

**EFFECTS OF ENERGY, VITAMIN C, VITAMIN E AND
SELENIUM IN MATERNAL DIETS ON FERTILE
PERIOD LENGTH OF SPERM, BIOCHEMICAL
COMPOSITION AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY IN UTERINE FLUID**

Phocharapon Pasri



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2017

ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อระยะเวลา
การมีชีวิตรอดของอสุจิ องค์กรประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระ
ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่



นายพชรพล พะศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2560

ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อระยะเวลา
การมีชีวิตรอดของอสุจิ องค์กรประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระ
ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.ปราโมทย์ แผงคำ)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.สุทิสสา เข้มสะอาด)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(อ. ดร.วิฑูรวัช โมพี)

กรรมการ

(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)

กรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร.กoonij กุปพิทยานันท์)

กรรมการ

(ผศ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

(ศ. ดร.สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

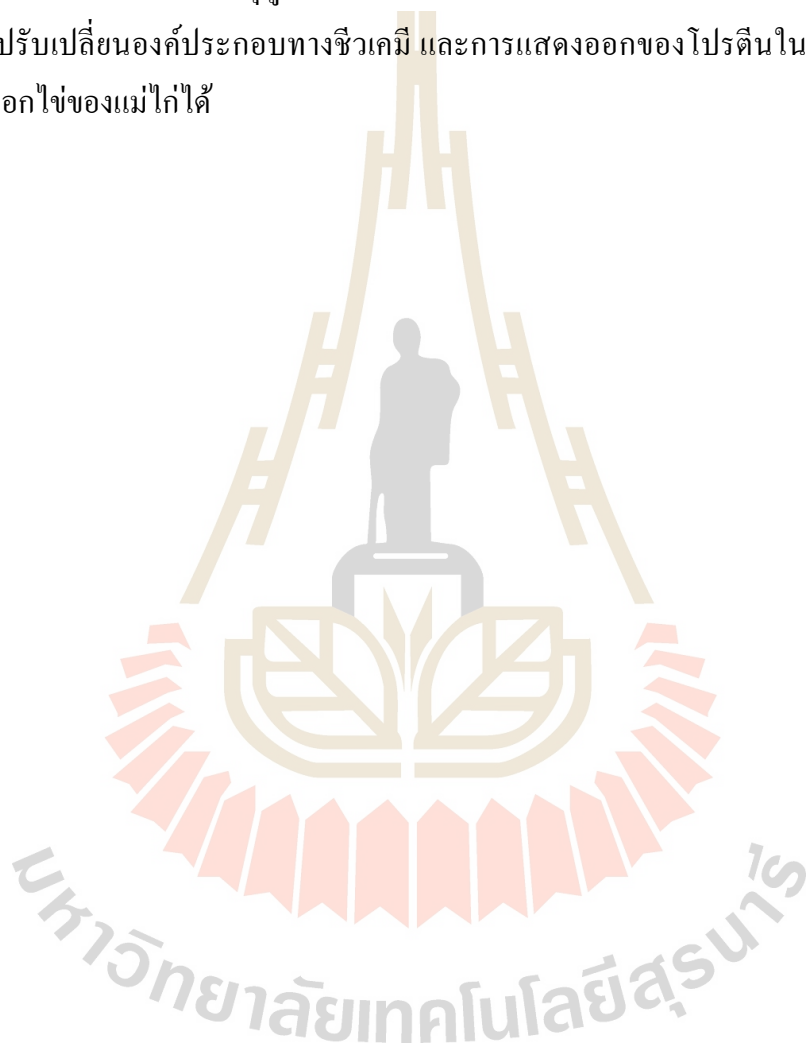
พชรพล พะศรี : ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ ต่อ
ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระใน
ของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (EFFECTS OF ENERGY, VITAMIN C, VITAMIN E
AND SELENIUM IN MATERNAL DIETS ON FERTILE PERIOD LENGTH OF
SPERM, BIOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN
UTERINE FLUID) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิสภา เข้มพะกา, 108 หน้า.

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และ
ซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ ระบบสืบพันธุ์
องค์ประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ใช้ไก่ไข่สาย
พันธุ์อีซ่า บราวน์ จำนวน 128 ตัว อายุ 33 สัปดาห์ โดยสุ่มแบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 32 ตัว ตามแผนการ
ทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ไก่ไข่ทุกตัวได้รับอาหารวันละ 109 กรัม และให้น้ำอย่างเต็มที่ภายใต้
แสง 17 ชั่วโมงต่อวัน อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม 1) ระดับพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/
กิโลกรัม) 2) ระดับพลังงานต่ำร่วมกับการเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิตามินอี 100
มิลลิกรัม/กิโลกรัม และซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 3) ระดับพลังงานปกติ (2,900 kcal ME/
กิโลกรัม) และ 4) ระดับพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิตามินอี 100
มิลลิกรัม/กิโลกรัม และซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ผลการทดลองพบว่า พลังงานในอาหารที่ระดับปกติสามารถเพิ่มปริมาณพลังงานที่กินได้ต่อ
วัน ผลผลิตไข่ น้ำหนักไข่ และรักษาความสมบูรณ์ของรังไข่ ($p < 0.05$) การเสริมวิตามินซี วิตามินอี
และซีลีเนียมในอาหารพลังงานต่ำสามารถเพิ่มผลผลิตไข่ได้เทียบเท่ากับอาหารพลังงานปกติทั้งกลุ่ม
ที่มีการเสริมและไม่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ($p > 0.05$) อีกทั้งการเสริมวิตามินซี
วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารพลังงานปกติสามารถเพิ่มน้ำหนักไข่ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ
กลุ่มทดลองอื่นๆ และลดการสะสมของไขมันช่องท้องได้ดีกว่าอาหารพลังงานปกติที่ไม่มีการเสริม
($p < 0.05$) การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารพลังงานต่ำและอาหารพลังงานปกติ
สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการสะสมวิตามินอีในไข่แดง
รวมถึงการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารพลังงานปกติสามารถเพิ่มค่า DPPH
และลดค่า TBARS ในไข่แดงได้ดีกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามไม่มีผลในการ
เปลี่ยนแปลงระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด ($p > 0.05$) องค์ประกอบทาง
ชีวเคมีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จากแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติมีปริมาณกลูโคส
แอลฟา-กลูโคส เบต้า-กลูโคส และการแสดงออกของโปรตีนมาเลตดีไฮโดรจีเนส 1 เพิ่มขึ้นเมื่อ
เปรียบเทียบกับอาหารพลังงานต่ำ ($p < 0.05$) การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมทั้งในอาหาร

พลังงานต่ำและพลังงานปกติสามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) และการแสดงออกของโปรตีนซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส 1 รวมถึงมีการแสดงออกของโปรตีนอีโนเลส 1 ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่สูงสุดในอาหารพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินและแร่ธาตุ ($p < 0.05$)

จากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีผลในการเพิ่มสมรรถนะการผลิต การต้านอนุมูลอิสระในไข่แดงและของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ รวมถึงสามารถปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางชีวเคมี และการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ของแม่ไก่ได้



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา เพชรพล พะต๊ะ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศ.ดร. น.ย.

PHOCHARAPON PASRI : EFFECTS OF ENERGY, VITAMIN C,
VITAMIN E AND SELENIUM IN MATERNAL DIETS ON FERTILE
PERIOD LENGTH OF SPERM, BIOCHEMICAL COMPOSITION AND
ANTIOXIDANT ACTIVITY IN UTERINE FLUID. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. SUTISA KHEMPAKA, Ph.D., 108 PP.

DIETARY ENERGY/ANTIOXIDANT/UTERINE FLUID/FERTILE PERIOD
LENGTH OF SPERM

This study aimed to examine the effects of the dietary metabolizable energy (ME) level, vitamin C, vitamin E and selenium (Se) on productive performance, fertile period length of sperm, and antioxidant activity. A total of 128 ISA Brown female laying hens aged 33 weeks were randomly allotted to 4 groups of 32 birds each in a Completely Randomized Design (CRD). All birds were fed diets of 109 g/day and free access to water under a 17 hours of light. The experimental diets consisted of 4 groups: 1) low energy (2,650 ME kcal/kg) diet; 2) low energy diet supplemented with 200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E, and 0.3 mg/kg of Se; 3) normal energy diet (2,900 ME kcal/kg); and 4) normal energy diet supplemented with 200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E, and 0.3 mg/kg of Se.

The results showed that the normal energy diet can improve energy intake, egg production, egg weight, and maintain ovarian integrity ($p < 0.05$). The supplementation of vitamin C, vitamin E, and Se in the low energy diet can increase egg production similar to the normal energy diet in both with and without supplementation ($p > 0.05$). In addition, the supplementation of vitamin C, vitamin E, and Se in the normal energy diet can increase egg weight compared to other groups and can also reduce abdominal

fat more than the normal energy diet without supplementation ($p < 0.05$). Furthermore, the supplementation of vitamin C, vitamin E, and Se in both energy levels can enhance glutathione peroxidase activity and vitamin E deposition in egg yolk. The antioxidant capacity (DPPH) and low TBARS of egg yolk in the normal energy diet with supplementation improved more than the other groups ($p > 0.05$); however, no significant differences were found in the fertile period length and fertility rate ($p > 0.05$). The biochemical composition of uterine fluid in hens fed the normal energy diet revealed that the glucose, α -glucose and β -glucose values, and malate dehydrogenase 1 expression were higher than the low energy diet ($p < 0.05$). The supplementation of vitamin C, vitamin E, and Se in both dietary energy levels increased glutathione peroxidase activity and superoxide dismutase 1 (SOD1) expression. Moreover, the highest enolase 1 expression was found in the normal energy diet supplemented with vitamins and mineral ($p < 0.05$).

In conclusion, it is indicated that dietary energy, vitamin C, vitamin E, and Se can enhance productive performance, antioxidant activity in egg yolk and uterine fluid, and can also alter biochemical composition and protein expression in uterine fluid of the hens.

School of Animal Production Technology

Academic Year 2017

Student's Signature Phocharapon Pasri

Advisor's Signature Sutisa Khumpaka

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสรา เข้มพะกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.วิฑูรย์ โมฬี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวคิดที่เป็นประโยชน์ทางวิชาการ และช่วยสนับสนุนงานด้านการทดลองในตลอดระยะเวลาของการศึกษา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ตลอดจนอาจารย์ผู้สอนทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ถ่ายทอดความรู้ทางด้านวิชาการ และประสบการณ์ต่างๆ ที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณทุน โครงการวิจัยระหว่างไทย-ฝรั่งเศส ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงาน ณ ประเทศฝรั่งเศส

ขอขอบพระคุณ Dr. Pascal Mermillod Dr. Nadine Gerard และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัย Nation Institute of Agronomical Research (INRA), France ที่ช่วยแนะนำขั้นตอนในการปฏิบัติงานด้านการทดลอง วิธีการเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ด้วยวิธี western blots ตลอดจนอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ขณะดำเนินการวิจัย ณ ประเทศฝรั่งเศส

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานสัตว์ปีก เจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยสนับสนุนไก่ไข่ และจัดสรรโรงเรือนสำหรับการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่านที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี และควบคุมการใช้เครื่องมือ

ขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาตรี และบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการดำเนินการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนคอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือจนประสบความสำเร็จในการศึกษา

พชรพล พะศรี

สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย)..... | ก |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)..... | ค |
| กิตติกรรมประกาศ | จ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| สารบัญตาราง | ญ |
| สารบัญภาพ..... | ฎ |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ | |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 3 |
| 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย | 4 |
| 1.4 ขอบเขตของงานวิจัย | 4 |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| 2 วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง | |
| 2.1 ท่อกักเก็บอสุจิ | 5 |
| 2.2 ปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตรอดของอสุจิขณะอาศัยอยู่ในท่อนำไข่ | 7 |
| 2.3 บทบาทของท่อกักเก็บอสุจิในการรักษาสภาพอสุจิ | 7 |
| 2.4 องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อการรักษา สภาพอสุจิ | 8 |
| 2.4.1 ผลของของเหลวที่หลั่งจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อระยะเวลาการมี ชีวิตรอดของอสุจิ และการปฏิสนธิ | 9 |
| 2.5 กระบวนการเมแทบอลิซึมพลังงานของอสุจิ | 10 |
| 2.5.1 ผลของระดับพลังงานในอาหารสัตว์ปีกต่อสมรรถนะการผลิต | 11 |
| 2.5.2 ผลของของเหลวที่หลั่งจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อระยะเวลาการมี ชีวิตรอดของอสุจิ และการปฏิสนธิ | 12 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|--------|--|----|
| 2.6 | ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)..... | 14 |
| 2.7 | สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการรักษาสุขภาพ ความสมบูรณ์พันธุ์พันธุ์ของอสุจิ | 15 |
| 2.8 | สารต้านอนุมูลอิสระ..... | 16 |
| 2.8.1 | กลไกการต้านอนุมูลอิสระร่วมกันของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม..... | 20 |
| 2.9 | วิตามินซี (Vitamin C) | 22 |
| 2.9.1 | การย่อยและการดูดซึมวิตามินซี..... | 22 |
| 2.9.2 | ความต้องการวิตามินซี..... | 23 |
| 2.9.3 | การขาดและความเป็นพิษของวิตามินซี | 24 |
| 2.10 | วิตามินอี (Vitamin E)..... | 24 |
| 2.10.1 | การย่อยและการดูดซึมวิตามินอี..... | 25 |
| 2.10.2 | ความต้องการวิตามินอี..... | 25 |
| 2.10.3 | การขาดและความเป็นพิษของวิตามินอี..... | 26 |
| 2.11 | วิตามินอี (Vitamin E)..... | 27 |
| 2.11.1 | การย่อยและดูดซึมซีลีเนียม | 27 |
| 2.11.2 | ความต้องการซีลีเนียม | 30 |
| 2.11.3 | การขาดและความเป็นพิษของซีลีเนียม | 30 |
| 2.12 | การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกเทศเมีย ต่อสมรรถนะการผลิต | 31 |
| 2.12.1 | ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อน้ำหนักไข่ และผลผลิตไข่ | 31 |
| 2.12.2 | ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกเทศเมีย ต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก..... | 33 |
| 2.12.3 | ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ | 37 |
| 2.12.4 | ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อ การพัฒนาระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน..... | 39 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|----------|--|----|
| 2.12.5 | ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อการสะสมวิตามินอี และซีลีเนียมไข่แดง | 39 |
| 3 | วิธีดำเนินการวิจัย | |
| 3.1 | การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของสุติ และอัตราการผสม | 43 |
| 3.1.1 | อาหารทดลอง | 43 |
| 3.1.2 | สัตว์ทดลอง | 44 |
| 3.1.3 | การผสมเทียม และการฟักไข่ | 46 |
| 3.1.4 | ลักษณะที่ต้องการศึกษา | 47 |
| 3.2 | การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อระบบสืบพันธุ์ องค์ประกอบทางเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 47 |
| 3.2.1 | การเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterine fluid) และไข่แดง | 48 |
| 3.2.2 | การศึกษาอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน | 48 |
| 3.2.3 | การวิเคราะห์ทางเคมี | 48 |
| 3.2.3.1 | การวัด 1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH) | 49 |
| 3.2.3.2 | การวัด Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) | 49 |
| 3.2.3.3 | การวัดค่า glutathione peroxidase (GPx) | 50 |
| 3.2.3.4 | การวิเคราะห์สารชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่โดยใช้เทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy | 50 |
| 3.2.3.5 | การวิเคราะห์วิตามินซี | 50 |
| 3.2.3.6 | การวิเคราะห์วิตามินอี | 51 |
| 3.2.3.7 | การวิเคราะห์ซีลีเนียม | 51 |
| 3.2.3.8 | การวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีวิธี BSA Protein Assay kit และการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blots | 51 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.3 | การวิเคราะห์ทางสถิติ..... | 52 |
| 3.4 | สถานที่ทำการทดลอง | 52 |
| 3.5 | ระยะเวลาในการทำการทดลอง..... | 52 |
| 4 | ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง | |
| 4.1 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด..... | 53 |
| 4.2 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์ และอวัยวะภายใน | 56 |
| 4.3 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อกิจกรรมการต้าน อนุมูลอิสระ และการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระภายในของเหลวจากต่อม สร้างเปลือกไข่ และไข่แดง | 58 |
| 4.4 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อองค์ประกอบชีวเคมี ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่..... | 63 |
| 4.5 | ผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อการแสดงออก ของโปรตีนSuperoxide Dismutase 1 (SOD1), Enolase 1 (ENO1) และ Malate Dehydrogenase 1 (MDH1) ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่..... | 65 |
| 5 | บทสรุปและข้อเสนอแนะ | |
| 5.1 | บทสรุป | 72 |
| 5.2 | ข้อเสนอแนะ..... | 72 |
| | รายการอ้างอิง..... | 74 |
| | ภาคผนวก ก | 89 |
| | ภาคผนวก ข | 93 |
| | ประวัติผู้เขียน | 108 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|----------|---|
| 2.1 | องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่9 |
| 2.2 | ผลของระดับพลังงานในอาหารสัตว์ปีกต่อน้ำหนักตัว ผลผลิต อัตราการผสมติด และเปอร์เซ็นต์ไข่ฟัก 13 |
| 2.3 | รูปแบบและตำแหน่งของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส18 |
| 2.4 | บทบาทของซีลีโนโปรตีน29 |
| 2.5 | ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียมต่อน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่..... 32 |
| 2.6 | ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก35 |
| 2.7 | ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 38 |
| 2.8 | ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกต่อองค์ประกอบทางเคมีในไข่ 40 |
| 3.1 | แสดงส่วนประกอบวัตถุดิบของสูตรอาหารทดลอง 45 |
| 4.1 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิตระยะการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด 55 |
| 4.2 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน 57 |
| 4.3 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ 62 |
| 4.4 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อองค์ประกอบชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ 65 |
| ข1 | วิธีการเตรียมระดับความเข้มข้นสารมาตรฐาน MDA 99 |
| ข2 | วิธีการเติมสารละลายในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ 102 |
| ข3 | วิธีการเติมสารละลายในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในไข่แดง 103 |
| ข4 | การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA 104 |
| ข5 | ส่วนประกอบของ Separating gel 8% และ 16%..... 106 |
| ข6 | ส่วนประกอบของ stacking gel 106 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 2.1 | ลักษณะทางกายวิภาคของท่อน้ำไข้ไก่เพศเมีย | 6 |
| 2.2 | กระบวนการเมแทบอลิซึมของพลังงานในเซลล์อสุจิ | 11 |
| 2.3 | สารอาหารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและรักษาความสมบูรณ์ของอสุจิ | 16 |
| 2.4 | กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส และวิถี ปฏิกิริยารีดอกซ์ของกลูต้าไธโอน | 19 |
| 2.5 | กลไกการทำงานของวิตามินซีและวิตามินอี | 21 |
| 2.6 | กลไกการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส | 22 |
| 2.7 | กระบวนการดูดซึมของวิตามินซี | 23 |
| 2.8 | กระบวนการดูดซึมของวิตามินอี | 26 |
| 2.9 | กระบวนการดูดซึมซีลีเนียม | 30 |
| 4.1 | ตัวอย่าง H^1 -NMR สเปกตรัมของของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 64 |
| 4.2 | การแสดงออกของโปรตีน ENO1, SOD1 และ MDH1 ภายในของเหลวจาก ต่อมสร้างเปลือกไข่เมื่อวัดโดยวิธี Western blot | 68 |
| 4.3 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน SOD1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 69 |
| 4.4 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน ENO1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 70 |
| 4.5 | ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน MDH1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 71 |
| g1 | การฉีดฮอร์โมน โพรสตาแกลนดินเข้าสู่เส้นเลือด wing vein | 91 |
| g2 | การเก็บตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ | 92 |
| ข1 | ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีพีพีเอชทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ | 94 |
| ข2 | ปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBA เป็น MDA-TBA adduct | 97 |
| ข3 | ปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBA เป็น MDA-TBA adduct | 99 |
| ข4 | กราฟมาตรฐานของกิจกรรมเอนไซม์ GPx | 102 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อัตราการผสมติดในฝูงไก่อแม่พันธุ์ เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่จะได้มาซึ่งจำนวนลูกไก่ที่อายุ 1 วัน ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผสมติดมีสาเหตุมาทั้งจากฝูงไก่อแม่พันธุ์และแม่พันธุ์ เช่น อายุ ความสมบูรณ์พันธุ์ ปัจจัยทางด้านอาหาร พันธุกรรม น้ำหนักตัว รูปแบบการผสมพันธุ์ สุขภาพ และการจัดการสภาพแวดล้อมในโรงเรือน เป็นต้น นอกจากนี้การเลี้ยงไก่อแม่พันธุ์ในระบบเข้มข้น (intensive system) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ง่ายขึ้น ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกินกว่าที่กลไกของร่างกายจะสามารถกำจัดออกได้ โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าแย่งเอาอิเล็กตรอนของโมเลกุลข้างเคียงจนกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื่อกันว่าอนุมูลอิสระของตัวอสุจิ ซึ่งอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีความว่องไวต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับโมเลกุลไขมัน (lipid peroxidation) ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลไขมันและคอเลสเตอรอล (Ahsan et al., 2014) การเคลื่อนย้ายของของเหลวภายในเยื่อหุ้มเซลล์ และคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านต่างๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป นำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการรักษาสมดุลของปริมาตร และเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Edens and Sefton, 2009; Ahsan et al., 2014) ส่งผลทำให้อัตราการผสมติดลดลง

