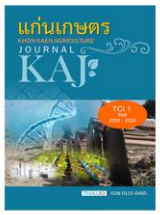
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



ผลของความเครียดจากความร้อนต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการแสดงออกของ heat shock protein ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมือง

The effect of heat stress on apoptosis and heat shock protein expression in fibroblast cells derived from native chicken embryos

ปริธาน ศรีถาการ[1], สุรชัย สุวรรณลี[1], เชาวลิต ยั่วจิตร[2], จินดา กลิ่นอุบล[1] และ ชวลิต ศิริบูรณ์[1]*

Parithan Srithakan[1], Surachai Suwanlee[1], Chaowalit Yuajit[2], Jinda Glinubon[1] and Chawalit Siriboon[1]*

[1] *ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย 34190*
[1] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190*
[2] *กลุ่มวิชาแพทยศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ประเทศไทย 34190*
[2] *College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190*

บทคัดย่อ: การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเครียดจากความร้อนต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis และระดับการแสดงออกของ heat shock protein (HSP) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมือง เซลล์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองประดู่หางดำเชียงใหม่ (PC) และประดู่หางดำมข.55 (PK) ถูกนำมาเลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม; 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง) และทดสอบความเครียดจากความร้อน (42 องศาเซลเซียส 6, 12 และ 24 ชั่วโมง) เพื่อวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการแสดงออกของ HSP ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเซลล์ PC และ PK ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ($P < 0.05$) นอกจากนี้ อัตราการเกิด apoptosis ในเซลล์ PC ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 6, 12 และ 24 ชั่วโมง สูงกว่าเซลล์ PK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระดับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK ที่ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพิ่มสูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 6 และ 12 ชั่วโมง ($P < 0.05$) ในขณะที่เซลล์ PC เมื่อได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 6 และ 12 ชั่วโมง ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง การแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK สูงกว่า PC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำมข.55 มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าเซลล์จากไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ เมื่อเซลล์สัมผัสกับอุณหภูมิสูงเป็นเวลายาวนาน

คำสำคัญ: apoptosis; Heat shock protein; เซลล์ไฟโบรบลาสต์; ความเครียดจากความร้อน; ไก่พื้นเมือง

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the effects of heat stress on apoptosis and heat shock protein (HSP) expression in embryonic fibroblasts derived from native chicken. Fibroblasts derived from Pradu-Hangdum Chiangmai embryos (PC) and KKU.55 (PK) were cultured at regular temperature (control group; 37 °C for 24 h) and heat stress (42 °C for 6, 12, and 24 h) to measure apoptotic rate and HSP expression. After being treated

* Corresponding author: Chawalit.s@ubu.ac.th

Received: date; June 17, 2022 Accepted: date; January 19, 2023 Published: date

at 42 ℃ for 12 and 24 h, PC and PK cells had a higher apoptotic rate than those control and 42 ℃ for 6 h treated groups ($P < 0.05$). In addition, the apoptotic rate of PC cells in both control and 42 ℃ treated groups was significantly increased when compared to PK cells ($P < 0.05$). The expression levels of HSP70 and HSP90 were much higher in PK cells when exposed to 42 ℃ for 24 h significantly different compared to the control and those exposed to 42 ℃ for 6 or 12 h ($P < 0.05$). Furthermore, the expression levels of HSP70 and HSP90 were higher in PC cells treated at 42 ℃ for 24 h than in the control group ($P < 0.05$), nevertheless, not significantly different when compared to the heat-treated groups (42℃ for 6 and 12 h) ($P > 0.05$). However, after being treated at 42 ℃ for 24 h, the expression level of HSP70 and HSP90 in PK cells was significantly higher than in the PC cells ($P < 0.05$). We conclude that fibroblasts derived from PK embryos have more thermotolerance than PC derived cells when cells were exposed to high temperatures for a long time.
Keywords: apoptosis; Heat shock protein; fibroblast cells; heat stress; native chicken

บทนำ

ความเครียดจากความร้อน (heat stress) เป็นปัจจัยที่สร้างความเสียหายให้กับการผลิตปศุสัตว์ในเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ปีก (Ibtisham et al., 2018) เนื่องจากไก่ไม่มีต่อมเหงื่อและร่างกายมีอุณหภูมิสูงถึง 41-42 องศาเซลเซียส (Murugesan et al., 2017) จึงทำให้ไก่มีความไวในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมซึ่งเป็นปัจจัยที่หลีกเลี่ยงได้ยาก อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลลบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตไข่ ในขณะที่ไก่พื้นเมืองไทยถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะเครียดจากความร้อนได้ดี เพราะเป็นสัตว์ประจำถิ่นและมีการเลี้ยงในสภาพแวดล้อมแบบร้อนชื้นมาเป็นเวลานาน (วุฒิไกร และคณะ, 2557) อย่างไรก็ตาม ไก่พื้นเมืองไทยยังมีขีดจำกัดในการปรับสภาพร่างกายให้รับมือกับความเครียดที่เกิดจากความร้อน ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้ไก่พื้นเมืองมีอัตราการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตต่ำ มีรายงานว่า การเลี้ยงไก่พื้นเมืองในฤดูร้อนประสิทธิภาพการให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อเทียบกับฤดูอื่นๆ (อำนวย และคณะ, 2539) เมื่อไก่ประดู่หางดำ (วุฒิไกร และคณะ, 2557) และไก่ไทยสายพันธุ์สังเคราะห์ (สุภาวรรณ และคณะ, 2562) ประสบกับความเครียดจากความร้อนส่งผลให้ผลผลิตไข่และน้ำหนักตัวลดลง นอกจากนี้ ไก่พื้นเมืองพันธุ์ชีและไก่เนื้อทางการค้าเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจากความร้อนเป็นเวลานานจะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกิดความเสียหายเพิ่มขึ้น (ชัยยุทธ และคณะ, 2550) ปริมาณและความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลงและมีอัตราการตายของอสุจิที่เพิ่มขึ้น (Joshi et al., 1980; McDaniel et al., 1995) ซึ่งไก่เนื้อทางการค้ามีความทนทานต่อความร้อนต่ำกว่าไก่พื้นเมือง โดยไก่เนื้อทางการค้ามีอัตราการเจริญเติบโตและการกินได้ลดลงเมื่อได้รับผลกระทบจากความร้อนและมีอัตราการตายสูงกว่าไก่พื้นเมือง (Aengwanich, 2007; Duangjinda et al., 2017) ในขณะที่มีการแสดงออกของยีน HSP70 และ HSP90 ต่ำกว่าไก่พื้นเมือง (Cedraz et al., 2017) เพราะไก่เนื้อทางการค้ามีการปรับปรุงทางพันธุกรรมเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง จึงทำให้เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมที่สูงตามไปด้วยจึงทำให้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ร้อนได้ไม่ดี ซึ่งต่างจากไก่พื้นเมืองที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าทำให้มีความสามารถในการทนร้อนได้ดี (Soleimani et al., 2011; Duangjinda et al., 2017) อย่างไรก็ตาม ไก่พื้นเมืองไทยมีหลายสายพันธุ์และบางสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น จึงอาจจะมีผลทำให้ความสามารถในการทนร้อนเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย โดยการวิจัยครั้งนี้สันนิษฐานว่า ไก่พื้นเมืองไทยที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มลักษณะการให้ผลผลิตมีความสามารถในการทนร้อนต่ำกว่าไก่พื้นเมืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากลักษณะการให้ผลผลิตมีความสัมพันธ์ในทางลบกับความทนร้อน (Cedraz et al., 2017)

