้างด้วย 1xPBS แล้วนำสไลด์มาแช่ลง 0.2 % Glycine และสุดท้ายนำมาแช่ในสารละลาย 0.2N HCl แล้วล้างด้วย 1xPBS

ขั้นตอน hybridization เตรียมสารละลาย hybridization buffer นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม probe ที่ได้ทำการติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin โดยใช้ปริมาณ 1 µg/slide และใช้สไลด์ละ 150 µl นำสไลด์ไป hybridized ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ขั้นตอน post-hybridization นำสไลด์มาล้างด้วยสารละลาย 5xSSC / 50%formamide แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ 1 µg/mL RNase working solution จากนั้นล้างด้วย 2xSSC, และ 0.2xSSC ตามลำดับ เมื่อล้างเสร็จนำสไลด์มา blocked ด้วย 1.5% blocking reagent (Roche) หลังจากนั้น Incubate สไลด์ ด้วย Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (1:250, Roche Applied Science) แล้วนำมาเติม Substrate โดยใช้ NBT/BCIP solution (Roche Applied Science)

#### การตรวจการแสดงออกของคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอ

ใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (light microscope) ดูการติดสีของเอ็มอาร์เอ็นเอของคิสเพปตินนิวรอน โดยเซลล์ที่พบมีลักษณะรูปร่างกลมรี (Crescent moon-appearance) ไฮโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินม่วงจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ที่อยู่บน Anti-DIG antibody และ NBT/BCIP ทำการนับจำนวนเซลล์และบันทึกผล

#### ผลการทดลอง

จากการทดลองตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์ประสาทคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอที่บริเวณ POA และ ARC ด้วยวิธี Chromogenic *in situ* hybridization พบว่าบริเวณที่พบเซลล์ที่มีการแสดงออกของคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ประสาทคิสเพปตินในสมองส่วนไฮโปทาลามัส มีลักษณะรูปร่างกลมรี ไฮโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินม่วง และนิวเคลียสกลมไม่ติดสี กระจายตัวอยู่รอบโพรงสมองที่ 3 (รูปที่ 4-9) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ในโคเนื้อ ซึ่งมีจำนวนดังตารางที่ 1

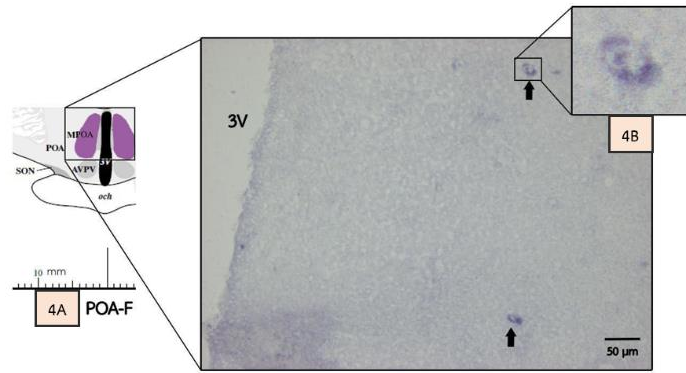
โดยพบว่าบริเวณสมองส่วนของ POA มีเพียงโคเพศเมียเท่านั้นที่มีการแสดงออกของ *Kiss1* mRNA บนเซลล์ประสาทคิสเพปติน และบริเวณสมองส่วนของ ARC พบการแสดงออกของ *Kiss1* mRNA ทั้งโคเพศเมีย โคเพศผู้ที่ยังไม่ได้ออกลูก และโคเพศผู้ที่ไม่ได้ออกลูก ตามลำดับ โดยในโคเพศเมียมีการแสดงออกของ *Kiss1* mRNA ในสมองส่วน ARC มากที่สุด

**ตารางที่ 1** จำนวนเซลล์ประสาทที่มีการแสดงออกของคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอในสมองส่วนพีโอเอ (POA) และส่วนเออาร์ซี (ARC) (โดยนับจำนวนรวมของเซลล์ประสาทจาก 36 ชิ้นตัวอย่างเนื้อเยื่อสมองที่ตัดในแต่ละนิวเคลียสของสมองโคเนื้อ)