ในประเด็นการแก้ปัญหาอัตราการผสมติดนักอาหารสัตว์มักให้ความสำคัญ และจัดการแก้ปัญหาในไก่อแม่พันธุ์มากกว่า เช่น การเสริมสังกะสี ซีลีเนียม และวิตามินอีในอาหารเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อ พัฒนาระบบสืบพันธุ์ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามจากการรวบรวมเอกสารพบว่า ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิในท่อนำไข่ (oviduct) ที่นานขึ้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่มีผลต่อการผสมติดเช่นกัน (Breque et al., 2003; Suria, 2005) ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ (fertile period length, FPL) เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมทางชีวเคมีต่างๆ ภายในของเหลวที่เหลือจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterine fluid) และท่อนำไข่ เช่น วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไธโอน (glutathione) เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) โดยมีความผันแปรไปตามสภาวะร่างกายของสัตว์ รวมถึงสารอาหารที่ได้รับ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าระดับพลังงานที่สัตว์ได้รับก็มีผลต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิเช่นเดียวกัน (Breque et al., 2003; Cufadar et al., 2010a; Ahammad et al., 2013a; Ahammad et al., 2013b) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสารอาหารที่มี

ผลในการยืดอายุการมีชีวิตของอสุจิในท่อนำไข่ยังขาดข้อมูลการศึกษา ดังนั้นการศึกษาบทบาทของพลังงานร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ เพื่อที่จะนำความรู้ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ทำสูตรอาหารให้มีความเหมาะสมเพื่อเพิ่มอัตราการผสมติด น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาได้

ตามปกติอสุจิจะมีชีวิตรอดในท่อนำไข่ของไก่เพศเมียประมาณ 14-21 วัน หลังการผสมพันธุ์ โดยจะถูกเก็บไว้ภายในท่อจัดเก็บอสุจิ (sperm storage tubules, SST) บริเวณรอยต่อระหว่างช่องคลอดและต่อมสร้างเปลือกไข่หรือมดลูก (utero-vaginal junction, UVJ) ซึ่งเป็นจุดหลักและบริเวณปากแตร (infundibulum) (Bakst, 2011) ความสามารถในการเก็บรักษาสเปิร์มให้มีชีวิตรอดได้นานเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมทางชีวเคมีในท่อนำไข่ การเสริมวิตามินอีในอาหารแม่ไก่ต่อการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระภายในเนื้อเยื่อท่อนำไข่ พบว่ามีการสะสมวิตามินซี วิตามินอี กลูต้าไธโอน เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในเนื้อเยื่อบริเวณช่องคลอด UVJ และต่อมสร้างเปลือกไข่ โดยปริมาณที่พบจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุของแม่ไก่ (Breque et al., 2006) และยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีนกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และแคทาเลสในเนื้อเยื่อท่อนำไข่ของแม่ไก่ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร (Carillon et al., 2016) จากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวคิดที่สำคัญในการพัฒนาสูตรอาหารสัตว์ให้มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถปรับปรุงสภาพแวดล้อมทางชีวเคมีของของเหลวภายในท่อนำไข่ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่จะเลือกใช้ต้องสามารถออกฤทธิ์ได้ภายในของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่ รวมถึงท่อนำไข่ส่วนอื่นๆ และยังมีคุณสมบัติในการรักษาคุณภาพอสุจิ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม เป็นต้น โดยวิตามินซีมีความสำคัญต่อกลไกการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวกลางที่เป็นน้ำน่าจะทำงานได้ดีในของเหลว สามารถทำงานร่วมกับวิตามินอีในกระบวนการคืนสภาพของวิตามินอี (vitamin E recycline) และมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน (Surai, 2005; Khan et al., 2012; Skrivan et al., 2013) วิตามินอีมีบทบาทป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวกลางที่เป็นไขมันช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (chain breaking antioxidant) สะสมได้ดีในไข่แดงส่งผลดีต่อการพัฒนาตัวอ่อน ซีลีเนียมมีบทบาทที่สำคัญต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และยังเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการสลายเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย (Puthongsiriporn et al., 2001; Surai, 2006; Ebeid, 2009) นอกจากนี้การเสริมวิตามินซี วิตามินอี หรือซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกเพศเมีย ยังมีบทบาทสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ กลไกการต้านอนุมูลอิสระ คุณภาพน้ำเชื้อ อัตราการผสมติด การฟักออก และสามารถสะสมภายในไข่ขาวและไข่แดง (Nowaczewaki and Kontecka, 2005; Leeson et al., 2008; Attia et al., 2010; Hassan et al., 2011

Khan et al., 2012) อีกทั้งระดับพลังงานในอาหารอาจมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมขั้นพื้นฐานที่ส่งผลต่อการผสมติดเช่นเดียวกัน เนื่องจากการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิของอสุจิภายในท่อนำไข่ ต้องใช้พลังงานในรูปของ ATP กระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อผลิต ATP อสุจิสามารถสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น glucose, fructose และ mannose รวมถึง glycerol, lactate, pyruvate และ acetate ในวิถีไกลิซิซิส (glycolysis pathway) จนได้เป็นไพรูเวต หลังจากนั้นไพรูเวตจะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (krebs cycle) ได้ผลผลิตเป็นพลังงานในรูป ATP (Pasupuleti, 2007) ปริมาณกลูโคสที่อยู่ภายในของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่เป็นแหล่งพลังงานหลักในการสนับสนุนกระบวนการเมแทบอลิซึมของอสุจิ (Ahammad et al., 2013; Ahammad et al., 2013a) จากการรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับระดับพลังงานในอาหารแม่พันธุ์สัตว์ปีก พบว่าระดับพลังงานในอาหารตั้งแต่ 2,080-2,950 kcal ME/kg มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ผลผลิตไข่ อัตราการผสมติด และเปอร์เซ็นต์ไข่ฟักที่แตกต่างกัน (Enting et al., 2007; Sunder et al., 2007; Cufadar et al., 2010a; Cufadar et al., 2010b; Ghonim et al., 2010) โดยปกติเมื่ออสุจิอยู่ในท่อนำไข่ ในช่วงแรกจะยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สะสมในเซลล์และน้ำหล่อเลี้ยงของอสุจิ (Surai et al., 1998; Surai, 2000) แต่หลังจากนั้นอสุจิจะถูกเก็บอยู่ภายใน SST ร่วมกับของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ดังนั้นการปรับปรุงค่าชีวเคมีของของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่ขณะที่อสุจิถูกเก็บใน SST เพื่อยืดอายุอสุจิน่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมติดได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การวิจัยเกี่ยวกับระบบการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่ยังมีการศึกษาที่จำกัด อีกทั้งการศึกษาพลังงานร่วมกับวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมยังขาดข้อมูลในการศึกษา ดังนั้นการศึกษาด้านอาหารดังกล่าวน่าจะเป็นอีกทางเลือกที่จะสามารถปรับปรุงระบบการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวภายใน SST ที่จะช่วยยืดอายุอสุจิ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ ต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ ระบบสืบพันธุ์ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของพลังงานร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิในท่อนำไข่

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของพลังงานร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อระบบสืบพันธุ์ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterine fluid)

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม สามารถเพิ่มสมรรถนะการผลิตและระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิในท่อนำไข่ และรักษาความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์

1.3.2 พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม สามารถปรับปรุงสารต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

1.3.3 พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม สามารถเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมี และการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลของพลังงานร่วมกับวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิภายในท่อนำไข่ ระบบสืบพันธุ์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ของแม่ไก่

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงบทบาทของพลังงาน วิตามินอี วิตามินซี และซีลีเนียม ต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในท่อนำไข่ของไก่เทศเมียที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของอสุจิและอัตราการผสมติด

1.5.2 นำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการเลือกวัตถุดิบอาหารสัตว์ รวมถึงประกอบสูตรอาหารสัตว์ที่สามารถเพิ่มระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิในท่อนำไข่ เพิ่มอัตราการผสมติด และท้ายที่สุดจะได้มาซึ่งจำนวนลูกไก่ต่อแม่ไก่มากขึ้น

บทที่ 2

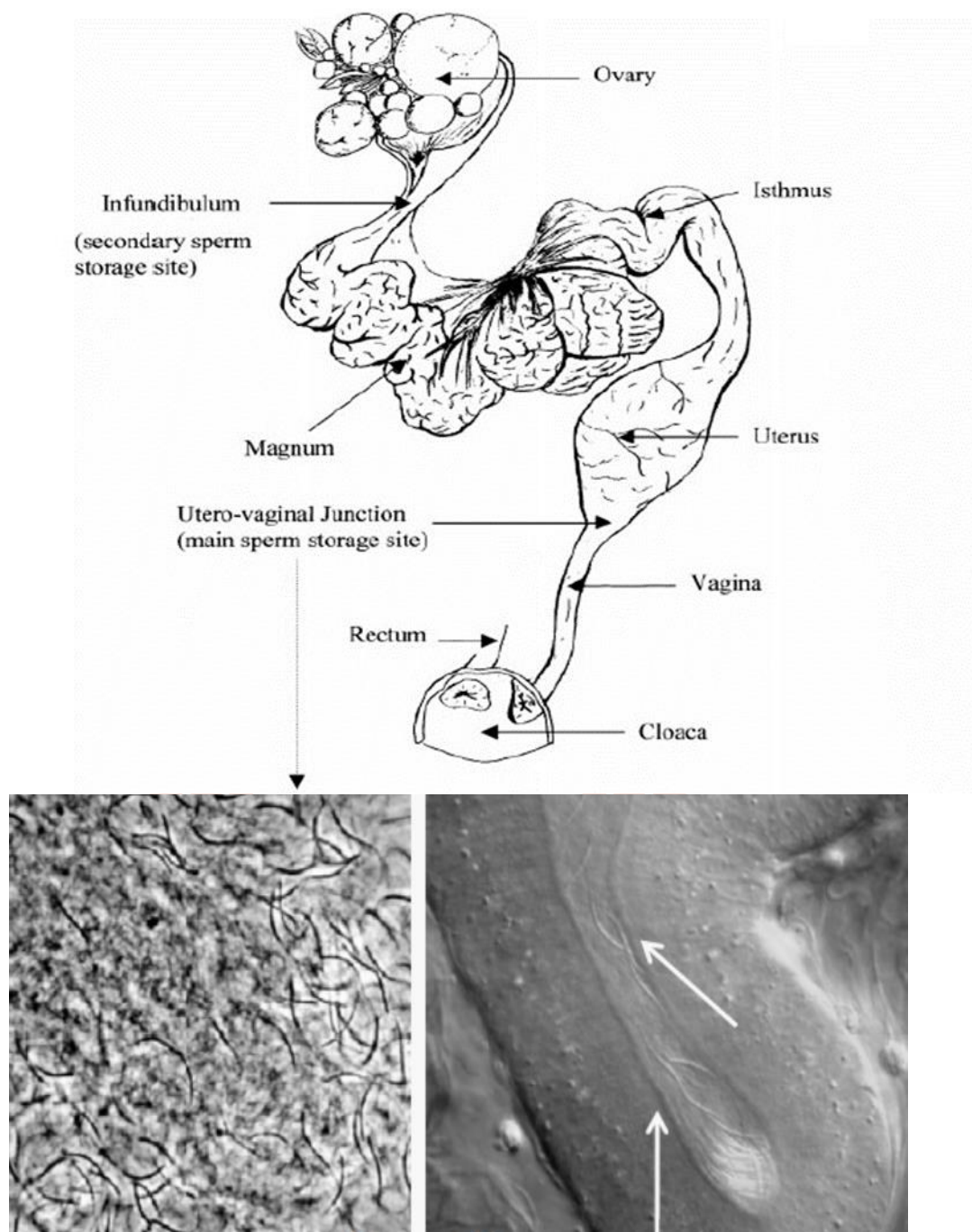
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ท่อกักเก็บอสุจิ

จุดเด่นที่สำคัญของสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศเมียคือ ความสามารถของท่อนำไข่ (oviduct) ที่สามารถรักษาคุณภาพอสุจิ เพิ่มระยะเวลาการมีชีวิตรอด และอัตราการผสมติด โดยทั่วไป ภายในท่อนำไข่ของสัตว์ปีกมีท่อกักเก็บอสุจิ (sperm storage tubules, SST) อยู่เป็นจำนวนมากตรงบริเวณรอยต่อระหว่างช่องคลอดและต่อมสร้างเปลือกไข่หรือมดลูก (utero-vaginal junction, UVJ) เป็นจุดหลักสำหรับการจัดเก็บอสุจิและยังพบที่บริเวณปากแตร (infundibulum) แสดงดังภาพที่ 2.1 (Breque et al., 2006) โดยมีฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ทำหน้าที่ควบคุมและการขยายตัวของท่อในการเก็บอสุจิ โครงสร้างของท่อกักเก็บอสุจิเป็นลักษณะท่อปลายปิดจำนวนประมาณ 2,000-4,900 ท่อต่อตัว ขนาด 200-600 ไมโครเมตร ซึ่งแตกต่างกันตามพันธุ์กรรม ภายในท่อกักเก็บอสุจิประกอบด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียวแบบไม่มีการหลั่งสารคัดหลั่ง และไม่มีลักษณะเป็นเซลล์ขน (nonciliated cell) เป็นส่วนใหญ่แต่ภายในมีของเหลวตลอดเวลา ภายหลังจากที่มีการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติหรือผสมเทียม อสุจิจะเคลื่อนที่ไปยัง UVJ และอาศัยภายใน SST โดยฝังตัวอยู่ในของเหลว ส่วนที่เหลือจะเคลื่อนที่ขึ้นตามทิสทางท่อนำไข่ อสุจิสามารถเคลื่อนที่ด้วยตนเองหรืออาศัยการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ และ ciliated cells ของท่อนำไข่ ในขณะที่แม่ไก่ตกไข่ อสุจิที่อาศัยอยู่จะทยอยออกมาแล้วเคลื่อนตัวไปรอเพื่อปฏิสนธิกับเซลล์ oocytes ในต่อไปที่บริเวณปากแตร ช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิในท่อนำไข่ของสัตว์ปีกแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อายุ และพันธุ์กรรม โดยไก่เพศเมียสามารถรักษาอสุจิไว้ใน SST ได้ถึง 14-21 วัน (Breque et al., 2003; Bakst, 2011)

การเก็บรักษาอสุจิภายในท่อนำไข่โดยที่อสุจิยังมีชีวิตรอดและผสมติดได้นั้นเกี่ยวข้องกับท่อ นำไข่ที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับอสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบทางชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterus fluid) ที่มีส่วนประกอบของสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ซับซ้อน ซึ่งของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ไม่เพียงแต่มีบทบาทเฉพาะการสร้างเปลือกเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์สำหรับการมีชีวิตรอดและการเคลื่อนไหว (Bakst, 2011; Blesbois, 2012) ในระหว่างที่อสุจิอาศัยอยู่บริเวณท่อกักเก็บอสุจิได้สัมผัสกับของเหลวตลอดเวลา ดังนั้นของเหลวภายในท่อ นำไข่ต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการทำหน้าที่ให้สารเคมี สารชีวเคมี หรือสารตั้งต้นแหล่งพลังงาน ในปริมาณเพียงพอเพื่อสนับสนุนสภาพที่เหมาะสมสำหรับการมีชีวิตของอสุจิ รวมถึงสามารถนำมาใช้กลายเป็นแหล่งพลังงาน (anabolisms) ในขณะที่อยู่ภายในท่อกักเก็บอสุจิ สามารถควบคุมสาร

ชีวโมเลกุลที่เป็นพิษจากระบวนการแคแทบอลิซึม (catabolism) ของอสุจิให้เป็นกลาง อีกทั้งป้องกันและยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่จะส่งผลเสียต่อผนังเซลล์อสุจิ (Breque et al., 2003)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางกายวิภาคของท่อนำไข่ไก่เพศเมีย

ที่มา: Breque et al. (2003) และ Bakst (2011)

2.2 ปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของอสุจิขณะอาศัยอยู่ในท่อนำไข่

การเลี้ยงไข่พ่อแม่พันธุ์ในระบบเข้มข้น (intensive system) มีหลายปัจจัย อาทิเช่น กระบวนการเมแทบอลิซึม คุณภาพอาหาร ความหนาแน่น อุณหภูมิ ความชื้น การทำวัคซีน สภาพแวดล้อม สุขภาพสัตว์และการจัดการโรงเรือน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระเกินกว่าที่กลไกของร่างกายจะสามารถกำจัดออกได้ โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าแย่งเอาอิเล็กตรอนของโมเลกุลข้างเคียงจนกลายเป็นปฏิกิริยาถูกโซ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในขณะอาศัยอยู่ในท่อนำไข่ของอสุจิ องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่อุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว polyunsaturated fatty acids (PUFA) ซึ่งกรดไขมันชนิดนี้มีความไวต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับโมเลกุลไขมัน (lipid peroxidation) ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลไขมันและคอเลสเตอรอล (Ahsan et al., 2014) ทำให้การเคลื่อนตัวคล้ายของเหลวภายในเยื่อหุ้มเซลล์ และคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านต่างๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป นำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการรักษาสมดุลของปริมาตร และเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ถ้าบริเวณส่วนหัว (head) ของอสุจิซึ่งมีนิวเคลียสที่บรรจุสารพันธุกรรมหรือส่วนกลาง (midpiece) ที่มีไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งให้พลังงานเมื่อเกิดความผิดปกติก็จะมีผลต่อการเคลื่อนไหวและการปฏิสนธิ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญส่งผลกระทบต่อการเสื่อมสภาพของอสุจิทำให้คุณภาพลดลง และอัตราการผสมติดลดลง (Edens and Sefton, 2009; Ahsan et al., 2014)

2.3 บทบาทของท่อกักเก็บอสุจิในการรักษาสภาพอสุจิ

ระยะเวลาการผสมติดของสัตว์ปีกมีความสัมพันธ์กับประชากรอสุจิที่อยู่ในท่อกักเก็บอสุจิ จึงกลายเป็นที่สนใจและมีข้อสงสัยเกี่ยวกับบทบาทของท่อกักเก็บอสุจิที่สามารถเป็นแหล่งของสารอาหารให้กับอสุจิ และกำจัดของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของอสุจิได้ ถึงแม้ว่ายังไม่พบกลไกเกี่ยวกับการรักษาสภาพอสุจิภายในท่อกักเก็บอสุจิได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพอสุจิ โดยเฉพาะเมื่ออสุจิได้เข้าสู่ภายในท่อกักเก็บแล้วจะหยุดการเคลื่อนที่จึงทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมและความต้องการใช้พลังงาน ATP ลดลง จึงนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระ reactive oxygen species จากกระบวนการเมแทบอลิซึมลดลงเพื่อควบคุมผลเสียที่จะเกิดขึ้นแก่อสุจิ (Bakst, 1985; Bakst and Richards, 1985) เยื่อหุ้มบริเวณท่อกักอสุจิสามารถปลดปล่อยกรดไขมันเป็นสารอาหารให้แก่อสุจิ เนื่องจากกรดไขมันจะถูกอสุจิออกซิเดชันเพื่อสร้างพลังงานในการเคลื่อนที่ (Bakst et al., 1994) อีกทั้งยังมีโปรตีนหลายชนิด รวมถึง carbonic anhydrase, avidin, aquaporins และ alkaline phosphatase มีบทบาทต่อการรักษาสภาพอสุจิ (Holm et al., 1996; Long et al., 2003; Zaniboni and Bakst, 2004) อีกปัจจัยที่สำคัญที่สนับสนุนการเก็บรักษาอสุจิในท่อนำไข่คือการป้องกันการต่อต้านอสุจิจากการตอบสนองของระบบ

ภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้เป็นเพราะระบบภูมิคุ้มกันในท่อนำไข่ถูกสร้างขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากการติดเชื้อโดยจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งอาจส่งผลต่อการรอดชีวิตของตัวอสุจิในกักเก็บได้ เมื่อร่างกายของสัตว์ปีกเพศเมียจดจำว่าอสุจิเป็นสิ่งแปลกปลอมในท่อนำไข่ Das et al. (2006) พบว่าอสุจิจะถูกปกป้องจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยโครงสร้างของท่อกักเก็บอสุจิและ transforming growth factor β (TGF β) โดยโครงสร้างของท่อกักเก็บอสุจิจะมีการแสดงออก TGF β และตัวรับ TGF β (receptor) เพิ่มขึ้นเมื่ออสุจิอยู่ภายในท่อกักเก็บอสุจิอาจป้องกันจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการต่อต้านอสุจิ