โดยทั่วไปเมื่อไก่ได้รับความเครียดจากความร้อนการระบายความร้อนร้อยละ 90-95 จะเกิดขึ้นบริเวณผิวกาย (Wu et al., 2017) ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนของหนังแท้ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มร่างกาย จึงเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาและมีส่วนช่วยในการตอบสนองต่อการปรับตัวทางชีวเคมีในเซลล์ (ธรรมนูญ และคณะ, 2563; Fanny, 2004; Singh et al., 2014) ช่วยให้ผิวหนังสามารถปกป้องโครงสร้างอวัยวะภายในที่จะได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมภายนอก Wu et al. (2017) รายงานว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นโซมาติกเซลล์ (somatic cell) หรือเซลล์ร่างกายที่สามารถใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบความเครียดที่เกิดจากความร้อนได้ นอกจากนี้ ความสามารถในการทนต่อความร้อนยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางโซมาติกเซลล์ไปยังลูกหลานได้อีกด้วย การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอันเนื่องมาจากความเครียดที่เกิดจากความร้อนจะมาพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงที่สร้างความเสียหายในระดับเซลล์ (Murugesan et al., 2017) เมื่ออุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เซลล์และไมโทคอนเดรียได้รับความ

เสียหายจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation stress) ทำให้โปรตีนและดีเอ็นเอถูกทำลาย (Murugesan et al., 2017; Ibtisham et al., 2018) ปัจจัยดังกล่าวจึงกระตุ้นการตายของเซลล์ที่เรียกว่า apoptosis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ มีรายงานว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ไก่ที่ได้รับความเครียดระดับอ่อนๆ (41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) เซลล์จะมีการตายที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Siddiqui et al., 2020) และเมื่อได้รับความเครียดระดับรุนแรง (44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) การตายของเซลล์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิปกติ (Ibtisham et al., 2018) เมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายจะมีการสังเคราะห์โปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า heat shock protein **(HSP)** เพื่อช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวและป้องกันการตายของเซลล์ HSP70 มีความไวในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากที่สุด (Kregel, 2002) เพราะมีหน้าที่ช่วยในการปรับตัวและยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิร้อน ส่วนโปรตีน HSP90 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการส่งสัญญาณในเซลล์ให้สามารถทำงานได้ตามปกติ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่ได้รับความเสียหายและช่วยป้องกันการตายของเซลล์ (Surai, 2015) จากการศึกษาของ Siddiqui et al. (2020) พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนและระดับโปรตีน HSP70 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไก่จะเพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในไก่พื้นเมืองไทยเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อน (ศุภนนท์ และคณะ, 2553) และจีโนไทป์ของ HSP70 ใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองและไก่สายพันธุ์ลูกผสมทางการค้าที่ทนต่อความร้อนได้อีกด้วย (Duangjinda et al., 2017; นิทัศน์ และคณะ, 2562) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ HSP สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการทนต่อความร้อนของเซลล์และการปรับตัวต่อสภาพอากาศที่ร้อนของสัตว์ได้ (วิชาภรณ์, 2560) มีหลายปัจจัยที่สามารถส่งผลต่อความสามารถในการทนร้อนจึงเป็นเรื่องยากสำหรับการศึกษากลไกพื้นฐาน และการประเมินความสามารถในการทนร้อนของสัตว์ (Wu et al., 2017) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในระดับเซลล์ขณะเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน โดยใช้เซลล์จากตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำที่มีความแตกต่างกันทางด้านการให้ผลผลิต อาจจะสามารถนำเอาข้อมูลไปประยุกต์ใช้ประกอบกับการคัดเลือกพันธุ์สัตว์ที่ให้ผลผลิตสูงควบคู่กับมีความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากความร้อน ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนของไก่พื้นเมืองที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต และไก่พื้นเมืองที่ยังไม่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PC) ซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองฝูงพื้นฐานที่ไม่มีการคัดเลือกเพื่อเพิ่มผลผลิต มีเพียงการคัดเลือกสีขนให้ตรงตามลักษณะพันธุ์เท่านั้น และตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำมข.55 (PK) ซึ่งเป็นไก่ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มลักษณะการเจริญเติบโต ความกว้างอก และผลผลิตไข่ มาแล้วหลายชั่วรุ่น

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์สกัดจากตัวอ่อนที่ได้จากไข่ฟักอายุ 9 วัน ทั้งหมดจำนวน 12 ฟอง ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่) จำนวน 6 ฟอง และไก่ประดู่หางดำมข.55 (ศูนย์เครือข่ายวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์และโอมิกส์ทางสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) จำนวน 6 ฟอง การศึกษานี้ ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (ใบอนุญาตเลขที่ U103755-2559)

สารเคมีที่ใช้ในงานทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือ Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Fetal bovine serum, Antibiotic-antimycotic, Dulbecco's Phosphate buffer saline (PBS), Trypsin-EDTA 0.5% จาก Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) Primary antibodies ได้แก่ anti-HSP70, anti-HSP90 จาก Calbiochem (San Diego, CA, USA) และ anti-β-actin จาก Cell Signaling (Beverly, MA, USA) และ Protease inhibitor จาก Roche (Indianapolis, IN, USA)

การสกัด การเพาะเลี้ยงและแช่แข็งเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การสกัดเซลล์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Guan et al. (2012) โดยเช็ดเปลือกไข่ด้วย 75% แอลกอฮอล์ให้สะอาดและคีบตัวอ่อนออกจากไข่ล้างตัวอ่อนด้วย 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) 3 ครั้ง จากนั้นทำการแยกรยางค์และอวัยวะภายในออกให้หมด สับตัวอ่อนจนละเอียดและย้ายไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10% FBS + 1% ABAM) เลี้ยงในตู้บ่ม

คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซ CO_2 5% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน เมื่อเซลล์มีการเพิ่มจำนวนหนาแน่นประมาณ 80-90% เซลล์จะถูกล้างด้วย 1x PBS และทำการย่อยเซลล์ด้วย 1x trypsin 0.5% เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นเติมด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทำการแบ่งเซลล์ใส่จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ในสัดส่วน 1:2 เลี้ยงเซลล์จนหนาแน่นประมาณ 90-95% ทำการแช่แข็งเซลล์ด้วย freezing media (DMEM + 50% FBS + 10% Dimethyl sulfoxide; DMSO) เก็บเซลล์ในตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส จนกว่าจะดำเนินการทดลองต่อไป

การให้ความเครียดจากความร้อนแก่เซลล์ไฟโบรบลาสต์

การให้ความเครียดจากความร้อนแก่เซลล์ไฟโบรบาสต์ทำตามวิธีการของ Wu et al. (2017) โดยนำเซลล์ไฟโบรบาสต์ไก่พื้นเมืองประดู่หางดำมข.55 และไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ ออกมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที เลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์และทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 90-95% จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ (sub-culture) และเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. ที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รอให้เซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80% นำเซลล์ไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิต่างๆ สำหรับกลุ่มควบคุมเลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ภายใต้เงื่อนไขแบบเฉียบพลันที่มีข้อกำหนดระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง (Vandana et al., 2021; Ibtisham et al., 2018; Wu et al., 2017) จากนั้นเซลล์จะถูกนำไปทดสอบเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาจนครบ 24 ชั่วโมง

การทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis

หลังจากเซลล์ได้รับความเครียดจากความร้อนจะถูกล้างด้วย 1x PBS และย่อยเซลล์ด้วย 1x trypsin 0.5% เป็นเวลา 3 นาที และเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทำการนับเซลล์และใช้เซลล์จำนวน 5×10^5 cell/mL ล้างเซลล์ด้วย 1x PBS เย็น (pH=7.4) นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก 1x PBS ออก และย้อมเซลล์ด้วยชุด kit annexin V FITC (Cat. No.33-1200, Invitrogen, USA.) เติม 1× binding buffer ปริมาตร 95 µL และ annexin V ปริมาตร 5 µL บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายด้านบนทิ้ง ล้างด้วย 1× binding buffer 1 ครั้ง และปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายด้านบนทิ้ง เติม 1× binding buffer ปริมาตร 95 µL และ propidium iodide 5 µL ตามด้วยการเติม 10 µg/mL DAPI ปริมาตร 10 µL หยดสารละลายเซลล์ลงบนสไลด์และตรวจสอบ apoptotic cells ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 3 กระบอกตาเทคนิคฟลูออเรสเซนต์โปรแกรมฟิช (Olympus รุ่น BX43) โดยเซลล์ที่ย้อมติดสีเขียว (annexin V) บ่งบอกถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis ส่วนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน (DAPI) คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด และบันทึกภาพโดยวิธีการสุ่ม 8 ตำแหน่งบนสไลด์นำภาพไปตรวจนับจำนวน apoptotic cells ด้วยซอฟต์แวร์ Image J (เวอร์ชั่น 1.8.0172)

การวัดการแสดงออกของ heat shock protein (HSP) ด้วยเทคนิค Western blotting

ดัดแปลงจากวิธีการของ Yuajit et al. (2017) หลังจากเซลล์ได้รับความเครียดจากความร้อนจะถูกล้างด้วย 1x PBS เย็น จากนั้นเติม 1× radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer ปริมาตร 50 µL ลงในจานเลี้ยงเซลล์ที่วางบนน้ำแข็ง ขูดเซลล์ให้หลุดจากจานเลี้ยงเซลล์ เก็บสารละลายเซลล์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี bradford โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโคเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โหลดโปรตีนที่มีความเข้มข้น 40 µg ในเจล 10% SDS-PAGE และโปรตีนจะถูกย้ายไปยังแผ่น nitrocellulose membrane และถูก blocked ด้วย 10% non-fat dry milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วย 1x TBST 3 ครั้ง และบ่มด้วย primary antibody ได้แก่ HSP70 (1:1,000; Cat. no. SAB4200714, Sigma Aldrich, USA), HSP90 (1:1,000; Cat. no. H1775, Sigma Aldrich, USA) และ β-actin (1:1,000; Cat. no. 4970, Cell signaling technology, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแผ่น membrane จะถูกล้างด้วย 1× TBST อีกครั้ง และบ่มต่อด้วย secondary antibody ได้แก่ anti-mouse (1:5,000; Cat. no. H1775, Millipore, USA) สำหรับ HSP70/90 และ anti-rabbit (1:3,000; Cat. no. 7074, Cell signaling technology,

USA) สำหรับ β-actin ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น membrane ด้วย 1x TBST อีกครั้งและบ่มด้วย western HRP substrate (Calbiochem) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหาการแสดงออกของโปรตีนผ่าน film X-ray จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความหนาแน่นของโปรตีนโดยโปรแกรม Image J (เวอร์ชั่น 1.8.0172) โดยเทียบความหนาแน่นของโปรตีน HSP70 และ HSP90 กับโปรตีน β-actin ซึ่งถือเป็นโปรตีนพื้นฐานที่แสดงออกในเซลล์ทุกชนิด

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc. 2014)

ผลการศึกษา

ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองหลังได้รับความเครียดจากความร้อน

กลุ่มเซลล์ไก่พื้นเมืองไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ **(PC)** และไก่ประดู่หางดำมข.55 **(PK)** ที่เลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นรูปร่าง และขอบเขตเซลล์เป็นลักษณะทรงกระสวยอย่างชัดเจนและมีความหนาแน่นต่ำ แต่เมื่อบ่มเซลล์ด้วยความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์เริ่มมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นมีลักษณะบวมและใหญ่ขึ้น รูปร่างและขอบเขตของเซลล์ไม่สามารถสังเกตเห็นเป็นลักษณะกระสวยได้อย่างชัดเจน โดยจะพบการการเปลี่ยนแปลงชัดเจนที่สุดเมื่อบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังลูกศรชี้ **(Figure 1)**