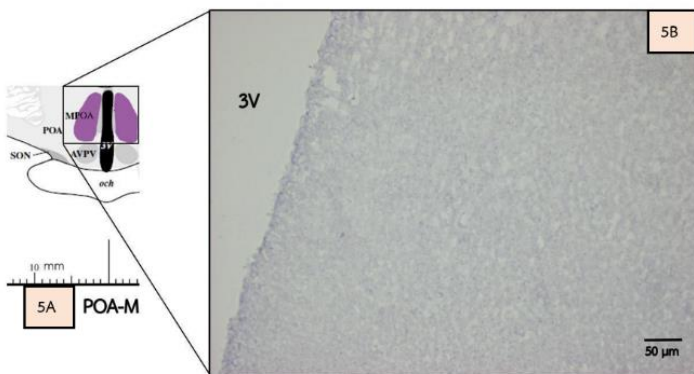
| Beef cattle    | Brain section (area) |       |
|----------------|----------------------|-------|
|                | POA                  | ARC   |
| Female         | 64                   | 1,127 |
| Castrated male | 0                    | 1,064 |
| Intact male    | 0                    | 373   |

#### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

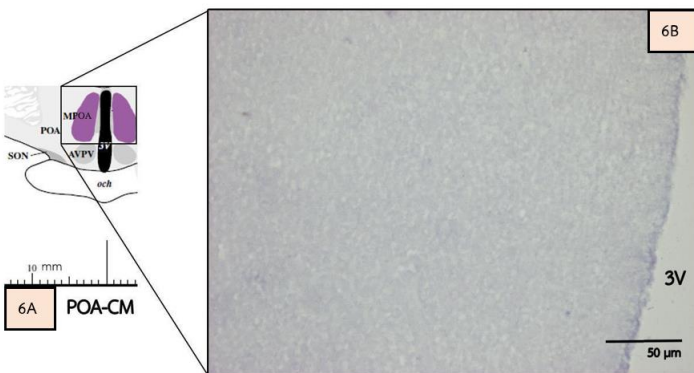
จากผลการศึกษาพบว่าในตัวอย่างสมองของโคเนื้อ มีการแสดงออกของยีน *Kisspeptin* mRNA-positive cell ภายในบริเวณเออาร์ซี (Arcuate



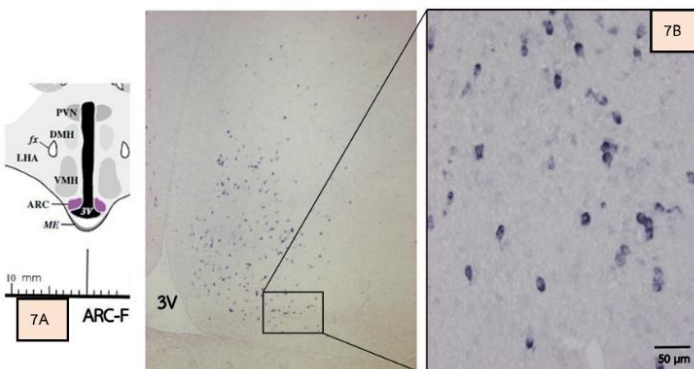
**รูปที่ 4** แผนผังแสดงตำแหน่ง (4A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002)และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณพีโอเอ (Preoptic area; POA) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศเมีย (4B)



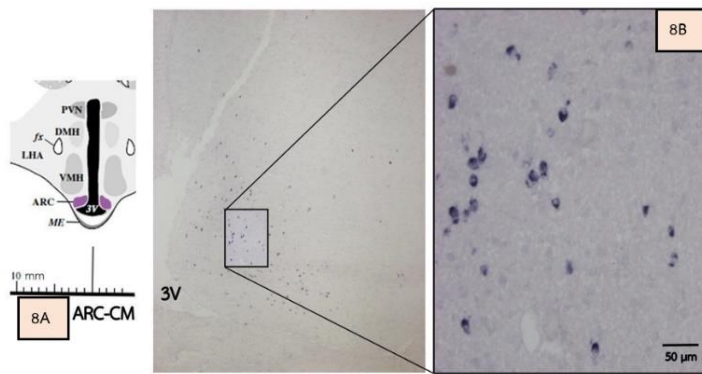
**รูปที่ 5** แผนผังแสดงตำแหน่ง (5A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002)และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณพีโอเอ (Preoptic area; POA) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศผู้ไม่ตอน (Intact male) (5B)