2.4 องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อการรักษาภาพอสุจิ

สารชีวเคมีที่พบในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งองค์ประกอบแร่ธาตุและกลูโคสที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองที่อสุจิสามารถใช้เป็นพลังงานสำรองสำหรับการเคลื่อนที่และกิจกรรมต่างๆ ส่วนสารชีวเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่น Ca^{+2} Mg^{+2} และ Zn^{+2} ช่วยป้องกันอสุจิจากการถูกออกซิไดซ์ (Ahammad et al., 2013a; Ahammad et al., 2013b) ค่าออสโมลาริตีที่ระดับ 250-460 mOsmol kg^{-1} ช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ในส่วนค่า pH ที่ระดับมากกว่า 7 (alkaline pH) ช่วยรักษาความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อบริเวณอะโครโซม (acrosome) ส่งผลให้อสุจิมีสักยภาพในการผสมติด (Sexton and Fewlass, 1978; Lake and Ravie, 1987)

ปัจจุบันได้มีการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยรวมของเซลล์ หรือที่เรียกกันว่า metabolomics เพื่อวิเคราะห์สารชีวเคมีในเซลล์ขณะใดขณะหนึ่งว่ามีวิถีและกลไกที่สัมพันธ์กันอย่างไรจากตัวอย่างของสิ่งมีชีวิต (biological sample) โดยใช้เทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Gregory et al., 2012) จากการศึกษาของ Gerard et al. (2015) พบว่าของเหลวจากฟอลลิเคิล (follicular fluid) ของวัว หมู และม้า มีองค์ประกอบสารชีวเคมีเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน ในของเหลวจากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณแอลฟาและเบต้ากลูโคสสูงกว่าฟอลลิเคิลขนาดเล็ก โดยกลูโคสสามารถถูกใช้ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) เพื่อควบคุมการเจริญของนิวเคลียสในเซลล์ นอกจากนี้ในของเหลวจากฟอลลิเคิลของม้าและวัวยังพบปริมาณซักซิเนต (succinate) และซิเตรท (citrate) ที่เป็นสารตัวกลางสำคัญในวัฏจักรเครบส์ (TCA cycle) ถึงแม้ว่ายังไม่พบการศึกษาองค์ประกอบสารชีวเคมีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ด้วยเทคนิค NMR แต่การศึกษานี้สัมพันธ์การแสดงออกของยีนที่ได้รับกระตุ้นด้วยปัจจัยจากสารอาหารที่ส่งผลต่อเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกระบวนการ

เมแทบอลิซึมในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ เพื่อหาสารตัวบ่งชี้ที่จำเพาะ (biomarker) ต่อการรักษาสภาพและการมีชีวิตรอดของอสุจิ

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

| Parameters | Plumping fluid ¹ | Calcifying fluid ² |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Volume (ml/hen) | 8.4±1.7 | 4.3±1.5 |
| Calcium (Ca ⁺² ; mmol/L) | 5.2 ± 0.5 | 9.4±0.3 |
| Magnesium (mg ⁺² ; mmol/L) | 5.9 ± 0.3 | 13.6±0.8 |
| Zinc (Zn ⁺² ; mmol/L) | 3.9 ± 0.4 | 4.1±0.3 |
| Glucose (g/L) | 5.8 ± 0.3 | 7.9±0.1 |
| pH | 7.6 ± 0.2 | 7.5±0.1 |
| Osmolality (mOsm/kg H ₂ O) | 296.3 ± 0.7 | - |

หมายเหตุ: ¹ Plumping fluid were collected after the arrival of a membranous egg in the uterus at 5 - 6 hr.

² Calcifying fluid were collected after the arrival of a membranous egg in the uterus at 13 hr.

ที่มา: Ahammad et al. (2013a) และ Ahammad et al. (2013b)

2.4.1 ผลของของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และการปฏิสนธิ

การศึกษาอิทธิพลของของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิที่ทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) Ahammad et al. (2013a) ได้ศึกษารักษาคุณภาพน้ำเชื้อ (Lake's solution, LS) ผสมกับของเหลวที่หลังมาจากต่อมสร้างเปลือกไข่ในอัตราส่วน 0, 10, 25 และ 50% (v/v) โดยของเหลวจะถูกเก็บหลังจากที่ไข่เคลื่อนมาอยู่บริเวณต่อมสร้างเปลือกไข่แล้วเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (plumping fluid, PF) พบว่า สารรักษาคุณภาพน้ำเชื้อที่ผสมกับของเหลวในอัตราส่วน 25-50% สามารถรักษาการมีชีวิตรอดของอสุจิได้นานถึงชั่วโมงที่ 72 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 96 ของเหลวในอัตราส่วน 25% มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาการมีชีวิตรอดของอสุจิ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าของเหลวที่หลังหลังจากไข่เคลื่อนที่มายังต่อมสร้างเปลือกไข่แล้ว 5-6 ชั่วโมง สามารถคงสภาพการมีชีวิตรอดของอสุจิได้ถึง 4 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งดีกว่าของเหลวที่หลังหลังจากไข่เคลื่อนมายังต่อมสร้างเปลือกไข่ (calcifying fluid, CF) แล้ว 13 ชั่วโมง ($p < 0.05$) (Ahammad et al., 2013b) จากผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึงของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่สามารถ

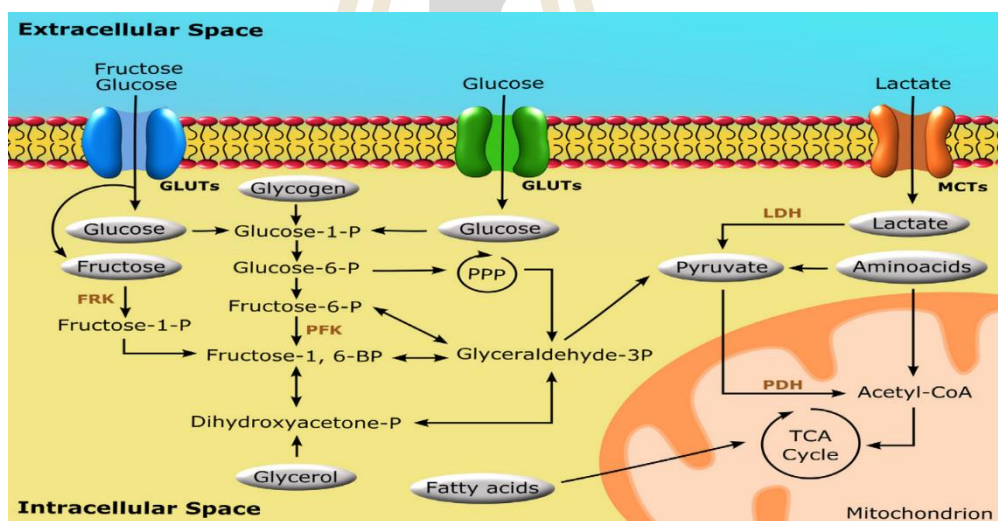
ช่วยให้ห่อสุกมีชีวิตรอดได้ และของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ยังสามารถช่วยรักษาความสมบูรณ์ของสุกที่ได้ถูกพิสูจน์จากความสามารถในการเจาะเชื้อหุ้มในไข่แดงไข่ชั้นที่เพิ่มขึ้น จากผลดังกล่าวล้วนเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีภายในของเหลวที่ช่วยรักษาสภาพของสุก เนื่องจากสารชีวเคมีที่พบในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีกลูโคสเป็นสารตั้งต้นที่ใช้สำหรับการสร้างพลังงานในรูปแบบ ATP สำหรับกิจกรรมต่างๆ ของสุก (Ahammad et al., 2013a; Ahammad et al., 2013b) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Amaral et al. (2011) รายงานว่าห่อสุกมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใส่กลูโคสในสารละลายน้ำเชื้อ (extender) เพราะกลูโคสทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองหลักให้กับสุกในกระบวนการเมแทบอลิซึม

2.5 กระบวนการเมแทบอลิซึมพลังงานของสุก

การย่อยสลายสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ลิพิด และโปรตีนในกระบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีให้ได้พลังงาน รวมทั้งโมเลกุลหน่วยการสร้าง (building block) สารอินเทอร์มีเดียต และสารตั้งต้น ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ต่อไป สารอาหารพลังงานหรือสารชีวโมเลกุลที่เซลล์ต่างๆ สามารถนำไปสลายเพื่อให้ได้พลังงานอิสระจะถูกเก็บไว้ในรูป ATP หรือสารประกอบฟอสเฟตพลังงานสูงชนิดอื่น (พจน์ และคณะ 2555) ดังนั้นระดับพลังงานในอาหารอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่สุกสามารถจะนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งความต้องการพลังงานในรูปแบบ ATP สำหรับการเคลื่อนที่ของสุกจะเปลี่ยนไปเมื่อสุกเหล่านั้นอาศัยอยู่ในท่อนำไข่ เนื่องจาก ATP จะต้องมีปริมาณที่พอเพียงต่อกระบวนการเคลื่อนที่และการปฏิสนธิ

สุกสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น glucose, fructose หรือ mannose รวมไปถึงสารอินเทอร์มีเดียต glycerol, lactate, pyruvate และ acetate จากภายนอกเซลล์ดูดซึมผ่านผนังเซลล์เข้าสู่วิถีไกลโคลิซิส (glycolysis pathway) และวัฏจักร tricarboxylic acid (TCA) cycle ตามลำดับ จนกระทั่งได้พลังงานในรูปแบบ ATP เนื่องจากสุกไม่มีโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากบริเวณช่วงกลางลำตัว (mid-piece) เป็นแหล่งผลิต ATP ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการเคลื่อนที่และกิจกรรมต่างๆ โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของสุกเริ่มจากเมื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (glucose และ fructose) ถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน glucose transporter ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคลิซิสถูกเปลี่ยนเป็น glucose-1-phosphate หลังจากนั้น glucose-1-phosphate เปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate จนกระทั่งถูกเอนไซม์ phosphofructokinase (PFK) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้อยู่ในรูปแบบ fructose-1,6-biphosphate และถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphat ตามขั้นตอนของวิถีไกลโคลิซิส หรือ glucose-6-phosphate สามารถผ่านตรงเข้าสู่วิถี pentose phosphate pathway (PPP) จนกลายเป็น glyceraldehyde-3-phosphat เช่นเดียวกับน้ำตาล fructose เข้าสู่วิถีฟรุกโตลิซิส (fucetolysis)

แล้วถูกเอนไซม์ fructokinase (FRK) เร่งปฏิกิริยาจนเปลี่ยนรูปเป็น fructose-1,6-biphosphate และ glyceraldehyde-3-phosphat ตามลำดับ ซึ่งทั้งวิถีไกลโคไลซิสและฟรุกโตไลซิสในขั้นตอนสุดท้ายได้สาร glyceraldehyde-3-phosphat เหมือนกัน สำหรับสังเคราะห์ไขมัน โดย glyceraldehyde-3-phosphat ในวิถีไกลโคไลซิสใช้ 2 ATP ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล และได้ 4 ATP ในขั้นตอนการสร้างไขมันจาก glyceraldehyde-3-phosphat ทำให้ได้พลังงานสุทธิ 2 ATP จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน 1 โมเลกุลของกลูโคส ในส่วนของกระบวนการเมแทบอลิซึมพลังงานที่ใช้แลคเตส (lactase) เป็นสารตั้งต้นโดยผ่านเข้าสู่เซลล์ทาง monocarboxylate transporters (MCTs) และถูกเปลี่ยนเป็นไขมันได้ โดยมีเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไขมันที่ถูกสร้างจากสารตั้งต้นต่างๆ จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ผลิต NADH และ $FADH_2$ หลังจากนั้นเกิดออกซิเดชัน NADH และ $FADH_2$ ในกระบวนการ electron transport chain นอกจากนี้ยังสร้าง ATP โดย phosphorylation oxidative และพบว่า อสุจิยังสามารถใช้กรดอะมิโนและกรดไขมันเป็นแหล่งพลังงานสำหรับวัฏจักร TCA ได้ แสดงไว้ดังภาพที่ 2.2 (Pasupuleti, 2007; Dias et al., 2014)



ภาพที่ 2.2 กระบวนการเมแทบอลิซึมของพลังงานในเซลล์อสุจิ

ที่มา: Dias et al. (2014)

2.5.1 ผลของระดับพลังงานในอาหารสัตว์ปีกต่อสมรรถนะการผลิต

พลังงาน และ โปรตีนมีผลโดยตรงต่อสมรรถนะการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำหนักไข่ และผลผลิตไข่ ซึ่งผลของระดับพลังงานที่แตกต่างกันในอาหารสัตว์ปีกต่อน้ำหนักตัว ผลผลิตไข่ อัตราการผสมติดและเปอร์เซ็นต์ไข่ฟักได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 จากการศึกษาในระดับพลังงานในอาหารแม่พันธุ์ไก่เนื้อพบว่า พลังงานที่ระดับ 2,860 kcal ME/kg มีผลต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และที่

ระดับ 2,340 และ 2,080 kcal ME/kg สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ไขมันได้ ($p < 0.05$) แต่พลังงานที่ระดับ 2,080, 2,340, 2,600 และ 2,860 kcal ME/kg ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด ($p > 0.05$) เนื่องจากระดับพลังงานที่สูงเกินไปส่งผลให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักตัวของไก่อ่อนแม่พันธุ์มีความผันผวนอย่างมากกับการให้ผลผลิตไข่และอัตราการผสมติด (Sunder et al., 2007) ในส่วนของ Ghonim et al. (2010) พบว่าระดับพลังงานที่ 2,750 kcal ME/kg ช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดสูงกว่าพลังงานที่ระดับ 2,950 kcal ME/kg ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันในระดับพลังงานอาหารที่ 2,750, 2,850 และ 2,950 kcal ME/kg ($p > 0.05$) และการศึกษาของ Cufadar et al. (2010a) พบว่าระดับพลังงาน 2,700 kcal ME/kg ในอาหารแม่พันธุ์นกกะทาสสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ไขมันได้สูงสุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับพลังงาน 2,900 kcal ME/kg ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในไข่แดงที่เชื่อมโยงกับสัดส่วนไขมันที่ได้รับจากอาหารซึ่งสามารถเป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาตัวอ่อน แต่ระดับพลังงานที่ 2,700 และ 2,900 kcal ME/kg ไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัว ผลผลิตไข่ และอัตราการผสมติด อีกทั้งยังมีการรายงานว่าพลังงานในอาหารสัตว์ปีกที่ระดับ 2,200 kcal ME/kg ให้ผลผลิตไข่สูงเมื่อเทียบกับ 2,800 kcal ME/kg ($p < 0.05$) แต่พลังงานที่ระดับ 2,200, 2,500 และ 2,800 kcal ME/kg ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัว อัตราการผสมติดและเปอร์เซ็นต์ไขมัน (Enting et al., 2007) นอกจากนี้บางการศึกษายังพบว่าระดับพลังงานในอาหาร 2,600-2,900 kcal ME/kg ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัว ผลผลิตไข่ รวมไปถึงอัตราการผสมติดและเปอร์เซ็นต์ไขมัน (Cufadar et al., 2010b) การพิจารณาปริมาณพลังงานที่แม่ไก่ได้รับควรคำนึงถึงความต้องการขั้นพื้นฐานให้เหมาะสำหรับการบำรุงรักษาร่างกาย กิจกรรม และผลผลิต ซึ่งในระยะการให้ผลผลิตเมื่อแม่ไก่ได้รับพลังงานที่ไม่เพียงพออาจส่งผลให้คุณภาพไข่แยลง ผลผลิตไข่และน้ำหนักตัวลดลง รวมถึงประสิทธิภาพการใช้พลังงานลดลง หรือการได้รับพลังงานที่มากเกินไปก็ส่งผลให้น้ำหนักตัวและไขมันช่องท้องที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบสืบพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามการปรับเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของพลังงานในอาหารแม่ไก่อาจส่งผลในทางตรงกันข้ามต่อปริมาณพลังงานที่กินได้ สมรรถนะการผลิต และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นไข่

2.5.2 ผลของระดับพลังงานในอาหารไก่เพศเมียต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน

ระดับพลังงานในอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ Sunder et al. (2007) ได้ศึกษาความแตกต่างของระดับพลังงานที่ 2,080, 2,340, 2,600 และ 2,860 kcal ME/kg ในอาหารไก่พันธุ์อายุ 5-20 สัปดาห์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของไขมันบริเวณช่องท้อง (abdominal fat) ในกลุ่มที่ได้รับพลังงาน 2,860 kcal ME/kg น้ำหนักตัวในกลุ่มที่ได้รับพลังงาน 2,340-2,860 kcal ME/kg และน้ำหนักก่อนไข่ที่ในกลุ่มที่ได้รับพลังงาน 2,860-2,340 kcal ME/kg ($p < 0.05$) การศึกษาระดับพลังงานในแม่ไก่พื้นเมืองที่อายุ 16 และ 20 สัปดาห์ พบว่าพลังงานที่ระดับ 3,000

kcal ME/kg ช่วยพัฒนาให้แม่ไก่มีน้ำหนักรังไข่เพิ่มขึ้นที่อายุ 16 สัปดาห์เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานที่ระดับ 2,850 kcal ME/kg ($p < 0.05$) แต่อย่างไรพลังงานที่ระดับ 2,850 และ 3,000 kcal ME/kg ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักและความยาวของท่อรังไข่ รวมถึงจำนวนของฟอลลิเคิล (ovarian follicle) ($p > 0.05$) ทั้งสองสัปดาห์ (Buakeeree and Nualhnuplong, 2016)

ตารางที่ 2.2 ผลของระดับพลังงานในอาหารสัตว์ปีกต่อน้ำหนักตัว ผลผลิต อัตราการผสมติดและเปอร์เซ็นต์ไข่ฟัก

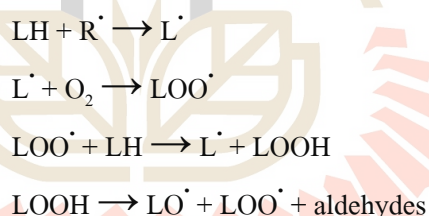
| Dietary energy level | body weight (g) | Egg production % | Fertility (%) | Hatchability (%) | References |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| 2,080 kcal ME/kg | 3,281 ^b | - | 89.79 ^a | 79.81 ^a | |
| 2,340 kcal ME/kg | 3,321 ^b | - | 91.34 ^a | 79.39 ^a | Sunder et al., (2007) |
| 2,600 kcal ME/kg | 3,306 ^b | - | 79.39 ^a | 66.69 ^b | |
| 2,860 kcal ME/kg | 3,470 ^a | - | 87.17 ^{ab} | 70.73 ^b | |
| 2,200 kcal ME/kg | 4,338 ^a | 60.20 ^a | 93.30 | 86.80 ^a | Enting et al., (2007) |
| 2,500 kcal ME/kg | 4,253 ^{ab} | 58.00 ^{ab} | 93.30 | 85.90 ^{ab} | |
| 2,800 kcal ME/kg | 4,233 ^{ab} | 57.70 ^b | 93.40 | 86.50 ^a | |
| 2,700 kcal ME/kg | 492.30 | 21.20 | 94.46 | 88.24 ^a | Cufadar et al.,(2010a) |
| 2,900 kcal ME/kg | 485.10 | 20.80 | 81.51 | 44.29 ^b | |
| 2,600 kcal ME/kg | 493.50 | 27.60 | 72.30 | 72.00 | Cufadar et al.,(2010b) |
| 2,900 kcal ME/kg | 482.70 | 24.70 | 80.90 | 66.50 | |
| 2,750 kcal ME/kg | - | - | 90.97 ^a | 75.94 | Ghonim et al., (2010) |
| 2,850 kcal ME/kg | - | - | 90.18 ^{ab} | 75.49 | |
| 2,950 kcal ME/kg | - | - | 89.64 ^b | 76.65 | |

หมายเหตุ: ^{a,b} Means within a columns with different letter different significantly ($P < 0.05$)

ME = metabolizable energy

2.6 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือ Oxidative stress คือ ภาวะความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ (prooxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เกิดขึ้นในเซลล์หรือร่างกาย อนุมูลอิสระเป็น อิเล็กตรอนอิสระหรือไม่ครบคู่อยู่ในวงรอบนอกของอะตอม หรือ โมเลกุลมีความไม่เสถียรภาพและ ความไวในการเกิดปฏิกิริยาที่สูงมาก ซึ่งความสามารถในการทำลายสารชีวโมเลกุล ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (Surai et al., 2016) โดยสารชีวโมเลกุลเหล่านี้มีความไวต่อการ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งไขมันถือเป็นสารชีวโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดย อนุมูลอิสระ เนื่องจากไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ การที่ไขมันถูกออกซิไดซ์โดย อนุมูลอิสระมีผลให้มีการเพิ่มขึ้นของค่ามาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) ซึ่งเป็น ผลผลิตที่เกิดจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation, LPO) เมื่ออนุมูลอิสระเป็นตัวหลักใน การเข้าทำลายไขมันจะเกิดกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์ และ ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Hermes-Lima et al. 1998) โดยปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ ออกซิเดชันเกิดขึ้นเมื่อมีอนุมูลอิสระเข้ามาทำปฏิกิริยากับไขมัน (autoxidation of lipid; LH) ทำให้ เกิดอนุมูลไขมัน (L[•] หรือ R[•]) เช่น $\cdot\text{OH}$ เมื่อมี L[•] เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ O₂ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น lipid peroxide (LOO[•]) และ LOO[•] จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมันอื่นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น lipid peroxidase (LOOH หรือ LPO) โดยมีสมการได้ดังนี้ (Jeejeebhoy, 1991)