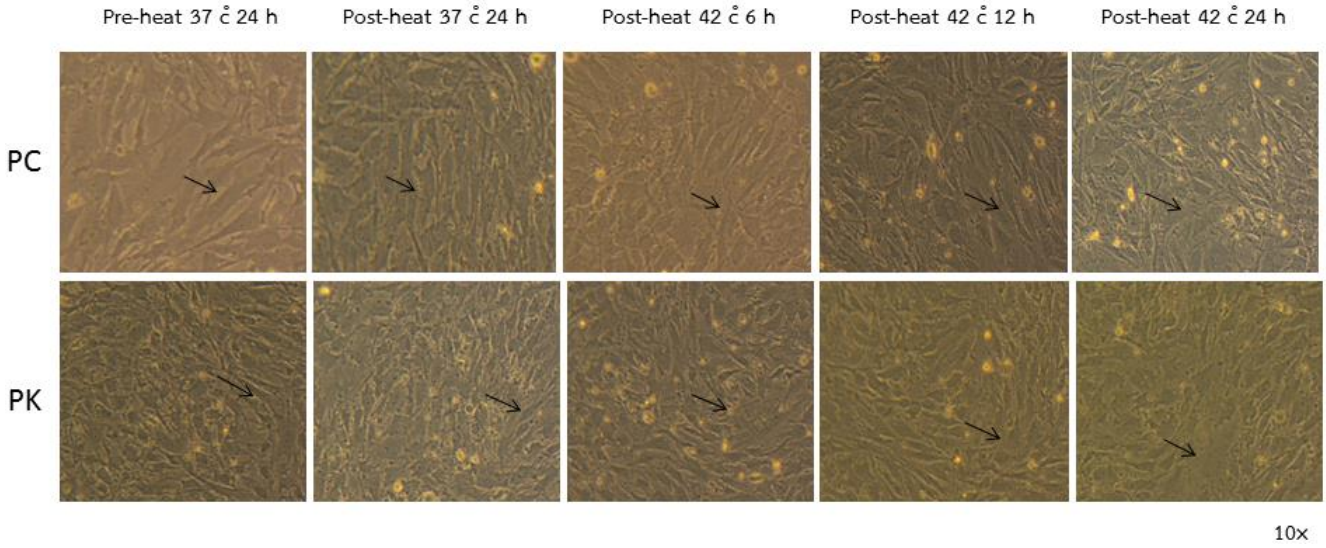


Figure 1 Morphology of fibroblast cells derived from PC and PK after heat treatments (10× magnification)

การตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อได้รับความเครียดจากความร้อน

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ **(PC)** และไก่ประดู่หางดำมข.55 **(PK)** ที่ถูกย้อมด้วย annexin V-FITC แล้ววัดด้วยวิธี immunofluorescence พบว่า มีอัตราการตายของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการตายของเซลล์เมื่อได้รับอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ของเซลล์ไก่ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม อัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ PC จะสูงกว่าเซลล์ PK ในทุกกลุ่มทดลอง ($P < 0.05$) จะเห็นได้ว่า ความเครียด

จากความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์ได้ และยังพบความแตกต่างกันของไก่แต่ละสายพันธุ์อีกด้วย **(Figure 2 และ 3)**

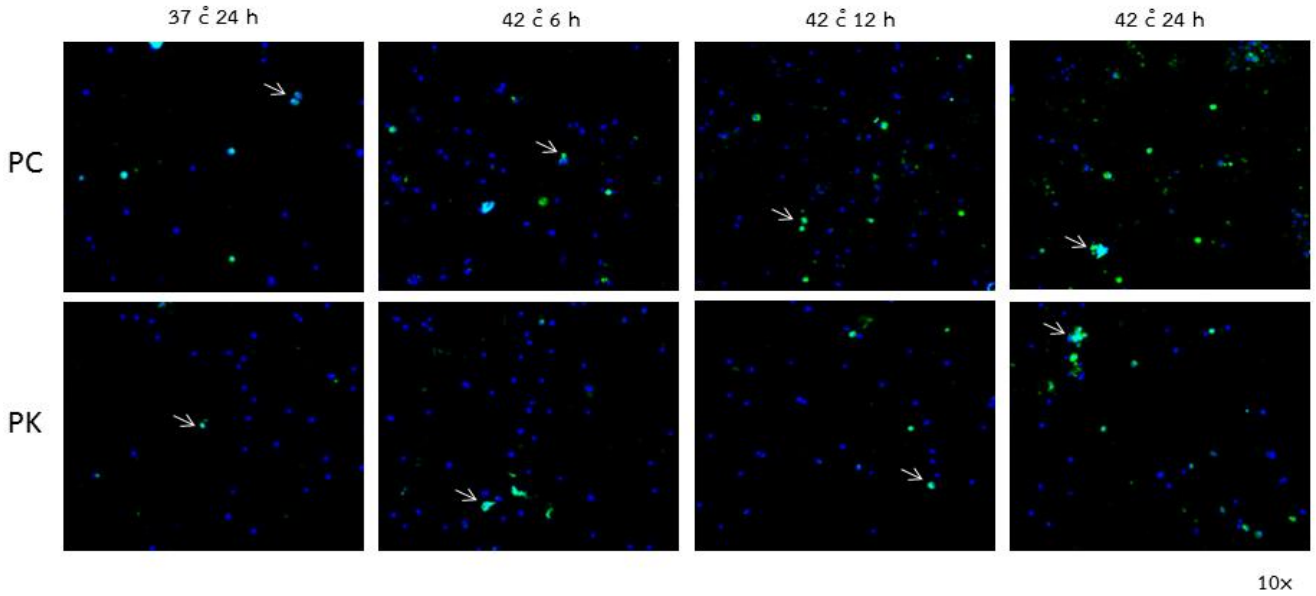
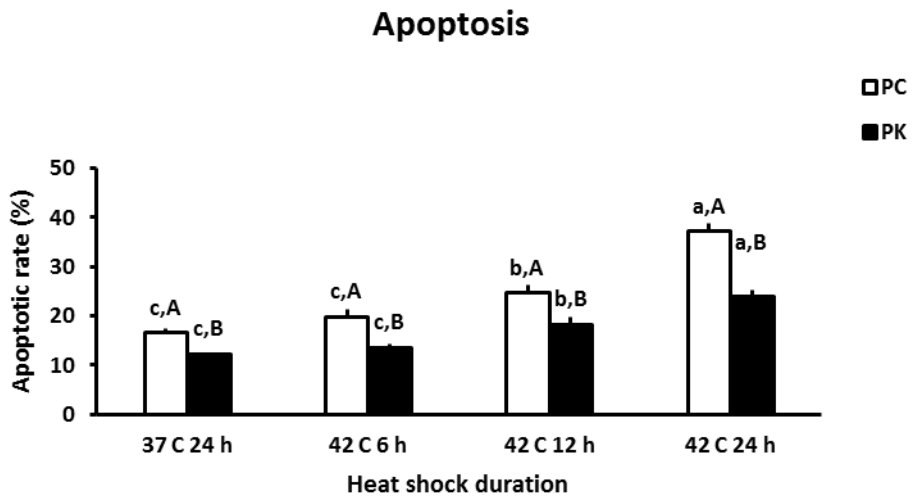


Figure 2 The effect of heat stress on cell apoptosis in fibroblast cells derived from Thai native chicken embryo. The photograph represented cell apoptosis assayed by annexin V staining in PC and PK. Replicates = 4



a-c Values different superscripts in the same breed differ ($P < 0.05$)

A, B Values different superscripts in the between breed differ ($P < 0.05$)