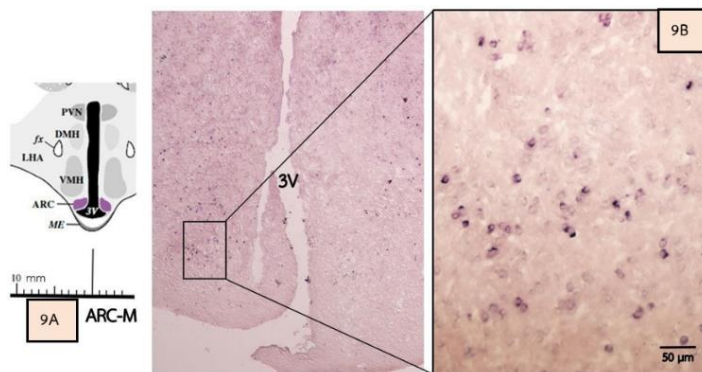
**รูปที่ 6** แผนผังแสดงตำแหน่ง (6A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002)และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณพีโอเอ (Preoptic area; POA) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศผู้ตอน (castrated male) (6B)



**รูปที่ 7** แผนผังแสดงตำแหน่ง (7A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002)และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณเออาร์ซี (Arcuate nucleus; ARC) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศเมีย (Female) (7B)



**รูปที่ 8** แผนผังแสดงตำแหน่ง (8A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002) และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณเออาร์ซี (Arcuate nucleus; ARC) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศผู้ตอน (castrated male) (8B)



**รูปที่ 9** แผนผังแสดงตำแหน่ง (9A) ที่มาภาพ: (Okamura, 2002) และการแสดงออกของยีน Kisspeptin mRNA-positive cell บริเวณเออาร์ซี (Arcuate nucleus; ARC) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ของโคเนื้อ เพศผู้ไม่ตอน (Intact male) (9B)

nucleus; ARC) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งแสดงผลเหมือนกันกับในแกะที่พบการแสดงออกดังกล่าวในบริเวณเดียวกัน และตัวอย่างส่วนของสมองไฮโปทาลามัสบริเวณ POA ของโคเนื้อทั้ง 3 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ประสาทของโคเพศเมียเท่านั้นจำนวน 64 เซลล์ (รูปที่ 4-6) เนื่องจากโคเพศผู้ไม่มีกลไกการทำงานของ GnRH และ LH แบบ surge mode และตัวอย่างสมองของโคเพศเมียที่นำมาทดลอง เป็นโคที่อยู่ในระยะลูทีลเฟส ด้วยการตรวจพบคอร์ปัสลูเทียมบนรังไข่ของซากโค แต่หากพิจารณาจากการติดสีของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอในสมองส่วน POA เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถบอกได้ว่าวงจรการเป็นสัดของโคตัวนี้อยู่ในระยะลูทีลเฟส (luteal phase) หรือ ระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) แต่จากการศึกษาในแกะเพศเมียยังพบว่า การติดสีของเซลล์ประสาทคิสเพตินบริเวณ POA สามารถพบได้ตลอดระยะวงจรการเป็นสัด เพียงแต่จะพบการติดสีของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอจำนวนมากในช่วงการเกิด LH

surge ในช่วงท้ายของระยะฟอลลิคูลาร์ (late-follicular phase) (Smith, Li, Pereira, & Clarke, 2009) ทั้งนี้จำนวนเซลล์ประสาทที่ติดสีในการศึกษานี้ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นจำนวนที่มากหรือน้อย เนื่องจากการทดลองนี้มีโคเพศเมียเพียงตัวเดียว

สมองไฮโปทาลามัสส่วน ARC พบจำนวนการติดสีของเซลล์ประสาทคิสเพตินเรียงลำดับจากมากไปน้อย (รูปที่ 7-9) ได้แก่ โคเพศเมีย โคเพศผู้ที่ตอนแล้ว และโคเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน ตามลำดับ โดยคาดว่าโคเพศเมียตัวนี้อยู่ในช่วงที่มีการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ (negative feedback) ต่อสมองไฮโปทาลามัสส่วน ARC กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ คิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอจึงพบเซลล์ประสาทคิสเพตินที่ติดสีจำนวนมาก ส่วนในโคเพศผู้ที่ตอนแล้วจะไม่มีฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่สร้างจากอัณฑะ จึงมีการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ (negative feedback) ต่อสมองไฮโปทาลามัสส่วน ARC กระตุ้นให้มีการแสดงออกของคิสเพตินเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ประสาทคิสเพติน จึงพบเซลล์ที่ติดสีจำนวนมากในโค