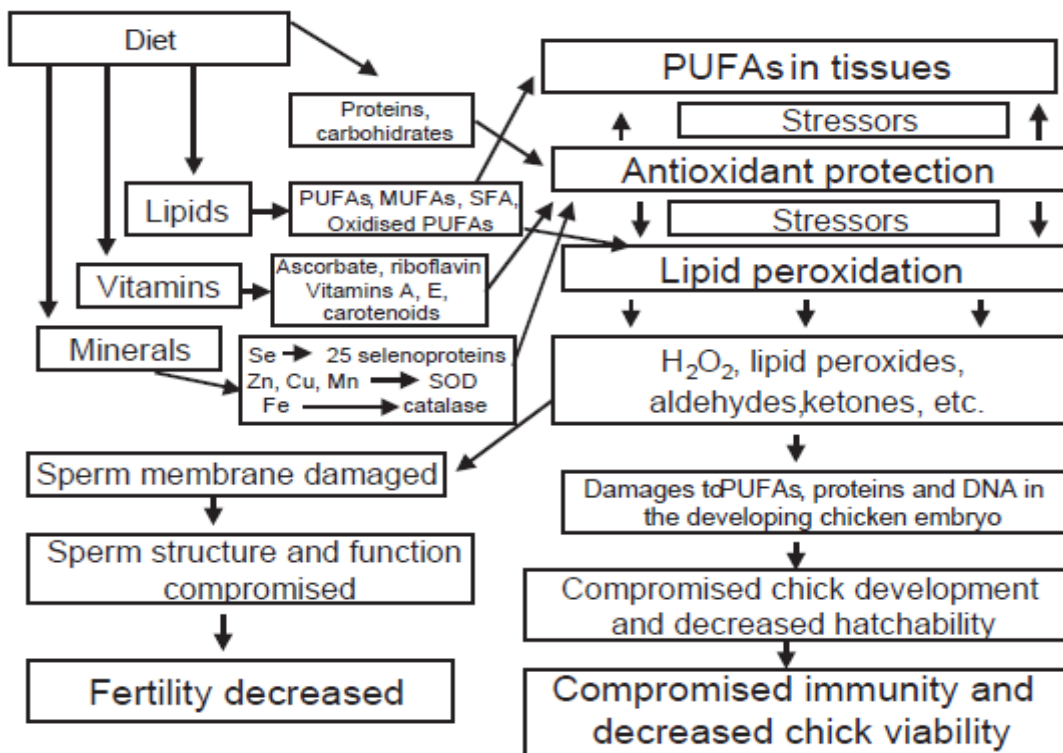
เมื่อภายในเซลล์มีปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเกิดขึ้น แสดงว่าเซลล์มีความไม่สมดุล เกิดขึ้นระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นทำให้ ได้สารประกอบพวกคาร์บอนิล (reactive carbonyl compounds) เช่น ไฮดรอกซีแอลคีนอล (4-hydroxy alkenals) และ MDA ซึ่งสารประกอบ 2 ชนิดนี้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญ ถึงภาวะที่เซลล์ หรือ เนื้อเยื่อของสัตว์ได้รับความบาดเจ็บหรือเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Esterbauer et al., 1991)

อนุมูลอิสระภายในร่างกายมีการสร้างขึ้นอย่างต่อเนื่องและเป็นปกติตามธรรมชาติ โดย สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อผลิตพลังงาน โดยไมโทคอนเดรีย ภายในเซลล์จะทำหน้าที่ในการหายใจนำออกซิเจนมาใช้เป็นพลังงาน ออกซิเจนบางส่วนเหลือ ตกค้างอยู่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ ในส่วนของกระบวนการเมแทบอลิซึม สารอาหารภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ทั้งนั้น อนุมูลอิสระจึงถูกสร้างขึ้นในไมโทคอนเดรีย และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น การอักเสบ ภาวะ

สารอาหารที่ขาดความสมดุล ความเครียดจากความร้อน กระบวนการเมแทบอลิซึมที่สูง การหายใจ ภาวะโรค และการติดเชื้อจากปรสิตอาจนำไปสู่การก่อตัวของอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ซึ่งเกิดขึ้นเองในกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย อนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ เกิดความเสียหาย โดยชนิดของอนุมูลอิสระที่พบได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide, O_2^-) อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl, OH^{\cdot}) ซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen, 1O_2) อนุมูลไนโตรเจนออกไซด์ (nitric, oxide NO^{\cdot}) เปอร์ออกซีไนไตรท์ peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) และไนตริกออกไซด์ nitrogen dioxide (NO_2) (มนต์สรวง, 2557)

2.7 สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการรักษาสุขภาพความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ

นักโภชนศาสตร์อาหารสัตว์ได้ให้ความสำคัญในเรื่องของโภชนะต่างๆ ในสูตรอาหาร โดยเน้นสารอาหารครบถ้วนตรงตามความต้องการของร่างกายสัตว์ เพื่อให้สัตว์มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด ความเครียดออกซิเดชันเป็นปัญหาที่สำคัญในไก่พ่อแม่พันธุ์ทำให้เกิดเปอร์ออกไซด์ (peroxide, ROO^{\cdot}) หรือสารอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ของอสุจิ ส่งผลให้อัตราการผสมติดและฟักออกลดลง นอกจากนี้การจัดต่างๆ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวแล้ว การเสริมวิตามินและแร่ธาตุๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามินซี วิตามินอี วิตามินเอ ไบโอฟลาวิน แคโรทีนอยด์ ซีลีเนียม คอปเปอร์ ซิงค์ และแมงกานีสในอาหารพ่อแม่พันธุ์ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะลดอนุมูลอิสระ (Surai, 2005) แสดงดังภาพที่ 2.3

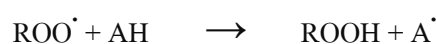
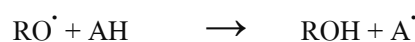
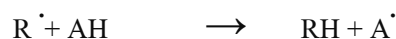


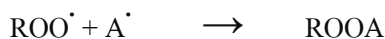
ภาพที่ 2.3 สารอาหารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและรักษาความสมบูรณ์ของสperm
ที่มา: Surai (2005)

2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีมากมายหลายชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันไป สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานได้หลายแบบ

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรหรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA), Vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น





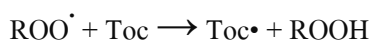
2. Singlet oxygen quenching ($1O_2$) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen ($1O_2$) โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($3O_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล

3. Metal chelating โลหะหนัก เช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออก ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภทเช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (อธิป, 2557)

5. เสริมฤทธิ์ (synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α -tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอี แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอลเปอร์ออกไซด์ (α -tocopherol peroxy) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟา-โทโคฟีรอลกับอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($ROO\cdot$) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็น แอลฟา-โทโคฟีรอลที่สามารถทำงานได้

6. การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain breaking) วิตามินอี ยูบิควินอล คาโรทีน วิตามินเอ วิตามินซี กรดยูริก หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ สารต้านอนุมูลอิสระนี้จะยับยั้งการแพร่กระจายของปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยการกำจัดอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($ROO\cdot$) ที่เป็นตัวก่อให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกลูกโซ่ โดยเฉพาะวิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลเปอร์ออกไซด์



สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

1. สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ (antioxidant enzymes) ในเซลล์สิ่งมีชีวิตสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมของสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้มีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบร่วมที่สำคัญ เช่น Se, Cu, Zn, Mn และ Fe เป็นต้น (ไมตรี และคณะ 2555) แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่เอนไซม์

1.1 ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase, SOD) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเองมีหน้าที่สำคัญในการจำกัดซุปเปอร์ออกไซด์ ($2O_2^{\cdot-}$) ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิเจน O_2 นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลไนตริก (nitric oxide) (Fukai and Ushio-Fuka, 2011) เอนไซม์ SOD แบ่งกลุ่มเป็น 3 กลุ่มตามชนิดโลหะที่อยู่บริเวณแอคทีฟ (active site) โดยส่วนใหญ่มีโลหะหนัก Cu, Zn และ Mn เป็นโคแฟกเตอร์ แสดงดังตารางที่ 2.3

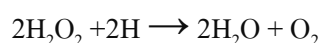


ตารางที่ 2.3 รูปแบบและตำแหน่งของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส

| Isoform | Metal cofactor | Location |
|--------------|------------------------------|---|
| SOD1 | Cu ²⁺ (catalytic) | Cytoplasm, mitochondrial IMS, and others |
| (Cu/ZnSOD) | Zn ²⁺ (catalytic) | (nucleus, lysosomes, peroxisomes) |
| SOD2 (MnSOD) | Mn ²⁺ (catalytic) | Mitochondria matrix |
| SOD3 (ecSOD) | Cu ²⁺ (catalytic) | Extracellular matrix, cell surface, extracellular |
| | Zn ²⁺ (catalytic) | fluids |

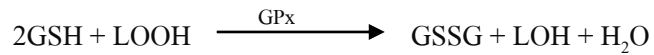
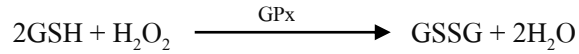
ที่มา: Fukai and Ushio-Fuka (2011)

1.2 เอนไซม์คาตาเลส (Catalase, CAT) เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจนโดยใช้ substrate เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จำนวน 2 โมเลกุล ซึ่งจะทำหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์คิว โดยเอนไซม์ชนิดนี้มี Mn หรือ Fe เป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic cell)

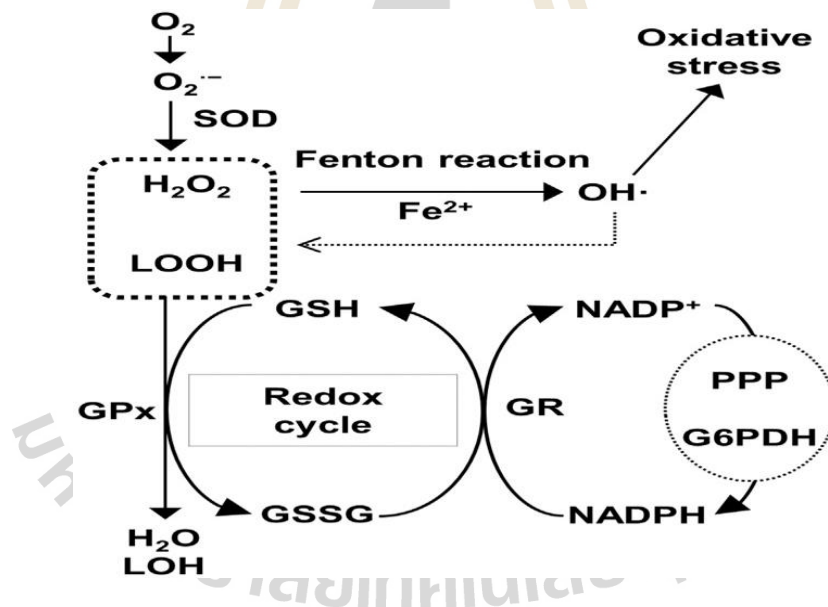


1.3 เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) เป็นเอนไซม์ชนิดซีลีโนโปรตีน มีโครงสร้างเป็นแบบ tetrameric ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยจะมีซีลีโนซิสทีอีน (selenocysteine) เป็นองค์ประกอบอยู่บริเวณเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ชนิดนี้ต้องการไอออนของซีลีเนียมเป็นโคแฟกเตอร์ ซึ่งจะเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ และลิพิดเปอร์

ออกซิเดชัน (LOOH) เป็นแอลกอฮอล์ (alcohols) โดยเอนไซม์ GPx เป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ให้กับกลูต้าไธโอนในรูปรีดิวส์ (GSH) ในการให้อิเล็กตรอน



ระหว่างการเร่งปฏิกิริยาโดย GPx จำเป็นต้องอาศัยกลูต้าไธโอนในรูปรีดิวส์ (GSH) เป็นสารตั้งต้นในการทำงาน และกลูต้าไธโอนถูกเปลี่ยนให้เป็นกลูต้าไธโอนในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะตรงกันข้ามกับเอนไซม์กลูต้าไธโอนรีดักซิเตส (glutathione reductase, GR) ซึ่งจะเปลี่ยนกลูต้าไธโอนในรูปออกซิไดซ์ให้กลับเป็นกลูต้าไธโอนในรูปรีดิวส์อีกครั้ง โดยจำเป็นต้องใช้ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่ง NADPH ได้มากระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสโดยปฏิกิริยาการกระตุ้นของเอนไซม์ glucose 6-phosphate dehydrogenase ในวิถี pentose phosphate pathway (PPP) ตามกลไกที่แสดงดังภาพที่ 2.4 (Higuchi, 2014)



ภาพที่ 2.4 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส และวิถีปฏิกิริยารีดอกซ์ของกลูต้าไธโอน (Higuchi, 2014)

2. สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มไม่ใช่เอนไซม์ (non-antioxidant enzymes) มีความสำคัญมากในระบบป้องกันอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดอกซ์ที่สามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่สารอนุมูลอิสระ ทำให้สารอนุมูลอิสระนั้นไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ต่อไป หรือสารเหล่านี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระก่อนที่อนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์และโครงสร้างเซลล์ หรือ

ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาถูกโซ่ในร่างกายได้แก่ วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) วิตามินเอ (vitamin A) เบต้า-แคโรทีน (β -carotenoids) กรดยูริก (uric acid) ทอรีน (taurine) คานทีน (carnitine) หรือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มไม่ใช่เอ็นไซม์โดยเฉพาะวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียม สามารถทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งส่วนใหญ่สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ต้องได้รับผ่านทางอาหาร

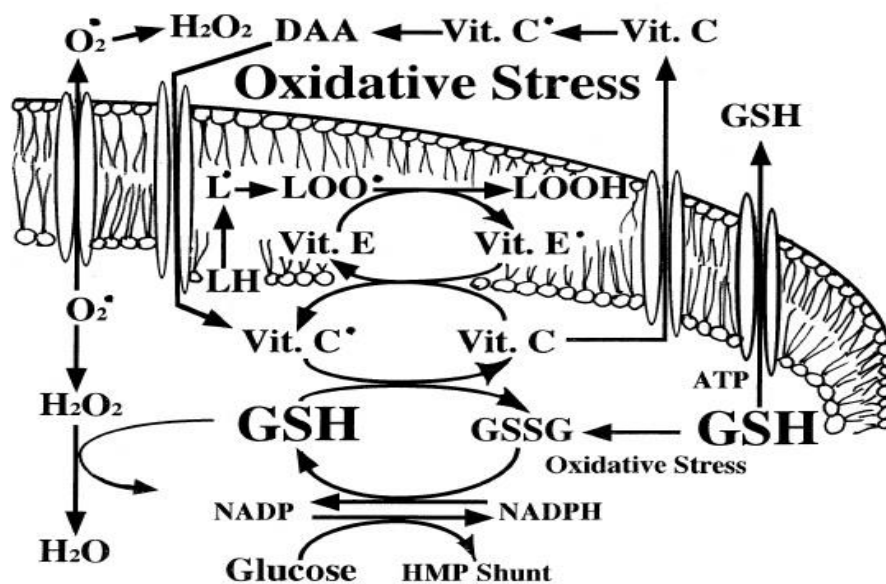
2.1 วิตามินซี คือ reducing agent ที่สำคัญในกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิตามินซีสามารถเข้าทำปฏิกิริยาโดยการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radical, singlet oxygen, peroxy radical, alkoxy radical, superoxide anion radical, peroxy nitrite, nitrogen dioxide radical และ nitric oxide รวมถึงกับสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ เช่น ozone และ hypochlorous acid เป็นต้น วิตามินซีมีคุณสมบัติที่สามารถละลายในน้ำได้ดีจึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์บริเวณของเหลวระหว่างเซลล์และภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการคืนสภาพของวิตามินอีและกลูต้าไธโอนหลังจากกำจัดอนุมูลอิสระ

2.2 วิตามินอีมีบทบาทการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และป้องกันการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ วิตามินอีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้หลายชนิดและภายหลังทำปฏิกิริยาจะเปลี่ยนรูปเป็น α -tocopheroxyl radical เนื่องจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมันทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นได้ดีในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์และลิปิดในไลโปโปรตีน โดยการหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ (chain-breaking antioxidant) ของอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxy radical) ก่อนที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับลิพิดตัวอื่นๆ

2.8.1 กลไกการต้านอนุมูลอิสระร่วมกันของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม

การทำงานของวิตามินซีและวิตามินอีภายในเซลล์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางธรรมชาติที่ชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำ (hydrophilic หรือ hydrophobic) เช่น วิตามินซีและกลูต้าไธโอน (glutathione, GSH) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นน้ำ ส่วนวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นไขมัน การทำงานร่วมกันของวิตามินอีและวิตามินซีเริ่มจากเมื่อลิปิดบนผนังเซลล์ถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระจะเกิดเป็น lipid peroxy radical และเข้าทำปฏิกิริยากับลิพิดตัวอื่นๆ โดยเกิดการดึงไฮโดรเจนได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็น lipid hydroperoxide (LOOH) และ lipid peroxy radical (LOO \cdot) ซึ่ง lipid radical ที่ได้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจนได้เป็น lipid peroxy radical ในขณะที่ปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) กำลังดำเนินไปนั้น วิตามินอีจะแย่งเข้าทำปฏิกิริยากับ lipid radical โดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแล้วกลายเป็นอนุมูล α -tocopheroxyl radical จากนั้น α -tocopheroxyl radical ที่เกิดขึ้นจะได้รับการให้อิเล็กตรอนจากวิตามินซี ทำให้ได้ α -tocopherol กลับคืนสภาพมาใช้ใหม่อีกครั้ง ส่วนวิตามินซีที่อยู่ในรูป dehydroascorbate

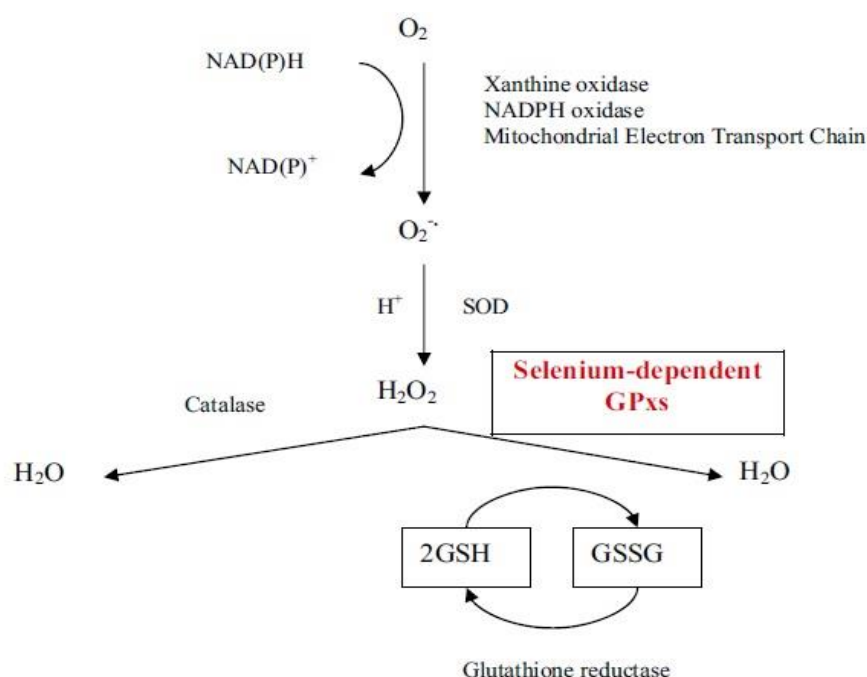
radical ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนรูปให้อยู่ในแอสคอร์เบตได้อีกโดยอาศัยโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ เช่น กลูต้าไธโอนในรูปรีดิวซ์ และกรดไดไฮโดรไลโปอิก เป็นต้น (ภาพที่ 2.5) (Inoue, 2011; ไมตรีและคณะ, 2555)



ภาพที่ 2.5 กลไกการทำงานของวิตามินซีและวิตามินอี

ที่มา: Inoue (2011)

บทบาทสำคัญของซีลีเนียมในการต้านอนุมูลอิสระ คือเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) กลไกเริ่มจากเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิสเทส ทำหน้าที่คาตาลิสต์อนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิสเทสสูญเสียหน้าที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กลายเป็นซูปเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูงกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลังจากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดโดยกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสหรือคาตาเลสภายในร่างกาย (ภาพที่ 2.6) (Mistry et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินอีและซีลีเนียมมีบทบาทในการทำงานร่วมกันในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการเสริมฤทธิ์กัน โดยวิตามินอีทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ซีลีเนียมทำหน้าที่กำจัดอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นให้หมดไป (Surai, 2000)



ภาพที่ 2.6 กลไกการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Mistry et al. (2011)