Data are presented as means ± SEM, Replicates = 4

Figure 3 Apoptotic rates of fibroblast cells derived from PC and PK under heat stress

การแสดงออกของ heat shock protein (HSP70 และ HSP90)

ระดับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ **(PC)** และประดู่หางดำมข.55 **(PK)** ที่วัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot analysis พบว่า มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับความเครียดจากความร้อน การแสดงออกของระดับ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PC เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็น

ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) แต่สำหรับเซลล์ PK เมื่อได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะพบการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง ($P < 0.05$) นอกจากนี้ ระดับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK จะสูงกว่าเซลล์ PC อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) หลังจากได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PC และเซลล์ PK ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความร้อน 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ($P > 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่า ความเครียดจากความร้อนสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ไก่พื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์และเซลล์ PK มีการตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว **(Figure 4 B-D)**

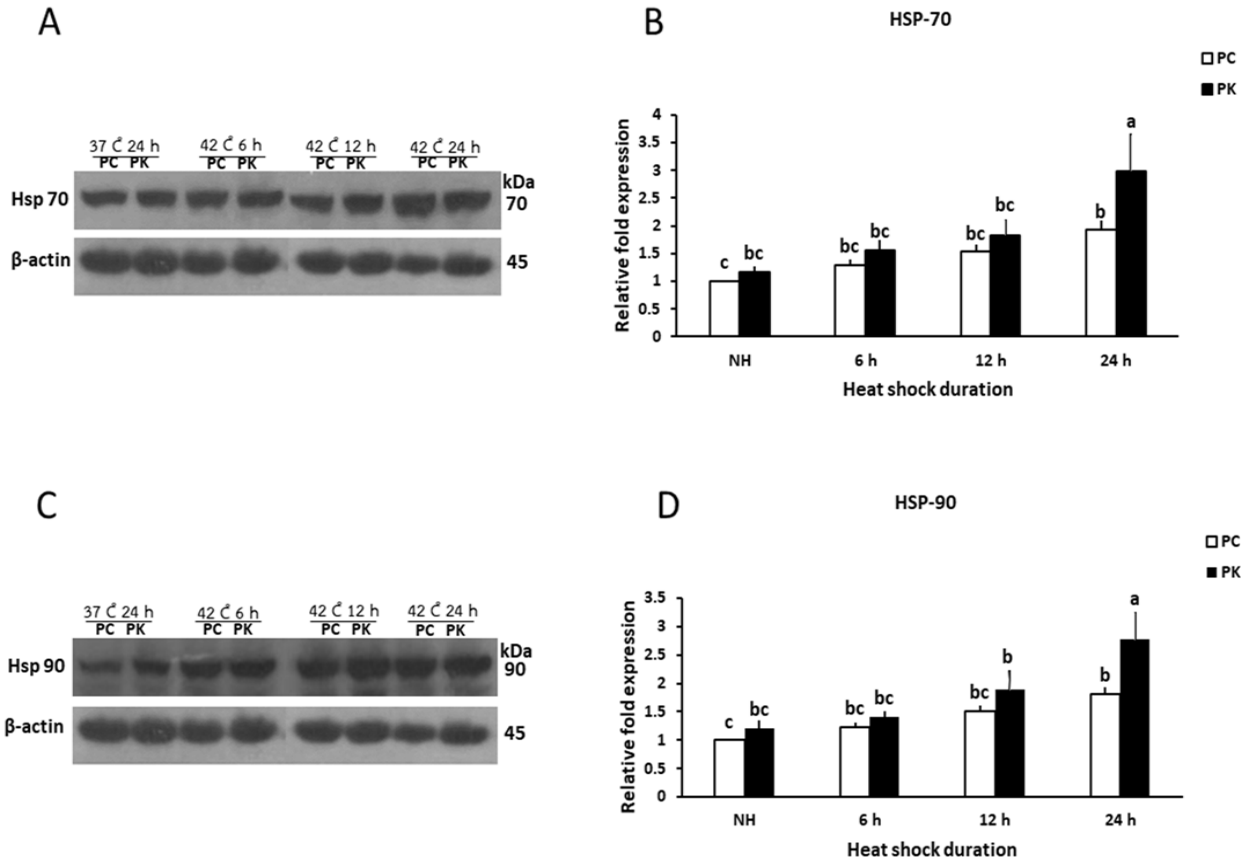


Figure 4 HSP expression in embryonic fibroblasts after heat treatment. Blotting bands (A) and representative expression level (B) of HSP70 and β-actin in embryonic fibroblasts derived from PC and PK after heat treatment (42 °C) for various durations. Blotting bands (C) and representative expression level (D) of HSP90 and β-actin in embryonic fibroblasts derived from PC and PK after heat treatment (42 °C) for various durations. All values were calculated by the relative fold changes over the control, non-heat-shocked (37 °C for 24 h) from PC fibroblasts. Groups with different letters are significantly different ($P < 0.05$). NH: non-heat treatment. Replicates = 6

วิจารณ์

ความสามารถในการทนต่อความร้อนของสัตว์นั้นถูกกำหนดด้วยหลายปัจจัย ในช่วงฤดูร้อนสัตว์เหล่านี้ต้องการการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้านโครงสร้างร่างกายและการทำงานของเซลล์ (Wu et al., 2017) ในระดับเซลล์การตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นความสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยที่เป็น pro-apoptosis และ anti-apoptosis อัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของเซลล์ในการทนต่อความเครียดจากปัจจัยต่างๆ จากสภาพแวดล้อมได้ เช่น ยา สารเคมี ความเครียดจากความร้อน หรือความเครียดอื่นๆ การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากตัวอ่อนไก่