เพศผู้ที่ไม่ได้ตอน แต่จากผลการทดลองจำนวนเซลล์ประสาทคิสเพปติน มีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องมาจากสมองโคที่ได้อาจมาจากโรงฆ่าสัตว์อาจมีปัจจัยด้านสุขภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้นำปัจจัยต่างๆ เช่น สุขภาพ ความเครียด การเลี้ยงดู สมดุลพลังงาน และอายุที่อาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาแสดงออกของเซลล์ประสาทคิสเพปตินมาพิจารณาด้วย

โคเพศผู้ที่ยังไม่ตอนจะมีความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสเลือดสูงกว่าโคเพศผู้ที่ตอนแล้ว และส่งผลกระทบต่อควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ (negative feedback) ทำให้พบการแสดงออกของคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอในเซลล์ประสาทคิสเพปตินน้อย จึงพบจำนวนการติดสีในสมองน้อยกว่าวักลุ่มอื่น

นอกจากนี้การศึกษานี้มีตัวอย่างเพียง 3 ตัวอย่าง ซึ่งผู้ทำการทดลองใช้เป็นตัวแทนของประชากรในแต่ละกลุ่มคือ โคเพศเมีย โคเพศผู้ที่ตอนแล้ว และโคเพศผู้ที่ไม่ได้ตอน กลุ่มละ 1 ตัวอย่าง ผลการทดลองจึงบอกได้ถึงตำแหน่งการแสดงออกของคิสเพปตินเอ็มอาร์เอ็นเอเท่านั้นและแนวโน้มของจำนวน kisspeptin neuron ของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งการศึกษารั้งต่อไปอาจเพิ่มจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกลุ่ม ทั้งนี้ควรควบคุมปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาแสดงออกของคิสเพปตินด้วย

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรผู้ร่วมงานที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการทำงานวิจัย รวมถึงได้รับการสนับสนุนการดำเนินโครงการค่าใช้จ่ายจากกองทุนพัฒนานิสิตของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

ABCAM. 2001. In Situ Hybridization Protocol.

Bates , P. J., G. Sanderson, S. T. Holgate, S. L. Johnston. 1997. 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. 67: 153–160.

Chaikhun-Marcou, T., P. Sotthibandhu, V. Kyle, S. H. Yeo, W. H. Colledge, and S. Suadsong. 2016. Evidence of kisspeptin receptor expression in GnRH neurons in the preoptic area and arcuate hypothalamic nuclei in cycling buffaloes. Thai J. Vet. Med. 46(3): 381-390.

Chaikhun, T., P. Sotthibandhu, and S. Suadsong. 2013. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction of Ruminants. Thai J. Vet. Med. 43(1): 7-14.

Daniel, J. A., C. D. Foradori, B. K. Whitlock, and J. L. Sartin. 2015. Reproduction and Beyond, Kisspeptin in Ruminants. J. Anim. Sci. Biotechnol. 6(1): 23.

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

Dungan, H. M., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 2006. Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin - Releasing Hormone Secretion. Endocrinology. 147(3): 1154–1158.

Moore, A. M., L. M. Coolen, D. T. Porter, R. L. Goodman, and M. N. Lehman. 2018. KNDy Cells Revisited. Endocrinology 159(August): 3219–3234.

- Okamura, H. 2002. Brain atlas of cattle. Tokyo.
- Pinilla, L., E. Aguilar, C. Dieguez, R. P. Millar, and M. Tena-Sempere. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92(3): 1235-1316.
- Sajapitak, S., I. Fhaikruae, P. Bussabong, K. Pakkarano, T. Tiwanon, H. Markshom, and N. Thanantong. 2014. A Pilot Study of Kisspeptin Neurons in a Hypothalamus Area in Swamp Buffalo. *J. Kasetsart Vet.* 24(3): 117-126.
- Sajapitak, S., P. Lertwatcharasarakul, S. Phattanakunanan, P. Moonjit, and N. Thanantong. 2016. Preliminary Study of Kisspeptin Neurons in the ARC of the Hypothalamus in Beef Cattle. *J. Kasetsart Vet.* 26(1): 24-33.
- Salehi, M. S. 2013. A simple method for isolation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei of the rat hypothalamus. *Anatomy (International Journal of Experimental and Clinical Anatomy)*. 6-7: 48-51.
- Smith, J. T., Q. Li, A. Pereira, and I. J. Clarke. 2009. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 150(12): 5530-5538.