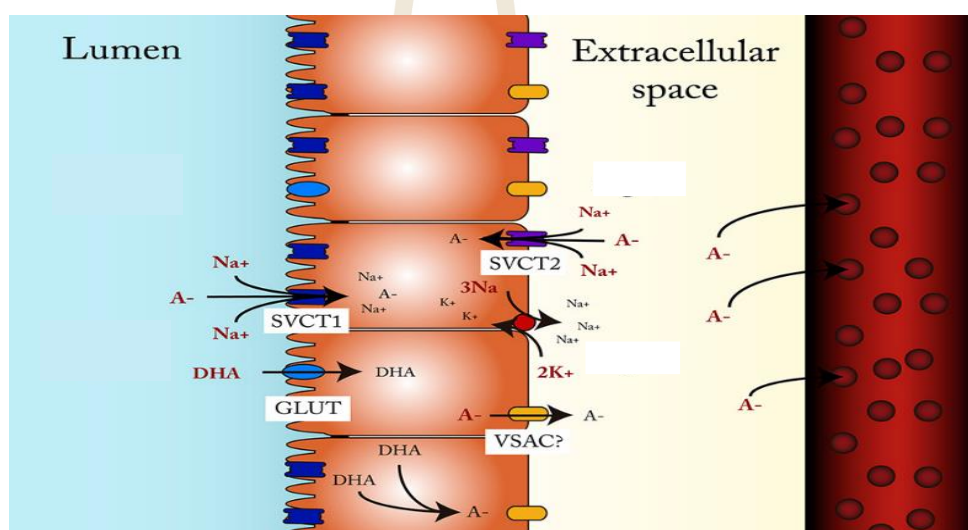
2.9 วิตามินซี (Vitamin C)

วิตามินซี (vitamin C) หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในอาหารมี 2 รูปแบบคือ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid ซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้ง 2 รูปแบบ การเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของออกซิเดชันและรีดักชันระหว่าง ascorbic acid กับ dehydroascorbic acid เป็นคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญของวิตามินซี แต่วิตามินซีไวต่อการถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยแสงและความร้อน ร่างกายมนุษย์และสัตว์สังเคราะห์วิตามินซีมาจากสารตั้งต้นคือ guanosine diphosphate mannose กระบวนการสังเคราะห์เกิดที่ตับและไต แต่สัตว์ปีกเกิดขึ้นที่ไต (Khan et al., 2012) วิตามินซีเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา hydroxylation ที่เปลี่ยนกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และ โพรลีน (proline) เพื่อสร้างคอลาเจนเป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน ฟัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและผนังเส้นเลือด ช่วยเพิ่มการดูดซึมของธาตุเหล็ก รวมถึงเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวอย่างที่เป็นน้ำ โดยสามารถทำงานร่วมกับวิตามินอีในกระบวนการคืนสภาพของวิตามินอี (Vitamin E recycle) โดยวิตามินซีจะรีดิวซ์ α -tocopheroxy ทำให้ได้ α -tocopherol กลับมาใช้อีกครั้ง

2.9.1 การย่อยและการดูดซึมวิตามินซี

วิตามินซีในอาหารจะถูกออกซิไดซ์ในระบบทางเดินอาหาร โดยมีเหล็ก (Iron, Fe^{2+}) หรือ

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไซค์ วิตามินซีสามารถผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ โดยการขนส่งผ่าน sodium-dependent vitamin C transporters (SDVC) และ glucose transporters (GLUTs) โดยวิตามินซีที่อยู่ในรูป ascorbate (A^-) จะดูดซึมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ผ่าน SDVC1 พร้อมกับกระบวนการ Na^+/K^+ ATPase ในขณะที่เซลล์ต้องการวิตามินซี ascorbate สามารถออกจากบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ติดกับหลอดเลือดผ่าน SDVC2 เข้าสู่เซลล์ได้พร้อมกระบวนการ Na^+/K^+ ATPase นอกจากนี้ในส่วนของวิตามินซีในรูป dehydroascorbic acid (DHA) สามารถดูดซึมได้ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) โดยเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กผ่านช่องทาง GLUTs ขณะที่ dehydroascorbic acid อยู่ในเซลล์ผนังลำไส้จะถูกรีดิวซ์ให้อยู่รูป ascorbate ออกนอกเซลล์เข้าสู่เส้นเลือดฝอย (Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015) แสดงดังภาพ 2.7



ภาพที่ 2.7 กระบวนการดูดของวิตามินซี

ที่มา: Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, (2015)

2.9.2 ความต้องการวิตามินซี

ความต้องการวิตามินซีในอาหารสัตว์ปีกไม่ถูกกำหนดระดับที่แน่นอนจาก NRC และมาตรฐานสายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากสัตว์ปีกสามารถสังเคราะห์ได้เอง โดยมีเอนไซม์ gulonolactone oxidase สำหรับใช้ในการสังเคราะห์ แต่ลูกไก่ในช่วงสัปดาห์แรกยังไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้สมบูรณ์ การเสริมวิตามินซีในอาหารที่ระดับ 100-300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ช่วยให้การเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันดีขึ้น (Daghir, 2008; Attia et al., 2009) รวมถึงเมื่อสัตว์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อนส่งผลให้การสังเคราะห์วิตามินซีไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงจำเป็นต้องเสริมวิตามินซีเพิ่มเติมในอาหาร (Ciftci et al., 2005) โดยในอาหารแม่ไก่ควรมีการ

เสริมวิตามินซี 200-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ดังนั้นการเสริมวิตามินซีในอาหารเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดจำเป็นต้องคำนึงปัจจัยอื่นๆ ด้วย เช่น สภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ อาหาร การจัดการ และสุขภาพสัตว์ เป็นต้น (Skrivan et al., 2013)

2.9.3 การขาดและความเป็นพิษของวิตามินซี

สัตว์ปีกสามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้ อย่างไรก็ตามสัตว์ปีกแรกเกิดมีการสังเคราะห์วิตามินซียังไม่สมบูรณ์ และหากเกิดความเครียดที่อาจเสี่ยงต่อการขาดวิตามินซีได้ ลูกไก่จะมีระดับวิตามินซีในเลือดที่ต่ำเมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด อากาศร้อนหรือเย็น การทำวัคซีน การอดอาหาร และการตัดปาก เป็นต้น การขาดวิตามินในสัตว์ปีกโตเต็มวัยที่เป็นผลจากภาวะความเครียดจากความร้อนอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต คุณภาพเปลือกไข่ อัตราการผสมติดและคุณภาพอสุจิ ความเครียดจากความร้อนเป็นหนึ่งในความเครียดที่สำคัญในส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของความเครียดความร้อนอาการตอบสนองโดยทั่วไป ได้แก่ ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น และปริมาณโปรตีน กลูโคส โซเดียม รวมทั้งโพแทสเซียมลดลง และเกี่ยวข้องกับน้ำหนักของต่อมหมวกไต เบอร์ซ่า (bursa) ม้าม และไทรอยด์ (thyroid) การเสริมวิตามินซีมีบทบาทสำคัญที่จะช่วยลดความเสี่ยงในการขาดวิตามินซีที่เกิดจากความเครียดจากความร้อน (Whitehead and Keller, 2003)

การเป็นพิษโดยทั่วไปพบว่าการบริโภควิตามินซีสูงจะมีความเป็นพิษต่ำ ซึ่งหลายการศึกษาพบว่าไม่ส่งผลกระทบในไก่และไก่งวงเมื่อได้รับวิตามินซีในปริมาณสูง โดยการเสริมวิตามินซีที่ระดับสูงถึง 3% ไม่มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว การกินได้และประสิทธิภาพการให้อาหารของลูกไก่พันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามระดับที่เป็นพิษจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในตับส่งผลให้มีการสะสมของธาตุเหล็กในตับมากเกินไป (NRC, 1994; Leeson and Summers, 2001)

2.10 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี (vitamin E) มีโครงสร้างที่แตกต่างกันถึง 8 ชนิดที่พบในธรรมชาติได้แก่ กลุ่มโทโคเฟอรอล (α -, β -, γ -, Δ - tocopheral) และกลุ่มโทโคไตรเอนอล (α -, β -, γ -, Δ - tocotrienol) ซึ่งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของ methyl group (CH-3) ที่ต่อกับวงแหวนเบนซีนหรือบริเวณที่เรียกว่า chromanol ring โดย 6-hydroxy group ของ chromanol ring จะเป็นตัวคอยจับ (active site) กับอนุมูลอิสระ ในขณะที่บริเวณ side chain ของโครงสร้างวิตามินอีไม่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ แต่โครงสร้างในส่วนไอโซเมอร์ของวิตามินอีทั้งหมดเกี่ยวข้องกับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Raederstorff et al., 2015) วิตามินอีมีบทบาทความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงกลไกการทำงานของกล้ามเนื้อ ระบบสืบพันธุ์ ระบบไหลเวียนเลือด ระบบประสาท และระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น วิตามินอีกลุ่มโทโคเฟอรอลที่อยู่

ในรูปโครงสร้าง α -tocopheral มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์สูงสุดที่สามารถสะสมอยู่ในเลือดและเนื้อเยื่อ แต่ส่วนใหญ่จะพบโครงสร้าง γ -tocopheral เป็นโครงสร้างหลักของวิตามินอี และในส่วนของโทโคไตรอีนอล ถึงแม้ว่าข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพียงเล็กน้อย แต่เชื่อกันว่าโทโคไตรอีนอลมีบทบาทในการป้องกันระบบประสาทต่อต้านมะเร็ง และลดคอเลสเตอรอล (Gagne et al., 2009) วิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน (fat soluble vitamin) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพมากในการยับยั้งปฏิกิริยาถูกโซ่ (chain breaking) ช่วยปกป้องเซลล์และเนื้อเยื่อถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

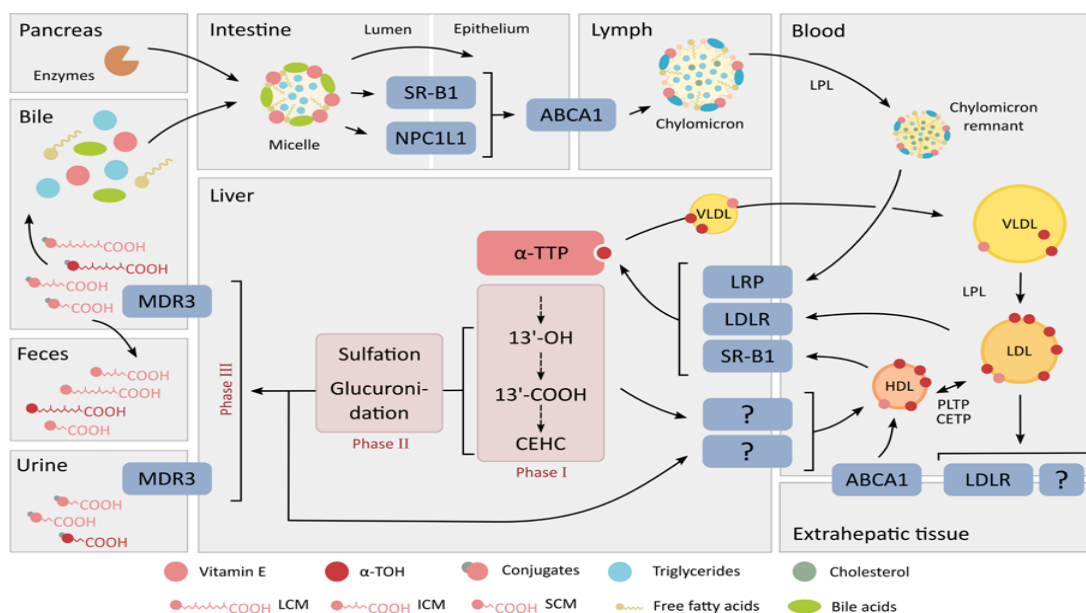
2.10.1 การย่อยและการดูดซึมวิตามินอี

วิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันจึงละลายตัวเข้ากับไขมันที่มีอยู่ในอาหาร โดยวิตามินอีจะถูกน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนหรือเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ย่อยไขมันให้โมเลกุลเล็กลงอยู่ในรูปไมเซลล์ (micelle) หลังจากนั้นการดูดซึมวิตามินอีจะเกิดขึ้นบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งไมเซลล์ดูดซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์เยื่อบุลำไส้โดยการลำเลียงสารแบบไม่ใช้พลังงาน passive diffusion และแบบเยื่อเลือกผ่าน (scavenger receptor class B type 1SR-B1; Niemann-Pick C1-like protein 1, NPC1L1) เพื่อส่งต่อไปยังระบบน้ำเหลืองโดยผ่านตัวขนส่ง ATP-binding cassette transporters 1 (ABCA1) หรือในสัตว์ปีกจะเข้าสู่ portal system วิตามินอีที่อยู่ในรูป chylomicron ภายในระบบน้ำเหลืองจะถูกส่งผ่านไปยังระบบไหลเวียนเลือด จากนั้นไลโปโปรตีน (lipoprotein) ในกระแสเลือดจะทำหน้าที่ขนส่งวิตามินอีที่อยู่ในรูป chylomicron ไปสะสมยังตับ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะไลโปโปรตีนจำพวก low density lipoproteins (LDL), very low density lipoproteins (VLDL) และ high density lipoproteins (HDL) เมื่อ chylomicron เกิดการสลายของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ลิเพส วิตามินอีก็จะเกาะกับอนุภาคของไลโปโปรตีนชนิด LDL อยู่ในรูป chylomicron remnant ผ่านตัวรับ LDL receptor (LDLR)-related proteins เข้าสู่ตับ ในตับวิตามินอีในรูป α -tocopherol มีการขนส่งที่เกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีน α -tocopherol transfer protein (α -TTP) โดยไลโปโปรตีนชนิด VLDL มีความสามารถสูงในการขนส่งวิตามินอีในตับเข้าออกสู่รับไหลเวียนเลือด (Schmolz et al., 2016) แสดงดังภาพที่ 2.8

2.10.2 ความต้องการวิตามินอี

วิตามินอีเป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อสัตว์ เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์เองได้จึงต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จึงมีการใช้วิตามินอีในรูป esterified เช่น tocopheryl acetate ซึ่งมีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บรักษาและยังไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจนกว่าจะถูกร่างกายย่อยและดูดซึมจนเปลี่ยนเป็นรูป α -tocopherol อีกครั้งจึงจะสามารถออกฤทธิ์ได้ (Panda and Cherian, 2014; Rengaraj and Hong, 2015) NRC (1994) ระบุว่าไก่ที่อายุ 5 และมากกว่า 6 สัปดาห์ควรเสริมวิตามินอีที่ระดับ 10 และ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ

ในส่วนของแม่ไก่อยู่ที่ระดับ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนไก่พ่อแม่พันธุ์ Cobb และ Ross อยู่ที่ระดับ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อนควรมีปรับระดับความต้องการวิตามินอีอยู่ที่ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Surai et al., 2016)



ภาพที่ 2.8 กระบวนการดูดซึมของวิตามินอี

หมายเหตุ: SR-B1, Scavenger receptor class B type 1; LPL, Lipoprotein lipase; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like 1, VLDL: Very low density lipoproteins; HDL, High density lipoproteins; α -TOH, α -tocopherols; α -TTP, α -TOH transfer protein; LDL, Low density lipoproteins; LRP, LDL receptor-related proteins; LDLR, LDL receptor; 13'-OH, 13'-hydroxy chromanol; 13'-COOH, 13'-carboxy chromanol; CEHC, Carboxyethyl hydroxyl chromanols; HDL, High density lipoproteins; MDR3, multidrug resistance protein 3

ที่มา: Schmolz et al. (2016)

2.10.3 การขาดและความเป็นพิษของวิตามินอี

การขาดวิตามินอีในสัตว์วัยอ่อนจะมีผลกระทบรุนแรงมากกว่าสัตว์ระยะโตเต็มวัย ในลูกไก่ที่ขาดวิตามินอีจะแสดงอาการทางประสาท (encephalomalacia) ตัวบวม (exudative diathesis) กล้ามเนื้อตายเป็นอัมพาต (muscular dystrophy) โดยจะพบอาการทางประสาทมากกว่าอาการอื่น ขณะที่แม่ไก่ระยะโตเต็มวัยเลี้ยงด้วยวิตามินอีระดับต่ำเป็นเวลานานไม่พบการแสดงออกของอาการ

ทางคลินิก แต่ส่งผลให้ผลผลิตไข่และการฟักออกลดลง นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมสภาพของอณฑะในไก่เพศผู้ที่ขาดวิตามินติดต่อกัน 6-8 สัปดาห์

วิตามินอีเป็นหนึ่งในวิตามินที่พบอาการเป็นพิษน้อยที่สุดโดยไม่มีอาการที่เฉพาะเจาะจงและส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับอาการบวมพร่องในการดูดซึมวิตามินเอ และดี หรือไขมัน ปริมาณวิตามินอีที่ปลอดภัยสำหรับสัตว์สามารถใช้ได้สูงกว่าความต้องการทางสรีรวิทยา 100 เท่า (Aljamal, 2011)

2.11 ซีลีเนียม (Selenium)

ซีลีเนียมเป็นแร่ธาตุสำคัญที่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมือนกับกำมะถัน ในธรรมชาติพบซีลีเนียมได้ทั้ง 2 รูปแบบ คือ ซีลีเนียมอินทรีย์ ได้แก่ ซีลีเนียมยีสต์ (selenium yeast) ซีลีโนเมทไธโอนีน (selenium methionine) และซีลีเนียมซิสทีอีน (selenium cysteine) และอนินทรีย์ ได้แก่ ซีลีไนท์ (selenite) และซีลีเนท (selenate) ซีลีเนียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) เป็นเอนไซม์ชนิดซีลีโนโปรตีน (selenoprotein) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการสลายเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย (Ebeid, 2009) นอกจากนี้ซีลีเนียมยังมีความสำคัญโดยตรงต่อการควบคุมการทำงานของระบบสรีรวิทยาต่างๆ เช่น ระบบสืบพันธุ์ สมรรถนะการผลิต ควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ในการแสดงออกของยีน กระบวนการเมแทบอลิซึมของต่อมไทรอยด์ และเสริมสร้างความสมบูรณ์ของอสุจิในทั้งมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ซีลีเนียมยังมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Edens and Sefton, 2009; Ahangari et al., 2013; Ahsan et al., 2014) เมื่อสัตว์ขาดซีลีเนียมจะทำให้ผลผลิตและประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลดลง การเลี้ยงสัตว์ในระบบเข้มข้น (intensive system) มักก่อให้เกิดความเครียด การเสริมซีลีเนียมในอาหารจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเสริมสร้างการทำงานของระบบสืบพันธุ์และการต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อ อัตราการผสมติด การพัฒนาของตัวอ่อนและไข่ฟักเพิ่มขึ้น (Suria and Fisinin, 2014)

2.11.1 การย่อยและดูดซึมซีลีเนียม

ประสิทธิภาพการดูดซึมซีลีเนียมในลำไส้เล็กในสัตว์กระเพาะเดี่ยวสูงกว่าในสัตว์กระเพาะรวม โดย selenite ดูดซึมได้ 79 และ 80% ในสัตว์ปีกและสุกร ขณะที่เกาะดูดซึมได้เพียง 29% เท่านั้นสำหรับ selenomethionine และ selenate การดูดซึมมีมากกว่า 90% ในสัตว์ปีก เมื่อร่างกายได้รับซีลีเนท (selenate, Na_2SeO_4) หรือ ซีลีไนท์ (selenite, Na_2SeO_3) จากอาหารถูกเปลี่ยนไปเป็นซีลีไนท์ (Selenite, Na_2SeO_3) แล้วถูกรีดิวซ์ด้วย glutathione (GSH) ให้อยู่ในรูป seleno-diglutathione (GS-Se-SG) และถูกรีดิวซ์อีกครั้งเป็นไฮโดรเจนซีลีไนด์ (hydrogen selenide, HSe^-) โดยเอนไซม์ glutathione reductase ซึ่งจะเปลี่ยนรูปไปเป็นซีลีโนฟอสเฟต (selenophosphat)

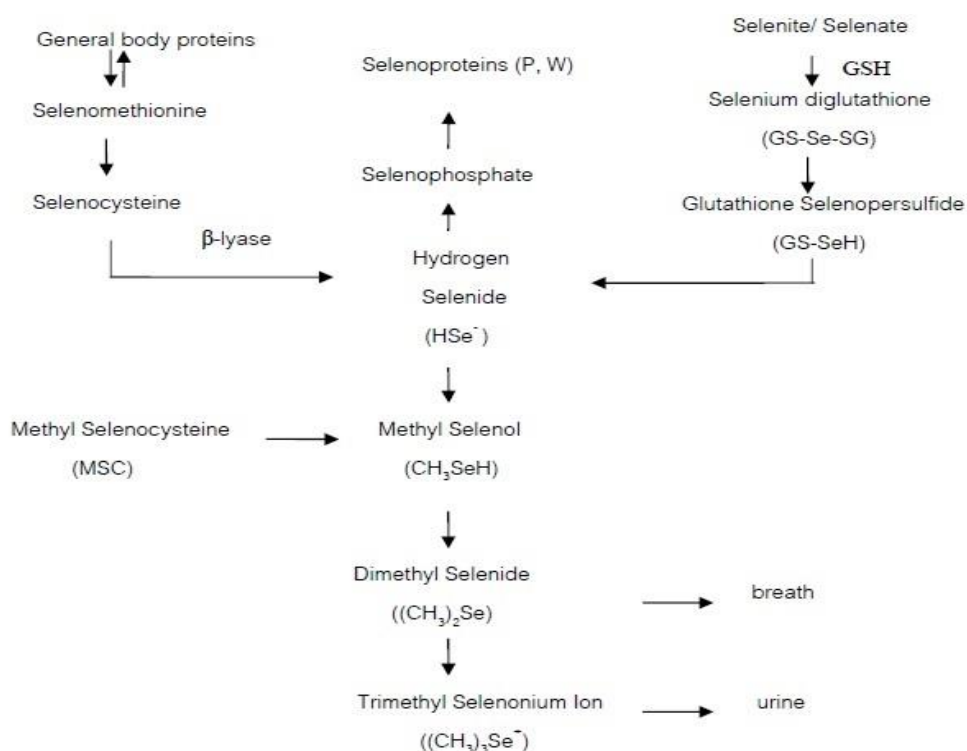
จนกระทั่งกลายเป็นซีลีโนโปรตีน (selenoprotein) ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนพี (selenoprotein P) ซีลีโนโปรตีนดับเบิลยู (selenoprotein W) เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์ต่างๆ (ตารางที่ 2.4)