พื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง พบว่า มีอัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่เซลล์ได้สัมผัสกับความร้อน **(Figure 3)** ทั้งนี้เกิดจากอิทธิพลร่วมกันระหว่างอุณหภูมิและช่วงเวลาที่เซลล์ได้สัมผัสกับความร้อน จึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์จนทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis (Surai, 2015; Murugesan et al., 2017; Wu et al., 2017; Ibtisham et al., 2018; Siddiqui et al., 2020) ซึ่งจะเห็นได้ชัดเมื่อมีการย้อมเซลล์ด้วยชุด kit annexin V และยังสอดคล้องกับการรายงานของ Ibtisham et al. (2018) ที่พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่เนื้อทางการค้าที่ได้รับอุณหภูมิ 42-44 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จะมีการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มสูงขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากการเกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอมีการแตกหัก โปรตีนถูกทำลาย และเกิดสภาวะ lipid peroxidation จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Sinha et al., 2013; Wang et al., 2008) และยังทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลง (Harding et al., 2016; Reissis et al., 2013) และการศึกษาในครั้งนี้ยัง พบว่า เซลล์ PC มีอัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis สูงกว่าเซลล์ PK ซึ่งบ่งชี้ว่า ไก่ประดู่หางดำมข.55 มีความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนมากกว่าไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมุติฐานของการทดลองในครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไก่ประดู่หางดำมข.55 แม้จะผ่านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต ความกว้างอก และผลผลิตไข่มาแล้วหลายชั่วรุ่น โดยเป็นการคัดเลือกภายในสายพันธุ์ทำให้ไก่ประดู่หางดำมข.55 มีผลผลิตสูงกว่าไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่เพียงเล็กน้อย โดยน้ำหนักที่อายุ 12 สัปดาห์ ของไก่ประดู่หางดำมข.55 เท่ากับ 1,338.40 ± 115.38 กรัม ความกว้างอกเท่ากับ 5.68 ± 0.37 ซม. ขณะที่น้ำหนักที่อายุ 12 สัปดาห์ ของไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่เท่ากับ 1,091.05 ± 114.58 กรัม ความกว้างอกเท่ากับ 5.27 ± 0.42 ซม. (ชุดาภา และคณะ, 2561) การที่ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจึงอาจจะทำให้ความทนทานต่อความร้อนของไก่ประดู่หางดำมข.55 ไม่ได้รับผลกระทบในทางลบ และการคัดเลือกเพื่อเพิ่มผลผลิตภายใต้สภาพแวดล้อมของประเทศไทยซึ่งมีดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (Temperature humidity index; THI) เฉลี่ยทั้งปีเท่ากับ 77.60 (ธนวัต และคณะ, 2560) จึงอาจมีผลให้ประดู่หางดำมข.55 มีความทนทานต่อความร้อนได้มากกว่าไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่

อย่างไรก็ตาม สำหรับการประเมินความสามารถในการทนร้อนในระดับเซลล์อีกหนึ่งปัจจัยที่ช่วยให้เซลล์สามารถทนร้อนได้ก็คือ การแสดงออกของ heat shock protein (**HSP**) ดังนั้น ในเซลล์ของสัตว์ปีกสามารถใช้ระดับการแสดงออกของ HSP มาช่วยประเมินความสามารถในการทนร้อนในระดับเซลล์ควบคู่กับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ (Catelli et al., 1985; Surai, 2015; Murugesan et al., 2017; Xu et al., 2017; Zhang et al., 2017; Siddiqui et al., 2020) เพราะความสำคัญของการแสดงออกของ HSP ขณะเกิดความเครียดจากความร้อนจะช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวและอยู่รอดได้ โดยมีการซ่อมแซมโปรตีนที่คลายตัวและที่มีการพับผิดรูป (Kregel, 2002) และอีกหนึ่งบทบาทที่มีความสำคัญสำหรับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ก็คือการทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis แต่ถ้าหากเป็นความเครียดในระดับที่รุนแรงอาจทำให้พบการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการแสดงออกของ HSP70 เพิ่มสูงขึ้นทั้งคู่ (Surai, 2015; Ekambaram, 2011) และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำทั้งสองสายพันธุ์เมื่อมีการทดสอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า มีการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 เพิ่มสูงขึ้น **(Figure 4)** ซึ่งสอดคล้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis **(Figure 3)** Siddiqui et al. (2020) รายงานว่า การแสดงออกของ HSP70 จะเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไก่เนื้อทางการค้าที่ได้รับอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และ Cedraz et al. (2017) พบว่า ไก่พื้นเมืองเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 39.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จะมีการแสดงออกของ HSP70 ที่เพิ่มสูงขึ้น สำหรับการแสดงออกของ HSP70 ที่เพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อและเซลล์ไก่เป็นการตอบสนองเพื่อป้องกันการเกิดความเสียหาย หรือเพื่อจัดการกับการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเป็นอันตรายต่อโครงสร้างของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากความเครียดต่างๆ (Surai, 2015) ดังนั้น การแสดงออกของ HSP70 จะเพิ่มสูงขึ้นตามการตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่เพิ่มขึ้น เพราะจะทำหน้าที่ยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน AIF, Bax, Cytochrome และเอนไซม์ Caspases (Wu et al., 2017) เพราะโปรตีนและเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis สำหรับการแสดงออกของ HSP90 ในครั้งนี้พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่ทั้งสองสายพันธุ์เป็นไปใน

ทิศทางเดียวกันกับการแสดงออกของ HSP70 และยังสอดคล้องกับ Cedraz et al. (2017) รายงานว่า ไก่พื้นเมืองอยู่ภายใต้อุณหภูมิ 39.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จะมีการแสดงออกของ HSP90 เพิ่มสูงขึ้นควบคู่กับการแสดงออกของ HSP70 และ Catelli et al. (1985) พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่ที่ทดสอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จะมีการแสดงออกของ HSP90 เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Bagatell et al. (2000) รายงานว่า ที่อุณหภูมิ 37 ถึง 42 องศาเซลเซียส จะทำให้ HSP90 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับ HSP90 มีส่วนสำคัญที่ช่วยในการซ่อมแซม หรือช่วยในการกำจัดโปรตีนที่ได้รับความเสียหายอันเป็นผลมาจากความเครียดจากความร้อน ตลอดทั้งยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เช่นเดียวกันกับ HSP70 (Beere and Green, 2001; Fulda et al., 2010)