ในขณะที่ร่างกายได้รับซีลีเนียมอินทรีย์เกิดการรวมตัวกันกับกรดอะมิโนอยู่ในรูปซีลีโนเมทไธโอนีน (selenomethionine) มีกระบวนการเปลี่ยนไปเป็นโปรตีนได้เร็วขึ้น โดยจะเปลี่ยนเป็น Se-adenosyl methionine (SeAM) ให้อยู่ใน Se-adenosyle homocystein (SeAH) แล้วเปลี่ยนไปเป็นซีลีโนซิสทีน (selenocysteine) โดยผ่านกระบวนการ transe-sulfuration โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ cystathionine β -synthase และ cystathionine γ -lyase จนเปลี่ยนเป็นรูปไฮโดรเจนซีลีไนด์ หรือซีลีไนด์ หรือซีลีเนียมเช่นเดียวกัน ไฮโดรเจนซีลีไนด์ถือว่าเป็นสารตั้งต้นหลักในกระบวนการเมแทบอลิซึมของซีลีเนียม ถ้าหากมีปริมาณซีลีไนด์มากเกินไปไม่ใช้ในการสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนจะถูกเปลี่ยนเป็นซีลีโนซูการ์ (selenosugars) ขับออกทางปัสสาวะ นอกจากนี้เมื่อไฮโดรเจนซีลีไนด์ถูกเติมหมู่ methyl group จาก methyltransferases จะเปลี่ยนเป็นเมทิลซีลีโนล (methylselenol) ไดเมทิลซีลีไนด์ (dimethyl selenide) และไตรเมทิลซีลีโนเนียม (trimethyl selenonium) ซึ่งซีลีเนียมจะถูกขับออกจากทางหายใจและอุจจาระในรูปไดเมทิลซีลีไนด์ และขับออกทางปัสสาวะในรูปไตรเมทิลซีลีโนเนียม แสดงดังภาพที่ 2.9 แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์ของซีลีเนียมอินทรีย์ดีกว่าซีลีเนียมอนินทรีย์ เนื่องจากร่างกายสามารถดูดซึมกลับซีลีเนียมอินทรีย์ที่อยู่ในรูปซีลีโนเมทไธโอนีนเข้ามาสะสมไว้ที่ตับเพื่อเข้าสู่กลไกอื่นๆ ต่อไป แต่ถ้าหากเป็นซีลีเนียมอนินทรีย์เมื่อถึงขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการเมแทบอลิซึมส่วนใหญ่จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ (จุไลวรรณ, 2551; Mistry et al., 2011)

ตารางที่ 2.4 บทบาทของซีลีโนโปรตีน

| Selenoprotein | Proposed function |
|--|--|
| Glutathione peroxidase (GPx) | |
| GPx1 | Antioxidant in cell cytosol; Se store |
| GPx2 | Antioxidant in gastrointestinal tract |
| GPx3 | Antioxidant in extracellular space and plasma |
| GPx4 | Antioxidant in membranes; structural protein in sperm; apoptosis |
| GPx5 | Unknown |
| GPx6 | GPx1 homolog |
| Thioredoxin reductase (TR) | |
| | Multiple roles including dithiol-disulphide oxoreductase. Detoxifies peroxides, reduces thioredoxin (control of cell growth); maintains redox state of transcription factors |
| TR1 | Mainly cytosolic, ubiquitous |
| TR2 | Expressed by testes |
| TR3 | Mitochondrial, ubiquitous |
| Iodothyronine deiodinases | |
| Types D1 and D2 | Converts thyroxine (T4) to bioactive 3,5,3'-tri-iodothyronine(T3) |
| Types D1 and D3 | Converts T4 to bioinactive 3', 3', 5' reverse T3 |
| Selenoprotein P | Se transport protein; antioxidant in endothelium |
| Selenoprotein W | Antioxidant in cardiac and skeletal muscle |
| Selenophosphate synthetase (SPS2) | Synthesis of selenophosphate for selenoprotein synthesis |
| 15 kDa selenoprotein (Sep 15) | Protects against cancer |
| Selenoproteins H, I, K, M, N,O, R, S, T, V | Role largely unknown |

ที่มา : Mistry et al. (2011)



ภาพที่ 2.9 กระบวนการดูดซึมซีลีเนียม (จุฬาลงกรณ์, 2551)

2.11.2 ความต้องการซีลีเนียม

ไก่ไข่ต้องการซีลีเนียมที่ระดับ 0.03-0.08 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ขึ้นอยู่กับปริมาณการกินได้ต่อวันและไก่เนื้ออยู่ที่ระดับ 0.15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (NRC, 1994) ขณะที่ AAFCO (2003) ได้กำหนดระดับสูงสุดในการเสริมซีลีเนียมอยู่ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยส่วนใหญ่ความต้องการซีลีเนียมของในอาหารไก่พ่อแม่พันธุ์อยู่ได้มีการระบุไว้ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Dekalb Inc, 2015; Aviagen Inc, 2016) ในอาหารสัตว์ปีกได้มีการเสริมซีลีเนียมอินทรีย์ที่อยู่ในรูปโซเดียมซีลีเนต (Na_2SeO_3) อย่างไรก็ตามซีลีเนียมอินทรีย์ ได้แก่ selenocysteine, selenomethionine หรือ selenium yeast มาใช้เสริมในอาหารสัตว์มากขึ้น เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการดูดซึมและการนำไปใช้ประโยชน์ได้สูงกว่าซีลีเนียมอนินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถสะสมในเนื้อและไข่แดงได้ดี ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อน ถึงแม้ว่าซีลีเนียมจัดเป็นแร่ธาตุรองและมีความต้องการในปริมาณน้อย แต่ซีลีเนียมมีความจำเป็นต่อบำรุงรักษาสุขภาพ สมรรถนะการผลิต ระบบสืบพันธุ์ และหน้าที่ต่อระบบสรีรวิทยาต่างๆ

2.11.3 การขาดและความเป็นพิษของซีลีเนียม

การขาดซีลีเนียมในสัตว์ปีกโดยเฉพาะเมื่อมีการขาดร่วมกับวิตามินอีก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น exudative diathesis, nutritional encephalomalacia และ nutritional pancreatic atrophy

โดยเฉพาะโรค exudative diathesis พบมากในลูกไก่ที่เกิดจากแม่ไก่ขาดซีลีเนียม เป็นสาเหตุทำให้ลูกไก่มีการดูดซึมผ่านเส้นเลือดฝอยที่ผิดปกติ อีกทั้งการขาดซีลีเนียมยังส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง การตายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น ผลผลิตไข่ อัตราการผสมติดและฟักออกลดลง โดยการลดลงของอัตราการผสมติดและการฟักออกเกิดขึ้นเมื่อได้รับซีลีเนียมในระดับต่ำ ซึ่งไข่ฟักจากแม่ไก่ที่ได้รับซีลีเนียมในระดับต่ำมากจะพบไข่ไม่มีเชื้อ (infertile) ถึง 12.6% มีอัตราการตายของตัวอ่อน 29% และการฟักออกต่ำ

ระดับความเป็นพิษของซีลีเนียมอยู่ที่ 10-20 ppm โดยสูงกว่าระดับความต้องการ 100 เท่า ซีลีเนียมที่ระดับต่ำ 3-5 ppm ในอาหารไม่ก่อให้เกิดพิษต่อสัตว์ แต่การได้รับซีลีเนียมมากเกินไปก่อให้เกิดพิษ (selenosis) ได้ โดยพบอาการผมและเล็บร่วง ท้องเสีย เล็บเปราะบาง อ่อนเพลีย หงุดหงิด และมีอาการทางระบบประสาททั้งในมนุษย์และสัตว์ ในสัตว์ปีกที่ได้รับซีลีเนียมระดับที่สูงเกินไปทำให้อัตราการเจริญเติบโต การผสมและฟักออกลดลง เมื่อเสริมซีลีเนียม 7 ppm ในอาหารแม่ไก่มีการลดลงของการฟักออก และการใช้ซีลีเนียมอนินทรีย์ (sodium selenite) ที่ 5-9 ppm ส่งผลเสียต่อน้ำหนักไข่ และผลผลิตไข่ (Aljamal, 2011)

2.12 การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกเพศเมียต่อสมรรถนะการผลิต

2.12.1 ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่

ผลของน้ำหนักไข่ และผลผลิตไข่ในแม่ไก่ที่ได้รับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมที่มีการเสริมในอาหารทั้งแบบชนิดเดียว หรือเสริมร่วมกันแสดงในตารางที่ 2.5 โดยพบว่าการเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิตามินอี 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอี 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้น้ำหนักไข่มากกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และการเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอี 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิตามินซีหรือวิตามินอีเพียงชนิดเดียว และกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (Cifitci et al., 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hassan et al. (2013) พบว่าการใช้วิตามินซี 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ช่วยเพิ่มน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่ได้สูงสุด ($p < 0.05$) อีกทั้งในการศึกษาของ Attia et al. (2016) และ Attia et al. (2011) พบว่าการใช้วิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และวิตามินอี 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพียงชนิดเดียว หรือเสริมร่วมกันภายใต้สภาพอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 34°C สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตไข่ได้ ($p < 0.05$) ยกเว้นน้ำหนักไข่ แต่การใช้วิตามินซี และวิตามินอีในอาหารภายใต้สภาพอากาศปกติที่อุณหภูมิ 22-24°C ไม่มีผลต่อน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังมีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่เพียงอย่างเดียวหรือร่วมกัน โดยพบว่าผลของการเสริมซีลีเนียมอินทรีย์ 0.20

มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินซี 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถเพิ่มน้ำหนักไข่ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่มีการเสริมซีลีเนียมและวิตามินซีเพียงอย่างเดียว ($p > 0.05$) แต่แม่ไก่ที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมซีลีเนียมอินทรีย์ร่วมกับวิตามินซีมีผลผลิตไข่ที่สูงขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับซีลีเนียมและวิตามินซีเพียงอย่างเดียว รวมไปถึงกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (Attia et al., 2015) ซึ่งให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ziaei et al. (2013) พบว่าการเสริมวิตามินอี 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพียงอย่างเดียว หรือการเสริมวิตามินอี 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับซีลีโนเมทไอนีน 0.5-0.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่งผลต่อน้ำหนักไข่ และผลผลิตไข่ที่เพิ่มขึ้นดีกว่าการเสริมเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกันของวิตามินอี 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และซีลีโนเมทไอนีน 0.5-0.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารแม่ไก่

ตารางที่ 2.5 ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียมต่อน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่

| Treatments | Egg weight (g) | Egg production (%) | References |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| control | 58.70 ^b | 82.25 ^d | |
| 200 mg Vit. C/kg | 59.60 ^a | 84.25 ^c | Cifitci et al., (2005) |
| 125 mg Vit. E/kg | 59.80 ^a | 85.92 ^b | |
| 125 mg Vit. E/kg + 200 mg vit. C /kg | 59.00 ^a | 88.29 ^a | |
| control (positive) | 48.50 ^a | 70.00 ^a | |
| control (negative) | 45.50 ^c | 57.50 ^c | |
| 200 mg Vit. C/kg | 47.80 ^{abc} | 66.40 ^b | |
| 150 mg Vit. E/kg | 46.20 ^{bc} | 61.80 ^c | |
| 150 mg Vit. E/kg + 200 mg vitC /kg | 47.10 ^{abc} | 66.30 ^b | |
| control | 47.83 ^b | 54.33 ^b | Hassan et al. (2013) |
| 250 mg Vit. C/kg | 48.60 ^{ab} | 57.00 ^{ab} | |
| 150 mg Vit. E/kg | 49.00 ^{ab} | 58.00 ^{ab} | |
| 150 mg Vit. E/kg + 250 mg Vit. C/kg | 49.50 ^a | 61.00 ^a | |
| control (positive) | 50.50 | 68.00 ^a | Attia et al. (2016) |
| control (negative) | 49.40 | 60.50 ^c | |
| 200 mg Vit. C/kg | 50.50 | 65.80 ^b | |
| 150 mg Vit. E/kg | 49.40 | 63.60 ^d | |
| 150 mg Vit. E/kg + 200 mg Vit. C/kg | 49.80 | 64.80 ^c | |

ตารางที่ 2.5 ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียมต่อน้ำหนักไข่และผลผลิตไข่ (ต่อ)

| Treatments | Egg weight (g) | Egg production (%) | References |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| Control | 59.50 ^b | 76.70 ^c | Ziaei et al. (2013) |
| 0.5 mg SM/kg | 60.10 ^b | 76.30 ^c | |
| 0.75 mg SM/kg | 60.80 ^b | 77.40 ^c | |
| 125 mg Vit. E/kg | 60.40 ^b | 80.00 ^b | |
| 0.5 mg SM/kg + 125 mg Vit. E/kg | 61.80 ^b | 82.20 ^b | |
| 0.75 mg SM/kg + 125 mg Vit. E/kg | 62.90 ^{ab} | 85.60 ^{ab} | |
| 250 mg Vit. E/kg | 63.90 ^{ab} | 87.00 ^a | |
| 0.5 mg SM/kg + 250 mg Vit. E/kg | 65.30 ^a | 88.30 ^a | |
| 0.75 mg SM/kg + 250 mg Vit. E/kg | 65.05 ^a | 89.60 ^a | |
| Control | 43.50 ^b | 55.80 ^c | Attia et al. (2015) |
| 250 mg Vit. C/mg | 43.80 ^{ab} | 58.03 ^b | |
| 0.2 mg Se/kg | 43.50 ^b | 57.58 ^b | |
| 0.2 mg Se/kg + 250 mg Vit. C/kg | 45.20 ^a | 59.37 ^a | |

หมายเหตุ: ^{a,b,c,d,e} Means within a columns with different letter different significantly (P<0.05)

Vit. E = vitamin E; Vit. C = vitamin C; SM = selenomethionine; SE = selenium

2.12.2 ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกเพศเมียต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก

การเสริมซีลีเนียมยีสต์ในอาหารแม่ไก่สามารถเพิ่มอัตราการผสมติด และการฟักออกได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยพบว่าการเสริมซีลีเนียมยีสต์ที่ระดับตั้งแต่ 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด และการฟักออก ($p > 0.05$) (Hanafy et al., 2009) ส่วน Attia et al. (2010) พบว่าปัจจัยร่วมระหว่างแหล่งและระดับซีลีเนียมที่ใช้ในอาหารแม่ไก่ มีผลต่ออัตราการผสมติด และการฟักออก ($p < 0.05$) โดยการใช้ Na_2SeO_3 0.40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีอัตราการผสมติดที่ดีกว่า Na_2SeO_3 0.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้ซีลีเนียมยีสต์ตั้งแต่ระดับ 0.10-0.40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และการใช้ซีลีเนียมยีสต์และ Na_2SeO_3 ที่ระดับ 0.25 และ 0.40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการฟักออกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) โดยการใช้ Na_2SeO_3 0.40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้ผลที่ดีที่สุด แต่การศึกษาของ Yuan et al. (2011) พบว่าความแตกต่างของแหล่ง (sodium selenite, selenium yeast-Sel-Plex™, selenomethionine)

และระดับ (0.15 และ 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) รวมถึงปัจจัยร่วมระหว่างแหล่งกับระดับของซีลีเนียมที่เสริมลงในอาหารแม่ไก่ไม่ส่งผลต่ออัตราการผสม และการฟักออก ($p>0.05$) ยกเว้นระดับของซีลีเนียมที่แตกต่างกันมีผลต่อการฟักออก ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ซีลีเนียมทั้งในรูปแบบอินทรีย์และอนินทรีย์ในอาหารสัตว์ปีก แต่อย่างไรก็ตามซีลีเนียมอินทรีย์มีการขับออกสู่สิ่งแวดล้อมทางมูลน้อยที่สุดและมีประสิทธิภาพที่จะสามารถเก็บสะสมไว้ตามเนื้อเยื่อและไข่แดง

การเสริมวิตามินซี และวิตามินอีในอาหารสัตว์ปีกเพื่ออัตราการผสมติดและการฟักออกจากผลการทดลองของ Nowaczewski and Komtecka (2005) ได้มีการรายงานว่าแม่พันธุ์ไก่ฟ้า (aviary pheasants) ที่ได้รับการเสริมวิตามินซี 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารสามารถเพิ่มอัตราการผสมและการฟักออกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ในส่วนผลของวิตามินอีต่ออัตราการผสมติดและการฟักออกพบว่าการเสริมระดับวิตามินอีเพียงอย่าง (100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียว (150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) หรือร่วมกับวิตามินซี (200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) สามารถเพิ่มอัตราการผสมติดและการฟักออกได้เทียบเท่ากัน ($p>0.05$) แต่มีค่าอัตราการผสมติดและการฟักออกที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) อีกทั้งสภาพแวดล้อมในการเสริมการใช้วิตามินซีและวิตามินอีในช่วงสภาพอากาศร้อนจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยไม่พบความแตกต่างในการเสริมเมื่อสภาพอากาศปกติ (Nadia et al., 2008; Attia et al., 2011) นอกจากนี้การทดลองของ Ipek and Dikmen (2014) พบว่าแม่ไก่ที่ได้รับการเสริมวิตามินอีที่ระดับสูงสุด 240 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินซีที่ระดับ 240 และ 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดและการฟักออกได้สูงกว่าการเสริมวิตามินอีร่วมกับวิตามินซีที่ระดับต่ำกว่า ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามยังมีบางการศึกษาที่พบว่าการระดับหรือรูปแบบการเสริมของวิตามินซีและวิตามินอีไม่ส่งผลต่อการฟักออก (Biswas et al., 2010; Attia et al., 2011) แสดงไว้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก

| Treatments | Type of poultry | Fertility (%) | Hatchability (%) | References |
|---|------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|
| Se level × Se source | | | | |
| Control (0.10 mg/kg Se) | | 93.02 ^{ab} | 72.02 ^c | |
| 0.25 mg/kg Na ₂ SeO ₃ | | 90.66 ^b | 89.44 ^{ab} | |
| 0.40 mg/kg Na ₂ SeO ₃ | Breeder hens | 97.44 ^a | 92.74 ^a | Attia et al. (2010) |
| 0.25 mg/kg SY | | 94.96 ^{ab} | 88.80 ^b | |
| 0.40 mg/kg SY | | 92.69 ^{ab} | 85.14 ^b | |
| <i>P-value</i> | | 0.007 | 0.02 | |
| 0.15 mg/kg Na ₂ SeO ₃ | | 88.77 | 88.41 ^{ab} | |
| 0.30 mg/kg Na ₂ SeO ₃ | | 87.61 | 85.15 ^b | |
| 0.15 mg/kg SY | | 89.52 | 87.72 ^{ab} | |
| 0.30 mg/kg SY | Broiler breeder | 90.45 | 86.80 ^{ab} | Yuan et al. (2011) |
| 0.15 mg/kg SM | | 91.69 | 89.69 ^a | |
| 0.30 mg/kg SM | | 87.27 | 85.03 ^b | |
| Se source | | NS | NS | |
| Se level | | NS | * | |
| Se level x source | | NS | NS | |
| Control | | 86.20 ^b | 88.90 ^b | |
| 0.10 mg/kg SY | Laying hens | 91.40 ^a | 93.15 ^a | Hanafy et al. (2009) |
| 0.20 mg/kg SY | | 92.65 ^a | 94.65 ^a | |
| 0.30 mg/kg SY | | 94.40 ^a | 94.90 ^a | |
| control | aviary pheasants | 78.10 ^b | 73.20 ^b | Nowaczewski and Komtecka (2005) |
| 100 mg Vit. C/kg | | 88.40 ^a | 81.80 ^a | |
| 200 mg Vit. C/kg | | 89.40 ^a | 82.40 ^a | |

ตารางที่ 2.6 ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก (ต่อ)

| Treatments | Type of poultry | Fertility (%) | Hatchability (%) | References |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| control | | 74.00 ^c | 61.11 ^c | |
| 100 mg Vit. E/kg | Laying Hens | 85.44 ^a | 77.33 ^b | Nadia et al. (2008) |
| 200 mg Vit. E/kg | | 86.89 ^a | 79.33 ^{ab} | |
| control | Indian native | 83.14 ^a | 80.24 | |
| 150 mg Vit. E/kg | kadaknath | 91.27 ^b | 86.15 | Biswas et al. (2010) |
| 300 mg Vit. E/kg | hen | 86.39 ^a | 82.27 | |
| control (positive) | | 96.60 ^a | 83.40 | |
| control (negative) | | 80.20 ^b | 89.10 | |
| 200 mg Vit. C/kg | Laying hen | 95.20 ^a | 81.10 | Attia et al. (2011) |
| 150 mg Vit. E/kg | | 96.90 ^a | 83.00 | |
| 150 mg Vit. E/kg + 200 mg vit C /kg | | 95.90 ^a | 82.50 | |
| 60 mg Vit. E/kg + 60 mg vit. C /kg | | 82.70 ^d | 71.00 ^d | |
| 60 mg Vit. E/kg + 120 mg vit. C /kg | | 87.30 ^c | 76.20 ^c | |
| 60 mg Vit. E/kg + 240 mg vit. C /kg | | 90.40 ^b | 80.50 ^b | |
| 120 mg Vit. E/kg + 60 mg vit. C /kg | Japanese | 88.30 ^c | 76.80 ^c | Ipek and |
| 120 mg Vit. E/kg + 120 mg vit. C /kg | quails | 90.70 ^b | 81.20 ^b | Dikmen |
| 120 mg Vit. E/kg + 240 mg vit. C /kg | female | 90.10 ^b | 81.20 ^b | (2014) |
| 240 mg Vit. E/kg + 60 mg vit. C /kg | | 90.40 ^b | 81.10 ^b | |
| 240 mg Vit. E/kg + 120 mg vit. C /kg | | 92.00 ^a | 84.60 ^a | |
| 240 mg Vit. E/kg + 240 mg vit. C /kg | | 92.60 ^a | 85.50 ^a | |

หมายเหตุ: ^{a,b,c} Means within a columns with different letter different significantly (p<0.05)

Na₂SeO₃ = sodium selenite; SeY = Selenium yeast-Sel-Plex™; SM =

Selenomethionine; Vit. E = vitamin E; Vit. C = vitamin C

2.12.3 ผลการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีบทบาทสำคัญในสัตว์ปีกโดยรักษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย รวมถึงระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกในการทำหน้าที่ป้องกันอนุมูลอิสระให้กับอสุจิและเนื้อเยื่อของตัวอ่อน ซึ่งภาพรวมผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ปีกได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.7 พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณท่อนำไข่ในส่วนของช่องคลอด รอยต่อระหว่างช่องคลอดกับต่อมสร้างเปลือกไข่ และต่อมสร้างเปลือกไข่มีการสะสมวิตามินอีและกิจกรรมของกลูต้าไธโอนเพิ่มขึ้นในแม่ไก่ที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอี 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รวมไปถึงการเสริมวิตามินอี 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารมีผลต่อปริมาณวิตามินอี วิตามินซี และกิจกรรมของกลูต้าไธโอน เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในเนื้อเยื่อท่อนำไข่แต่ละบริเวณที่แตกต่างกันตามช่วยอายุ (Breque et al., 2006) ในขณะที่การทดลอง Jena et al. (2013) และ Cinar et al. (2014) ได้เสริมวิตามินอีร่วมกับวิตามินในอาหารไก่ พบว่าสามารถลดค่า MDA (malondialdehyde) หรือลดปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน และยังส่งต่อการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส แคตาเลส และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) เช่นเดียวกับการเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมที่สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน และเพิ่มกิจกรรมการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ โดยพบว่าซีลีเนียมมีบทบาทต่อเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Ghazi et al., 2012) สอดคล้องกับการเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมในอาหารไก่ฟอพันธุ์ที่สามารถเพิ่มป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันและเสริมสร้างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสในน้ำหล่อเลี้ยงอสุจิ (Ebeid, 2012)

นอกจากยังพบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ภายในเนื้อเยื่อท่อนำไข่ของแม่ไก่ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งวัตถุดิบแดงโม่งแห้งในอาหาร โดยภายในเนื้อเยื่อท่อนำไข่ทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ ช่องคลอด ต่อมสร้างเปลือกไข่และส่วนที่สร้างไข่ขาวหรือแมกนัม (magnum) มีการแสดงออกของโปรตีนกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และคาตาเลสสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Carillon et al., 2016) ดังนั้นการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารอาจจะเพิ่มแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างไข่ได้เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2.7 ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

| Treatments | Sample | Result of antioxidant activities | References |
|---|---------------------------------------|---|----------------------|
| Dietary vitamin E supplementation | Oviduct tissues (vagina, UVJ, uterus) | The 300 mg Vitamin E/kg supplementation can increase concentrations of a-tocopherol observed in all tissues and GSH in the UVJ. In addition to the dietary supplementation with vitamin E (30 mg/kg) had effect on a-tocopherol, ascorbic acid, GSH, GPx and SOD activity. | Breque et al. (2006) |
| Vitamin E and organic selenium | Seminal plasma | The dietary vitamin E in combination with organic Se has a synergistic effect in minimizing lipid peroxidation and improving the GPX activity and total antioxidant activity in seminal plasma | Ebeid (2012) |
| Supplementation of vitamin E and selenium | Skeletal muscle | The heat stress chicks that received the combined supplementary level of vitamin E and Se had the lowest concentration of MDA and the highest activity of SOD and GPx in the skeletal muscle. Dietary Se also caused a significant increase in enzyme activity of GPx in the skeletal muscle. | Ghazi et al. (2012) |
| Supplementation of vitamin E and C | Plasma | The supplementation of vitamins E or C alone or in combinations showed significantly lowered MDA level, higher activities of SOD, CAT enzymes and higher FRAP activities in erythrocytes than control. However, supplementation with combination of vitamins proved to be better than individual supplementation. | Jena et al. (2013) |

ตารางที่ 2.7 ผลของวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ต่อ)

| Treatments | Sample | Result of antioxidant activities | References |
|------------------------------------|--------|---|---------------------|
| Supplementation of vitamin E and C | Plasma | Supplemental vitamin C and vitamin E alone or in combination significantly increased total blood GPx activity, but did not affect the erythrocyte SOD and CAT activities, MDA concentration when compared to control group. | Cinar et al. (2014) |

หมายเหตุ: UVJ = utero-vaginal junction; MDA = malondialdehyde; GPx = glutathione peroxidase; SOD = superoxide dismutase; CAT = catalase; FRAP = ferric reducing antioxidant power; GSH = glutathione

2.12.4 ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน

ภายใต้สภาพอากาศร้อนการใช้วิตามินซี (200 mg/kg ascorbic acid) และวิตามินอี (150 mg/kg α -Tocopherol acetate) ในอาหารแม่ไก่ที่เสริมร่วมกันหรือเพียงชนิดเดียวสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (large follicle weight) ท่อนำไข่ (oviduct weight) รังไข่ (ovary weight) และตับ (liver weight) รวมไปถึงความยาวท่อนำไข่ได้ ($p < 0.05$) แต่ไม่ส่งต่อน้ำหนักไขมันช่องท้อง (abdominal fat) จำนวนของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและใหญ่ ($p > 0.05$) (Attia et al., 2016) ในส่วนการทดลองของ Hassan et al. (2011) พบว่าแม่ไก่ที่ได้รับวิตามิน 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลต่อความยาวท่อนำไข่ที่เพิ่มขึ้น และน้ำหนักตับลดลง ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมซีลีเลียมขนาดโมเลกุลระดับนาโน (selenium nano particles) และซีลีเนียมอินทรีย์ (selenomethionine) ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารแม่พันธุ์ไก่วงสามารถเพิ่มความยาวและน้ำหนักท่อนำไข่น้ำหนักรังไข่ได้สูงกว่าการเสริมซีลีเลียมอนินทรีย์ (sodium selenite) โดยเสริมที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เท่ากัน ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเสริมซีลีเลียมทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์สามารถช่วยพัฒนาระบบสืบพันธุ์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (Ismail et al., 2016)

2.11.5 ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไก่ต่อการสะสมวิตามินอีและซีลีเนียมไข่แดง

การสะสมวิตามินอีและซีลีเนียมในไข่แดงได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.8 การทดลองของ Skinvan et al. (2013) พบว่า การเสริมซีลีเลียมยีสต์ร่วมกับวิตามินซี (0.30 mg SeY/kg + 150 mg vit C/kg) มีปริมาณการสะสมซีลีเลียมในไข่แดงที่สูงกว่าซีลีเลียมอนินทรีย์ร่วมกับวิตามินซี (0.3 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3/\text{kg}$ + 150 mg Vit. C/kg) ซึ่งการเสริมซีลีเลียมทั้งสองรูปแบบร่วมกับวิตามินซีสามารถเพิ่ม

การสะสมซีลีเนียมในไข่แดงได้ดีกว่าการเสริมซีลีเนียมและวิตามินซีเพียงชนิดเดียว ($p < 0.05$) ขณะที่การเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสะสมวิตามินอีและซีลีเนียมในไข่แดง ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัยหลักพบว่า การสะสมวิตามินอีในไข่แดงเป็นผลมาจากการได้รับวิตามินอีจากอาหารโดยตรง ซึ่งการสะสมจะเพิ่มขึ้นตามระดับการเสริมวิตามินอี ($p < 0.05$) ในส่วนของปัจจัยที่เกี่ยวกับซีลีเนียมพบว่าระดับของการเสริมซีลีเนียม 0.55 มิลลิกรัม/กิโลกรัมส่งผลให้มีการสะสมวิตามินอี นอกจากนี้การเสริมซีลีเนียมอินทรีย์ที่ระดับ 0.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมสามารถเพิ่มการสะสมซีลีเนียมได้สูงสุด ($p < 0.05$) (Scheidler et al., 2010) โดยให้ผลการทดลองที่คล้ายกันกับ Puthongsiriporn et al. (2001) พบว่าการเพิ่มปริมาณของวิตามินอีในอาหารส่งผลต่อการสะสมวิตามินอีในไข่แดงที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับแม่ไก่ที่ได้รับซีลีเนียมในรูปอินทรีย์มีการสะสมซีลีเนียมในไข่แดงที่เพิ่มมากกว่าการได้รับซีลีเนียมอนินทรีย์ (Leeson et al., 2008)

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกต่อองค์ประกอบทางเคมีในไข่

| Treatment | Parameter | | Reference |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| | Vitamin E | Selenium | |
| | concentration in yolk | concentration in yolk | |
| | $\mu\text{g/g}$ | | |
| 25 mg vitamin E/kg | 22.87 ^c | - | Puthongsiriporn et al. (2001) |
| 45 mg vitamin E/kg | 60.84 ^b | - | |
| 65 mg vitamin E/kg | 93.16 ^a | - | |
| 0.1 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | - | 7.16 ^c | Leeson et al. (2008) |
| 0.3 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | - | 7.68 ^c | |
| 0.1 mg SeY/kg | - | 7.22 ^c | |
| 0.3 mg SeY/kg | - | 7.80 ^{bc} | |
| 0.1 mg B-Traxim Se/kg | - | 8.58 ^{ab} | |
| 0.3 mg B-Traxim Se/kg | - | 8.82 ^{ab} | |

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกต่อองค์ประกอบทางเคมีในไข่ (ต่อ)

| Treatment | Parameter | | Reference |
|--|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | Vitamin E concentration in yolk | Selenium concentration in yolk | |
| | µg/kg | | |
| 50 mg Vit. E + 0.55 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 122.39 | 0.56 | |
| 50 mg Vit. E + 0.55 mg Sel-Plex/kg | 129 | 0.69 | |
| 50 mg Vit. E + 0.75 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 114.03 | 0.64 | |
| 50 mg Vit. E + 0.75 mg Sel-Plex/kg | 121.54 | 0.81 | |
| 100 mg Vit. E + 0.55 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 298.31 | 0.58 | |
| 100 mg Vit. E + 0.55 mg Sel-Plex/kg | 238.97 | 0.62 | |
| 100 mg Vit. E + 0.75 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 269.33 | 0.62 | |
| 100 mg Vit. E + 0.75 mg Sel-Plex/kg | 239.77 | 0.82 | |
| 150 mg Vit. E + 0.55 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 443.75 | 0.83 | Scheideler et al. (2010) |
| 150 mg Vit. E + 0.55 mg Sel-Plex/kg | 406.85 | 0.57 | |
| 150 mg Vit. E + 0.75 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 310.98 | 0.63 | |
| 150 mg Vit. E + 0.75 mg Sel-Plex/kg | 332 | 0.79 | |
| Main effect | | | |
| Vitamin E, mg/kg | | | |
| | 50 | 121.74 ^c | 0.67 |
| | 100 | 260.84 ^b | 0.66 |
| | 150 | 373.40 ^a | 0.69 |
| Main effect | | | |
| Se, mg/kg of diet | | | |
| | 0.55 | 273.21 ^a | 0.63 ^b |
| | 0.75 | 230.77 ^b | 0.72 ^a |

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารสัตว์ปีกต่อองค์ประกอบทางเคมีในไข่ (ต่อ)

| Treatment | Parameter | | Reference |
|--|---------------|----------------------|--------------------------|
| | Vitamin E | Selenium | |
| | concentration | concentration | |
| | in yolk | in yolk | |
| Se source | µg/kg | | |
| Inorganic | 259.8 | 0.60 ^b | Scheideler et al. (2010) |
| Organic | 244.19 | 0.75 ^a | |
| | mg/kg DM yolk | | |
| Control | 215 | 603.00 ^d | Skinvan et al. (2013) |
| 150 mg Vit. C/kg | 240 | 594.00 ^d | |
| 0.3 mg Na ₂ SeO ₃ /kg | 244 | 1073.00 ^c | |
| 0.3 mg Na ₂ SeO ₃ /kg + 150 mg Vit. C/kg | 264 | 1117.00 ^b | |
| 0.3 mg SeY/kg | 255 | 1066.00 ^c | |
| 0.3 mg SeY/kg + 150 mg Vit. C/kg | 253 | 1168.00 ^a | |

หมายเหตุ: ^{a,b,c} Means within a columns with different letter different significantly (P<0.05)

Na₂SeO₃ = sodium selenite; SeY = Selenium yeast-Sel-PlexTM; Se = Selenium; Vit C = vitamin C; vit E = vitamin E

¹B-Traxim Se is a newly developed organic Se product using soybean peptides as the ligand.

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของพลังงานระดับต่ำ (2,650 kcal ME/kg) และระดับปกติ (2,900 kcal ME/kg) ร่วมกับการเสริมวิตามินซี 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิตามินอี 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อศึกษาผลต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด ส่วนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของพลังงานร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมเพื่อศึกษาผลที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ การต้านอนุมูลอิสระ องค์ประกอบทางเคมี และการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ซึ่งใช้ไข่เป็นโมเดลโดยทำการทดลองในไข่ที่อายุ 33 สัปดาห์ จนถึงอายุ 38 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาในการทดลองทั้งหมด 6 สัปดาห์ ซึ่งมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่

ไข่ ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบระดับพลังงาน (2,650 และ 2,900 kcal ME/kg) วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไข่ ต่อสมรรถนะการผลิต การผสมติด และระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิภายในท่อนำไข่ เริ่มทำการทดลองในไข่ที่อายุ 33 สัปดาห์ จนถึงอายุ 35 สัปดาห์ รวมระยะเวลาในการทดลอง 3 สัปดาห์

3.1.1 อาหารทดลอง

เป็นการทดสอบระดับพลังงานร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารไข่เทศเมีย พลังงานในอาหารแบ่งออกเป็น 2 ระดับคือ พลังงานระดับปกติ 2,900 kcal ME/kg ตามคำแนะนำของมาตรฐานสายพันธุ์ฮัสซา บราวน์ และพลังงานระดับต่ำ 2,650 kcal ME/kg ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมที่ระดับความต้องการขั้นพื้นฐานของไข่ โดยเสริมวิตามินซี (ascorbic acid) ที่ระดับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วิตามินอีที่ให้อยู่ในรูปดีแอล-อัลฟา โทโคฟีรอล (DL-alpha tocopherol) ที่ระดับ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Aviagen Inc, 2013) และซีลีเนียมเสริมในรูปของซีลีเนียมยีสต์ (selenium yeast) ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (NRC, 1994) โดยไข่ได้รับอาหารวันละ 109 กรัม โดยไข่ได้รับพลังงานวันละ 281 และ 316 kcal ME สำหรับอาหารพลังงานต่ำ และพลังงานปกติตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามสมการการคำนวณของ Scott et al. (1982)

และ Lesson and Summers (2005) โดยอาหารระดับพลังงานต่ำดังกล่าวคำนวณอยู่บนพื้นฐานที่คาดว่าจะไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตไข่ ส่วนโภชนาชนิอื่น ๆ ในสูตรอาหารทั้งหมดคำนวณตามคำแนะนำของ NRC (1994) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองโดยวิธี proximate analysis ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใยหยาบ และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1998) ปริมาณของแคลเซียมและฟอสฟอรัสโดยวิธี ICP-MS/OES ดังแสดงตารางที่ 3.1.1

สมการที่ 1: Total ME requirement (kcal/bird/day) = ME maintenance + ME activity + ME egg โดย Scott et al. (1982)

$$\text{NE maintenance} = 83 * (\text{body weight})^{0.75}$$

$$\text{ME maintenance} = \text{NE maintenance} / 0.32$$

$$\text{ME activity} = \text{ME maintenance} * 0.37$$

$$\text{ME egg} = 86 * \text{egg production}$$

สมการที่ 2: Total ME requirement (kcal/bird/day) = (((Body weight)*((170-(2.2*°C))) + (2*Egg mass) + (5*Weight gain)) โดย Lesson and Summers (2005)

อาหารทดลองที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 : ระดับพลังงานในอาหาร 2,650 kcal ME/kg

กลุ่มที่ 2 : ระดับพลังงานในอาหาร 2,650 kcal ME/kg ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม

กลุ่มที่ 3 : ระดับพลังงานในอาหาร 2,900 kcal ME/kg

กลุ่มที่ 4 : ระดับพลังงานในอาหาร 2,900 kcal ME/kg ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม

3.1.2 สัตว์ทดลอง

1. ไก่แม่พันธุ์ ใช้ไก่ไข่สายพันธุ์อีซ่า บราวน์ เพศเมียอายุ 33 สัปดาห์ เป็นตัวแทนแม่ไก่พันธุ์จำนวน 128 ตัว ทำการแบ่งไก่ไข่ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 32 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 1,700±20 กรัม เลี้ยงบนกรงตบข้างเดี่ยว โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แม่ไก่ทุกตัวได้รับอาหารในปริมาณที่เท่ากันตามมาตรฐานสายพันธุ์วันละ 109 กรัม และให้น้ำอย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง (ad libitum) โดยเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด โปรแกรมแสงเปิดแสง 17 ชั่วโมงและปิดแสง 7 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนการปรับสัตว์ก่อนเริ่มการทดลองในสัปดาห์ที่ 1 ทำการจัดไก่เข้าตามกลุ่มทดลองต่างๆ และเช็ควเวลาการออกไข่ของไก่แต่ละตัว หลังจากนั้นให้กินอาหารทดลองในสัปดาห์ที่ 31 และ 32 เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์จึงจะเริ่มการทดลองในสัปดาห์ที่ 33

2. ไก่พ่อพันธุ์

2.1 การจัดการพ่อพันธุ์ โดยใช้ไก่พ่อพันธุ์ มทส. อายุ 40-41 สัปดาห์ จำนวน 120 ตัว ที่ผ่านการตรวจสอบ คุณภาพน้ำเชื้อได้แก่ การเคลื่อนที่ ความเข้มข้น สี ตัวเป็นตัวตาย และปริมาณน้ำเชื้อ เพื่อเป็นแหล่งน้ำเชื้อสดคุณภาพดีสำหรับใช้ศึกษาในการทดลองที่ 1 เลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด โปรแกรมแสงเปิดแสง 16 ชั่วโมงและปิดแสง 8 ชั่วโมง บนกรงดับแบบขังเดี่ยว ไก่พ่อพันธุ์ มทส. ได้รับอาหารสูตรทางการค้าวันละ 130 กรัม และให้น้ำอย่างเต็มที่

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบวัตถุดิบของสูตรอาหารทดลอง

| Ingredients (%) | Low - ME | Normal - ME |
|------------------------------------|------------------|------------------|
| | 2,650 ME Kcal/kg | 2,900 ME Kcal/kg |
| Corn | 55.20 | 55.20 |
| Meat meal | 4.29 | 4.29 |
| Soybean meal, 44 %CP | 24.30 | 24.30 |
| Soybean oil | - | 4.45 |
| Cassava pulp | 5.53 | 1.08 |
| Salt | 0.36 | 0.36 |
| DL-methionine | 0.15 | 0.15 |
| CaCo ₃ | 9.17 | 9.17 |
| Mono-calcium phosphate | 0.50 | 0.50 |
| Premix ¹ | 0.50 | 0.50 |
| Calculated compositions (%) | | |
| ME (kcal/kg) | 2,650 | 2,900 |
| Calcium | 4.00 | 4.00 |
| Available Phosphorus | 0.39 | 0.39 |
| Calculated compositions (%) | | |
| Digestible Lysine | 0.85 | 0.84 |
| Methionine | 0.40 | 0.40 |
| Methionine + Cystine | 0.61 | 0.61 |
| Threonine | 0.56 | 0.56 |

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบวัตถุดิบของสูตรอาหารทดลอง (ต่อ)

| Ingredients (%) | Low - ME | Normal - ME |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| | 2,650 ME Kcal/kg | 2,900 ME Kcal/kg |
| Analyzed compositions (%) | | |
| Dry matter | 93.18 | 92.82 |
| Crude protein | 17.75 | 17.71 |
| Crude fiber | 2.27 | 2.28 |
| Ether extract | 2.59 | 7.16 |
| Calcium | 4.08 | 4.10 |
| Total Phosphorus | 0.54 | 0.54 |

หมายเหตุ: ¹ Premix for laying hen (/kg diet): Vitamin A, 2,000,000 IU; Vitamin D₃, 600,000 IU; Vitamin K₃, 300 mg; Vitamin B₁, 400 mg; Vitamin B₂, 1,000 mg; Vitamin B₆, 600 mg; Vitamin B₁₂, 1.3 mg; Nicotinic acid, 2,500 mg; Choline Chloride, 100 mg; D-calcium pentothal, 1,500 mg; Folic acid, 100 mg; Biotin, 2 mg; Mn, 12 g; Zn, 10 g; Fe, 8 g; Cu, 2 mg; I, 0.4 mg; Co, 0.4 mg.