ในเซลล์ PK ที่ทดสอบด้วยอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ที่มากกว่าเซลล์ PC ในทางกลับกันการตายของเซลล์แบบ apoptosis พบว่าน้อยกว่าเซลล์ PC ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพิ่มขึ้นของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK สามารถยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Xu et al. (2017) ที่พบว่ากลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไก่ที่ใช้สารเพื่อลดการแสดงออกของ HSP70 หลังจากทดสอบด้วยความร้อนพบว่าในขณะที่ HSP70 มีการแสดงออกในระดับต่ำ แต่ในทางกลับกันการตายของเซลล์แบบ apoptosis จะเพิ่มสูงขึ้น และสอดคล้องกับการศึกษาของ Wu et al. (2017) ที่พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหูโคสายพันธุ์ทนร้อนสูงจะมีอัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis ที่ต่ำ และมีระดับการแสดงออกของ HSP70 ที่สูงกว่าโคสายพันธุ์ทนร้อนได้ต่ำ และเป็นที่ปรากฏชัดแล้วว่าทั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการแสดงออกของ HSP เป็นการแสดงออกที่มีความเกี่ยวข้องสำหรับการทนร้อนในระดับเซลล์ นอกจากนี้ Cedraz et al. (2017) รายงานว่า ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ Peloco มีการแสดงออกของยีน HSP70 และ HSP90 แตกต่างจากไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ Caneluda และแตกต่างจากไก่เนื้อสายพันธุ์ Cobb 500 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 39.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดังนั้น แม้ว่าเป็นไก่สายพันธุ์พื้นเมืองเหมือนกันก็สามารถมีการแสดงออกของยีน HSP70 และ HSP90 ที่แตกต่างกันได้ สำหรับการคัดเลือกทั้งโดยมนุษย์และโดยธรรมชาติมีผลต่อความสามารถในการปรับตัวและการทนร้อนได้ และในไก่พื้นเมืองมีการคัดเลือกโดยธรรมชาติภายใต้สภาพแวดล้อมความเป็นอยู่ซึ่งต่างจากไก่เนื้อทางการค้าซึ่งคัดเลือกโดยเน้นการให้ผลผลิตสูง จึงส่งผลให้ความสามารถในการทนร้อนมีความสัมพันธ์เชิงลบกับการให้ผลผลิตเมื่ออยู่ภายใต้ความเครียดจากความร้อน (Cedraz et al., 2017) แม้ว่าไก่ประดู่หางดำมข.55 จะมีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตดังที่ได้ให้เหตุผลไปแล้วในเบื้องต้น ปัจจัยดังกล่าวอาจจะได้รับผลกระทบเล็กน้อยหรือในทางกลับกันอาจกล่าวได้ว่าการคัดเลือกที่ผ่านมาแล้วหลายชั่วรุ่นของไก่ประดู่หางดำมข.55 อาจจะช่วยให้มีการปรับตัวและทนร้อนได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK ที่พบว่า มีการตอบสนองอย่างรวดเร็วและเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละช่วงเวลา อย่างไรก็ตามจะพบความแตกต่างกันเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งถือเป็นระยะเวลาสูงสุดของการทดสอบด้วยความเครียดจากความร้อนแบบเฉียบพลัน เมื่อมีการพิจารณาถึงระดับการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 เราอาจจะสันนิษฐานได้ว่า สภาพแวดล้อมในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สามารถมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนหรือ HSP ที่อาจจะทำให้พบความแตกต่างกันได้ เพราะความสามารถในการทนร้อนนั้นสามารถถ่ายทอดผ่านเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปยังลูกหลานได้ (Wu et al., 2017) ดังนั้น เซลล์ PK ที่ได้จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำมข.55 ที่ผ่านการคัดเลือกการให้ผลผลิตมาแล้วหลายชั่วรุ่น จึงมีความสามารถในการปรับตัวและทนความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ PC ที่ได้จากตัวอ่อนไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ ซึ่งมีการคัดเลือกเฉพาะสีขนให้ตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ของไก่ประดู่หางดำ และเมื่อมีการพิจารณาร่วมกันกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis จะเห็นได้ว่า ทั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis และการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการทนร้อนของสัตว์ในระดับเซลล์ อย่างไรก็ตามข้อมูลหรือหลักการที่จะมาสนับสนุนสำหรับไก่พื้นเมืองไทยนั้นยังไม่มีหลักฐานที่เด่นชัดหรือเป็นที่ประจักษ์ในระดับเซลล์ จึงควร มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีน หรือยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ทั้งในกลุ่มของ pro-apoptosis หรือกลุ่ม anti-apoptosis ทั้งในเซลล์และการทดสอบในตัวสัตว์ (*In vivo*) เพื่อให้ทราบถึงกลไกเชิงลึกในการทนร้อนของไก่พื้นเมืองไทยมากยิ่งขึ้น

สรุป

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำมข.55 (**PK**) มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (**PC**) โดยผ่านการแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 และการตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อเซลล์ได้สัมผัสกับความเครียดจากความร้อนเป็นเวลานาน การแสดงออกของ HSP70 และ HSP90 ในเซลล์ PK เพิ่มสูงขึ้นและมากกว่าในเซลล์ PC นอกจากนี้ อัตราการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ PK ยังน้อยกว่าเซลล์ PC เมื่อได้รับความเครียดจากความร้อนในทุกๆ ช่วงเวลา ดังนั้น ผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจจะเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์เพื่อการคัดเลือกสัตว์ทนร้อนโดยศึกษาผ่านเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนเพื่อการพัฒนาวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

ชุดาภา เชียรพลแสน, รุจิรา เผ่าพันธ์ และธัญญะ ไชยันโต. 2561. การเปรียบเทียบสมรรถนะการผลิตและคุณภาพซากของไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำ มข.55 และประดู่หางดำฝูงพื้นฐานภายใต้สภาพการเลี้ยงแบบหลังบ้าน. ปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

ชัยยุทธ ดวงเดือน, มนต์ชัย ดวงจินดา, สุภร กตเวทิน และวรพล เองวานิช. 2550. ผลของภาวะเครียดเนื่องจากความร้อนต่อสมรรถนะการผลิตและการตอบสนองทางสรีรวิยาในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ชีและไก่เนื้อ. วารสารสัตวแพทย์. 17(3): 122-133.

ธนวัต โชคเจริญ, วุฒิไกร บุญคุ้ม และวิบัณฑิตา จันทร์กิติสกุล. 2560. ความสัมพันธ์ของดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ต่อจำนวนวันท้องว่างในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ภายใต้สภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย. แก่นเกษตร. 45(3): 425-432.

ธรรมนูญ ธานี, กมลทิพย์ สอนศิริ และพยุงศักดิ์ อินต๊ะวิชา. 2563. ผลของความเครียดจากความร้อนต่ออัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคขาวลำพูนและโคลูกผสมขาวลำพูน. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 37(2): 60-70.

นิทัศน์ วิชาสิทธิ์, ศศิธร สุวัฒนากูร, ทศพร อินเจริญ, สนธยา นุ่มท้วม และรังสรรค์ เจริญสุข. 2562. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน HSP70 ในไก่พื้นเมืองไทย. วารสารเกษตรนเรศวร. 16(1): 37-44.

วิชาภรณ์ เลิศวีรพล. 2560. บทบาทของฮีทช็อคโปรตีน 70 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของปศุสัตว์. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 15(1): 1-14.

วุฒิไกร บุญคุ้ม, มนต์ชัย ดวงจินดา, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ และเทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2557. อิทธิพลของความเครียดเนื่องจากความร้อนต่อค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมและผลผลิตไข่ในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำ. แก่นเกษตร. 42(3): 319-328.

ศุภนนท์ ตู้นิ่ม, มนต์ชัย ดวงจินดา และสุภร กตเวทิน. 2553. การศึกษาความหลากหลายของยีน HSP70 ในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์ต่าง ๆ. แก่นเกษตร. 38(ฉบับพิเศษ): 71-75.

สุภาวรรณ เวียงนาค, บัญญัติ เหล่าไพบลย์, วิบัณฑิตา จันทร์กิติสกุล, มนต์ชัย ดวงจินดา และวุฒิไกร บุญคุ้ม. 2562. อิทธิพลของความเครียดเนื่องจากความร้อนต่อค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมและน้ำหนักตัวของไก่ไทยสายพันธุ์สังเคราะห์. แก่นเกษตร. 47(5): 939-950.

อำนวย เลี้ยวธารากุล, พัชรินทร์ สนธิ์ไพโรจน์ และศิริพันธ์ โมราถม. 2539. การผสมพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ไก่พื้นเมืองสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์มหาสารคาม II. สมรรถรูปการณ์ผลิตของไก่พื้นเมืองที่เลี้ยงในสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์. วารสารเกษตร. 12: 55-64.

Aengwanich, W. 2007. Comparative ability to tolerate heat between Thai indigenous chickens, Thai indigenous chickens crossbred and broilers by using heterophil/lymphocyte ratio. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10(11): 1840–1844.

Bagatell, R., G.D. Paine-Murrieta, C.W. Taylor, E.J. Pulcini, S. Akinaga, I.J. Benjamin, and L. Whitesell. 2000. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of Hsp90-binding agents. Clinical Cancer Research. 6: 3312–3318.

Beere, H.M., and D.R. Green. 2001. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. Trends in Cell Biology. 11(1): 6-10.

Catelli, M.G., N. Binart, J.R. Feramisco, and D.M. Helfman. 1985. Cloning of the chick hsp 90 cDNA in expression vector. Nucleic Acids Research. 13(17): 6035-6047.

Cedraz, H., J.G.G. Gromboni, A.A.P. Garcia, Junior, R.V.F. Filho, T.M. Souza, E.R. de Oliveira, E.B. de Oliveira, C.S. do Nascimento, C. Meneghetti, and A.A. Wenceslau. 2017. Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. PLoS One. 12(10): e0186083.

Duangjinda, M., S. Tunim, C. Duangdaen, and W. Boonkum. 2017. Hsp70 genotypes and heat tolerance of commercial and native chickens reared in hot and humid conditions. Brazilian Journal of Poultry Science. 19(1): 7-18.

Ekambaram, P. 2011. HSP70 expression and its role in preeclamptic stress. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 48(4): 243-55.

Fanny, D. 2004. The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. Perspectives in Biology and Medicine. 47(3): 339-356.

Fulda, S., G.M. Adrienne, H. Osamu, and S. Afshin. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. International Journal of Cell Biology. 1-23.

Guan, W., D. Wang, C. Bai, M. Zhang, C. Li, and Y. Ma. 2012. Biological characteristic of an embryonic fibroblast line from Xiaoshan chicken for genetic conservation. Journal of Cell and Animal Biology. 6(4): 46-53.

Harding, R.L., O. Halevy, S. Yahav, and S.G. Velleman. 2016. The effect of temperature on proliferation and differentiation of chicken skeletal muscle satellite cells isolated from different muscle types. Physiological Reports. 4(8): e12770.

Ibtisham, F., Y. Zhao, A. Nawab, H. Liguang, J. Wu, M. Xiao, Z. Zhao, and L. An. 2018. The effect of high temperature on viability, proliferation, apoptosis and anti oxidant status of chicken embryonic fibroblast cells. Brazilian Journal of Poultry Science. 20(3): 463-470.

Joshi, P.C., B. Panda, and B.C. Joshi. 1980. Effect of ambient temperature on semen characteristics of White Leghorn male chickens. Indian Veterinary Journal. 57: 52-56.

Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. Journal of Applied Physiology. 92: 2177-2186.

McDaniel, C.D., R.K. Bramwell, J.L. Wilson, and B. Howarth. 1995. Fertility of male and female broiler breeders following exposure to an elevated environmental temperature. Poultry Science. 74(6): 1029-1038.

Murugesan, S., R. Ullengala, and V. Amirthalingam. 2017. Heat shock protein and thermal stress in chicken. In book chapter 6. Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences.

Reissis, Y., E.G. Gareta, M. Korda, G.W. Blunn, and J. Hua. 2013. The effect of temperature on the viability of human mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy. 4(6): 139.

SAS. 2014. SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc. 2014) https://www.sas.com/th_th/software/on-demand-for-academics.html.

Siddiqui, S.H., S.A. Subramaniyan, D. Kang, J. Park, M. Khan, H.W. Choi, and K. Shim. 2020. Direct exposure to mild heat stress stimulates cell viability and heat shock protein expression in primary cultured broiler fibroblasts. Cell Stress and Chaperones. 25: 1033-1043.

Singh, A.K., R.C. Upadhyay, D. Malakar, S. Kumar, and S.V. Singh. 2014. Effect of thermal stress on HSP70 expression in dermal fibroblast of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan-Fries). Journal of Thermal Biology. 43: 46-53.

Sinha, K., J. Das, P.B. Pal, and P.C. Sil. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. Archives of Toxicology. 87: 1157–1180.

Soleimani, A.F., I. Zulkifli, A.R. Omar, A.R. Raha. 2011. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. Poultry Science. 90(7): 1435-1440.

Surai, P.F. 2015. Antioxidant systems and vitagenes in poultry biology: heat shock proteins. Journal of Science. 5(12): 1188-1222.

Vandana, G.D., V. Sejian, A.M. Lees, P. Pragna, M.V. Silpa, and S.K. Maloney. 2021. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. International Journal of Biometeorology. 65: 163-179.

Wang, X., J. Cai, J. Zhang, C. Wang, A. Yu, Y. Chen, and Z. Zuo. 2008. Acute trimethyltin exposure induces oxidative stress response and neuronal apoptosis in Sebastiscus marmoratus. Aquatic Toxicology. 90: 58-64.

Wu, H.Y., S.Y. Peng, H. Li, J.W. Lee, P. Kesorn, H.H. Wu, J.C. Ju, and P.C. Shen. 2017. Ear fibroblasts derived from Taiwan yellow cattle are more heat resistant than those from Hostein cattle. Journal of Thermal Biology. 66: 56-62.

Xu, J., T. Shu, S. Erbao, Y. Bin, B. Endong. 2017. Inhibition of heat shock protein 70 intensifies heat-stressed damage and apoptosis of chicken primary myocardial cells in vitro. Molecular Medicine Reports. 15(5): 2881-2889.

Yuajit, C., C. Muanprasat, S. Homvisasevongsad, and V. Chatsudthipongb. 2017. Steviol stabilizes polycystin 1 expression and promotes lysosomal degradation of CFTR and b-catenin proteins in renal epithelial cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 94: 820-826.

Zhang, X.H., W. Hong, T. Shu, L.N. Qiao, X. Jiao, Z. Miao, S.M. Ya, Y. Bin, Z.I. Qi, K. Nicole, H. Joerg, B.D. EN. 2017. Apoptosis in response to heat stress is positively associated with heatshock protein 90 expression in chicken myocardial cells *in vitro*. Journal of veterinary science. 18(2): 129-140.