2.2 การเก็บน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม ไก่พ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อด้วยวิธีการ นวดวันละ 60 ตัว/วัน ในช่วงเวลา 13.00 หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อทั้งหมดที่ได้มารวมกันแล้วผสมกับ สารรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ Beltsville poultry semen extender (BPSE) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จุ่ม หลอดน้ำเชื้อลงในน้ำที่อุณหภูมิ 25°C ควมคุมอุณหภูมิและอย่าให้สัมผัสกับแสงจนกระทั่งนำไปผสม ควรทำอย่างรวดเร็ว

3.1.3 การผสมเทียม และการฟักไข่

ทำการผสมเทียมวันละ 1 ครั้งต่อเนื่องกันเพียงแค่ 2 วัน ในช่วงเวลา 13.30-14.30 โดยใช้ไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตร คุณน้ำเชื้อปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร จำนวนอสุจิต่อแม่ไก่หนึ่งตัว (total number spermatozoa/hen/day) ประมาณ 250-300 x 10⁶ เซลล์ ทำการบีบบริเวณท้องแม่ไก่ให้ปาก มดลูกที่อยู่ด้านในทวารร่วมออกมาด้านนอก จากนั้นสอดไซริงค์เข้าไปลึกประมาณ 2-4 เซนติเมตร แล้วทำการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่ท่อไข่พร้อมกับปล่อยแรงดันที่บีบบนช่องท้องแม่ไก่ หลังจากผสม เทียมในวันที่ 2 เสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงเริ่มเก็บไข่ในวันรุ่งขึ้น โดยเก็บเป็นระยะเวลาทั้งหมด 21 วัน และนำไข่ที่เก็บในแต่ละวันเรียงใส่ถาดฟักเก็บรวบรวมไว้ในในหีองเก็บไข่อุณหภูมิ 19°C โดยทุก ๆ 1 สัปดาห์จะนำไข่ที่รวบรวมได้เข้าสู่ฟักที่อุณหภูมิ 100.40 °F (Petersime incubator[®]) เมื่อครบ 1 สัปดาห์ จึงทำการส่องไข่เพื่อหาจำนวนไข่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ ในกรณีที่พบว่า เป็นไข่ไม่มีเชื้อจะต้อง

ทำการตอกไข่และตรวจสอบบริเวณจุดกำเนิด (germinal disc) อีกครั้งเพื่อยืนยันผล (Biswas et al., 2010; Ahammad et al., 2013a)

3.1.4 ลักษณะที่ต้องการศึกษา

1. ศึกษาสมรรถนะการผลิต (Productive performance)

ชั่งน้ำหนักตัวไก่ไข่ก่อนเริ่มและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกข้อมูลหลังจากที่มีการผสมเทียมครั้งที่ 2 เป็นเวลา 21 วัน โดยบันทึกปริมาณอาหารที่กิน จำนวนไข่ น้ำหนักไข่ จำนวนไข่มีเชื้อ และไม่มีเชื้อ นำค่าต่างๆ ข้างต้นมาคำนวณเพื่อวัดสมรรถนะการผลิตและการมีชีวิตรอดของอสุจิ ดังสูตรต่อไปนี้

ปริมาณอาหารที่กินต่อตัว (feed intake, gram/day)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินในช่วงการทดลอง}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมด}}$$

ปริมาณพลังงานที่กินได้ต่อวัน (energy intake, ME kcal/day)

$$= \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินต่อตัว} \times \text{ระดับพลังงานในอาหาร}}{1000}$$

ผลผลิตไข่ (hen day production, %)

$$= \frac{\text{จำนวนที่เก็บได้ทั้งหมดในวันนั้น} \times 100}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมดที่มีอยู่ในวันนั้น}}$$

อัตราการผสมติด (fertility rate, %)

$$= \frac{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดที่มีเชื้อ} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดที่เข้าฟัก}}$$

ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ (fertile period length, day) = จะนับจำนวนวันจากไข่มีเชื้อที่พบในวันสุดท้ายหลังจากที่ตรวจพบไข่เชื้อตายติดต่อกัน 3 วัน ตามวิธีของ Beaumont et al. (1992)

3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อระบบสืบพันธุ์ องค์ประกอบทางเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายในของแม่ไก่ การปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีที่สนับสนุนการมีชีวิตรอดของอสุจิ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และการแสดงออกของโปรตีนที่จากของเหลวจากที่หลังต่อมสร้างเปลือกไข่ และการสะสมสารต้านอนุมูล

อิสระในไข่แดง ซึ่งการทดลองนี้ต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 ไข่ไข่อายุ 36 สัปดาห์ จนถึงอายุ 38 สัปดาห์

3.2.1 การเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterine fluid) และไข่แดง

สุ่มไข่จำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มการทดลองเพื่อเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ซึ่งเก็บสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 2 สัปดาห์ที่ไข่ไข่อายุ 36-37 สัปดาห์ โดยจะเก็บจากแม่ไก่ตัวเดิม ในการเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จะทำการเก็บไข่เมื่อไข่อยู่ในท่อนำไข่ประมาณ 10 ชั่วโมง แม่ไก่จะถูกฉีดโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร (ในอัตราโพรสตาแกลนดิน 1 ส่วน : น้ำเกลือ (normal saline) 9 ส่วน, V/V) เข้าสู่เส้นเลือดบริเวณปีก (wing vein) จากนั้นประมาณ 2 นาที ใช้มีดขนาดเล็กตัดออกมาทางทวาร (cloaca) จนกระทั่งไก่หลังของเหลวพร้อมด้วยฟองไข่ออกมา นำตัวอย่างของเหลวที่ได้ผสมกับสารละลาย phosphate buffer saline 2X, PBS (อัตราส่วน 1:1, V/V) แล้วแบ่งใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี และนำตัวอย่างของเหลว 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย laemmli buffer 5X เพื่อวิเคราะห์ western blots แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C (Gautron et al., 1997) ในส่วนของฟองไข่ถูกนำมาแยกไข่ขาวออกหมดจนเหลือเฉพาะไข่แดงใส่ลงในกล่องพลาสติกปิดฝาให้เรียบร้อยแช่เย็นที่ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3.2.2 การศึกษาอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองอายุไข่ไข่ที่ 38 สัปดาห์ ทำการสุ่มไข่ไข่กลุ่มการทดลองละ 5 ตัว ชั่งน้ำหนักตัว และทำให้สลบโดยใช้ยา Nembutal[®] จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าบริเวณหลอดเลือดดำ (jugular vein) รอจนกระทั่งไก่สงบนิ่งแล้วทำการเชือดคอเพื่อนำเลือดออกจนหมดเพื่อไม่ให้มีเลือดในช่องท้อง หลังจากนั้นผ่าเปิดช่องท้องแยกชิ้นส่วนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ และอวัยวะภายใน โดยทำการเก็บข้อมูลดังนี้ชั่งน้ำหนักท่อนำไข่ รังไข่ ตับ ไชมันช่องท้อง และวัดความยาวท่อนำไข่ นับจำนวน ฟอลลิเคิล (follicle) แบ่งออกเป็น 2 ขนาด คือ ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก $\geq 5-10$ mm และขนาดใหญ่ >10 mm โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) ตามวิธี Attia et al. (2010) และ Oke et al. (2016) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์อวัยวะต่างๆ ชั่งต้น โดยเทียบกับน้ำหนักตัวมีชีวิต

3.2.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.2.3.1 การวัด 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดค่า DPPH ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดงคัดแปลงมาจาก Marinova and Batchvarov (2011) ทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายเมทานอล (methanol) หรือ (ethanol) เอทานอล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10.000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ (DPPH[·], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อ DPPH[·] ทำปฏิกิริยากับสารต้าน

อนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กทรอนิกส์หรือไฮโดรเจนอะตอมทำให้สีม่วงจางลง จนเป็นสีเหลือง DPPH : H วัตถุประสงค์ของการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณแล้วมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้ง DPPH (ปวีณา, 2559) สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ทำปฏิกิริยากันระหว่างตัวอย่างกับสาร DPPH เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ตามสมการของ Gherraf et al. (2011) ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

หมายเหตุ: A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง + สารละลาย DPPH

3.2.3.2 การวัด Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวัดตรวจวัดมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดงคัดแปลงมาจาก Premanand et al. (2007) เพื่อวัดปริมาณ MDA ที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของโมเลกุลไขมันภายในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดงทำปฏิกิริยากับสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) ภายใต้สภาวะกรดและความร้อนทำให้ MDA ที่เกิดขึ้นในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ TBA จะได้เป็นสารประกอบที่มีสีชมพูและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ MDA ที่ความเข้มข้น 0-40 นาโนโมล/มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณของ MDA ที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง

3.2.3.3 การวัดค่า glutathione peroxidase (GPx)

การวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดงตามวิธี enzymatic assay of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) ของบริษัท Sigma โดยวัดค่าดูดกลืนแสงในปฏิกิริยาจากการลดลงของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งจะทำการวัดค่าทุกๆ 1 นาที จนครบ 10 นาที และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปแล้วจะแสดงผลในรูปแบบ U/ml ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ในส่วนของไข่แดงต้องวิเคราะห์หาค่าโปรตีนก่อนเพื่อใช้คำนวณผลให้อยู่ในรูปแบบ U/mg protein

3.2.2.4 การวิเคราะห์สารชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่โดยใช้เทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

การวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่คัดแปลงมาจากวิธีของ Gerard et al. (2015) สุ่มตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่ผูกผสมกับสารละลาย PBS 2x กลุ่มการทดลองละ 5 ตัวอย่าง หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างโดยนำของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ปริมาณ 450 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) ในสารละลาย Deuterium oxide (D₂O) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วบรรจุลงในหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตร เก็บไว้ที่ 4°C เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบสารชีวเคมีได้แก่ lactate, acetate, N-acetyl groups, citrate, creatine-creatinine, glucose, β-glucose, α-glucose, และ formate โดยเทคนิค ¹H NMR spectroscopy รุ่นความถี่ 500 MHz ยี่ห้อ Bruker ในการทดลองนี้ส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.2.5 การวิเคราะห์วิตามินซี

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คัดแปลงมาจากวิธีของ (ชาราทิพย์, 2554) โดยนำตัวอย่างของเหลวที่ผสมกับ PBS2X มากกรองด้วย syringe filter ใต้งในขวดแก้วสีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC แบบ reverse-phase รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.0 mm ID x 250 mm) ในการทดลองนี้ใช้ Mobile phase เป็น Eluent 1 ต่อ Eluent 2 อัตราส่วน 3 ต่อ 7 (Eluent 1: 78 mM potassium dihydrogen phosphate, 0.2% 1,5-dimethylhexylamine, pH3; Eluent 2: 900 ml Eluent1, 98 ml Acetonitrile, 42 ml ethanol) flow rate 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 µl ตรวจจับด้วย UV detector ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.2.2.6 การวิเคราะห์วิตามินอี

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีในไข่แดง เริ่มจากขั้นตอนการสกัดวิตามินอีในไข่แดงคัดแปลงมาจาก Schweigert et al. (2002) ทำการชั่งไข่แดง 0.3 กรัม ลงในหลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอเทนอล 400 ไมโครลิตร และเติม BHT 0.05% (BHT 0.05 กรัม ละลายใน Hexane 100 มิลลิลิตร) 2 มิลลิลิตร แล้วบดให้ละเอียดด้วย glass homogenizer ประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น หลังจากนั้นย้ายชั้นด้านบน (hexane) ใต้งในหลอดทดลองแบบแก้ว นำไประเหย hexane ด้วยการเป่าแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ในตู้ดูดควันจน hexane ระเหยหมดจะเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมัน จากนั้นละลายด้วยสารละลาย methanol/chloroform (อัตราส่วน 1:1 V:V) 1 มิลลิลิตร เทใส่ในขวดแก้วสีชาสำหรับใช้กับเครื่อง HPLC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์วิตามินอี การ

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ใช้เครื่อง HPLC แบบ reverse-phase รุ่น Agilent 1260 ตรวจจับด้วย Fluorescence detector ที่ excitation 292 นาโนเมตร และ emission 327 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.0 mm ID x 250 mm) และ Mobile phase คือ methanol ต่อ น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ อัตราส่วน 98 ต่อ 2 อัตราการไหล (flow rate) ที่ 1.5 มิลลิลิตร/นาที

3.2.2.7 การวิเคราะห์ซีลีเนียม

การวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียมในไข่แดงคัดแปลงมาจาก Jing et al. (2015) ทำการย่อยไข่แดงด้วยเครื่องไมโครเวฟรุ่น Multiwave 3000 ยี่ห้อ Anton Paar โดยทำการชั่ง 300 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดย่อยแล้วเติมกรดไนตริก 70% 8 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริก 37% 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณ 12 ชั่วโมงจนกระทั่งไม่พบไอกรดสีเหลืองลอยออกจากหลอดจึงนำเข้าย่อยด้วยเครื่องไมโครเวฟที่ power 600 และอุณหภูมิ 190 °C เมื่อย่อยเสร็จแล้วเทสารละลายใส่ขวดปรับปริมาณขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์เข้าให้เข้ากัน ทำการเตรียมสารละลายซีลีเนียมมาตรฐานที่ระดับ 0, 0.02 0.05, 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิกรัม/ลิตร นำสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานเทใส่หลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียมด้วยเครื่อง inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) รุ่น optima 8000 ยี่ห้อ PerkinElmer ใช้การตรวจวัดแบบ Axial ที่ความยาวคลื่น 196.026 นาโนเมตร

3.2.2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BSA Protein assay kit และ

การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blots

วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ได้แก่ Enolase 1 (ENO1); Superoxide Dismutase 1 (SOD1) และ Malate Dehydrogenase1 (MDH1) คัดแปลงมาจาก Carillon et al. (2016) ทำการหาความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่โดยใช้ตัวอย่างของเหลวที่ผสมกับสารละลาย PBS 2X ด้วยวิธี BSA Protein Assay kit เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างของเหลวที่ผสมกับ laemmli buffer 5X

การวิเคราะห์แสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blots คำนวณหาปริมาณตัวอย่างของเหลวที่ผสมกับ laemmli buffer 5x ที่จะต้องใช้ในการวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 60 ไมโครลิตร (ตามขนาดหลอดของเจล) โดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 10 มิลลิกรัม/ปริมาตร จากนั้นทำการแยกโมเลกุลโปรตีนด้วย Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-page) โดยใช้เจล polyacrylamide ที่มีความเข้มข้น 8-16% Separating gel ขนาด 1.5 มิลลิเมตร แยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ด้วยวิธี wet blotting โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 155 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลส บ่มด้วย primary

antibody ที่มีความจำเพาะได้แก่ ENO1, SOD1 และ MDH1 ในอัตราส่วนเจือจาง 1:1,000 (ใน 5% milk in TBST 1X) จับกับโปรตีนแผ่นในโทรเซลลูโลสและเลือกใช้ Goat anti rabbit ในอัตราส่วนเจือจาง 1:5,000 (ใน 5% milk in TBST 1X) เป็น secondary antibody ที่จำเพาะต่อ primary antibody อื่นๆที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจในศึกษาโดยใช้เครื่อง Gel documentation system

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์หาความแปรปรวน (analysis of variances, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DUNCAN) โดยใช้ SPSS 16.0 software และใช้ Orthogonal contrasts เพื่อเปรียบเทียบ 1) ความแตกต่างค่าเฉลี่ยในอาหารพลังงานต่ำกับพลังงานปกติ และ 2) กลุ่มที่ไม่มีการเสริมกับกลุ่มที่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

3.4.1 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารเครื่องมือ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.2 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์ อาคารเครื่องมือ 14

3.4.3 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 085, INRA, CNRS, Université de Tours, IFCE, 37380 Nouzilly, France

3.4.4 งานสัตวปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง 1 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558

สิ้นสุดการทดลอง 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2559

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด

ผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิตของแม่ไก่ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 4.1 พบว่า น้ำหนักไข่ ผลผลิตไข่ และปริมาณพลังงานที่กินได้ต่อวัน (kcal ME/day) ในไก่ไข่กลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานปกติ (2,900 kcal ME/kg) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/kg) ($p < 0.05$) โดยพบว่าแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำมีผลผลิตไข่ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารพลังงานต่ำที่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างในส่วนของปริมาณอาหารที่กิน น้ำหนักตัวสุดท้าย และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ($p > 0.05$)

ตามปกติไก่ไข่จะกินอาหารตามระดับพลังงานที่ร่างกายต้องการเพื่อนำไปใช้ในการดำรงชีพและสร้างผลผลิต แต่อาหารจะต้องมีพลังงานอยู่ในช่วง 2,600-3,000 kcal ME/kg ถึงจะสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณการกินได้ดี (Cufadar et al., 2010b; Perez-Bonilla et al., 2012) โดยพลังงานมีบทบาทโดยตรงต่อการให้ผลผลิตไข่ ซึ่ง Ribeiro et al. (2014) และ Yang et al. (2016) รายงานว่าไก่ไข่ที่ได้รับอาหารที่มีพลังงาน 3,000 kcal ME/kg ให้ผลผลิตไข่ที่ดีกว่าอาหารที่มีพลังงาน 2,700 kcal ME/kg นอกจากนี้ Perez-Bonilla et al. (2012) ยังพบว่าไก่ไข่กลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงาน 2,850 kcal ME/kg มีผลผลิตไข่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงาน 2,650 kcal ME/kg ถึงแม้ว่าการให้อาหารพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/kg) ในการศึกษาครั้งนี้จะมีผลทำให้น้ำหนักไข่ลดลง แต่น้ำหนักไข่ยังคงอยู่ในช่วง 50-70 กรัม ที่สามารถนำเข้าฟักได้ แต่อย่างไรก็ตามไข่ที่มีน้ำหนักมากก็ส่งผลให้ลูกไก่มีน้ำหนักตัวแรกเกิดที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งเป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก

นอกจากนี้การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมยังมีผลในการเพิ่มผลผลิตไข่ และน้ำหนักไข่ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารพลังงานต่ำ สามารถเพิ่มผลผลิตไข่ได้เทียบเท่ากับอาหารพลังงานปกติทั้งกลุ่มที่มีการเสริมและไม่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม และยังพบว่าน้ำหนักไข่ในไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานปกติ ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีค่าเฉลี่ยสูงสุด ($P < 0.05$) สอดคล้องกับ Hanafy et al. (2009) ศึกษาผลการเสริมซีลีเนียม 0.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารไก่ไข่พบว่า สามารถเพิ่ม

ผลผลิตไข่และน้ำหนักไข่ Joachim et al. (2011) ศึกษาการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารไก่ไข่ สามารถเพิ่มน้ำหนักไข่ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีงานทดลองอื่นๆ เช่น การเสริมวิตามินซีที่ระดับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารไก่แม่พันธุ์ (Aydin and Dikmen, 2014) และการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 240 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารนกกระทาที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศร้อน (Attia et al., 2016) สามารถเพิ่มผลผลิตไข่ น้ำหนักไข่ การผสมติด และการฟักออกได้ เนื่องจากภายใต้สภาวะเครียดจากความร้อนวิตามินอีมีบทบาทช่วยเพิ่มผลผลิตและน้ำหนักไข่ได้ โดยสามารถแก้ไขความบกพร่องในการสังเคราะห์สารโปรตีนตั้งต้นสำหรับสร้างไข่แดงหรือไวเทลโลเจินิน (vitellogenin) โดยวิตามินอีช่วยเพิ่มการสังเคราะห์ไวเทลโลเจินินจากตับเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปสร้างไข่แดง (Ciftci et al., 2005)

จากผลการทดลองนี้พบว่า ระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ไม่มีผลต่อระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.1) ถึงแม้ว่าการทดลองครั้งนี้ไม่พบผลในการเพิ่มระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด ซึ่งยังไม่สามารถอภิปรายผลได้อย่างแน่ชัด รวมถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเรื่องดังกล่าวยังมีค่อนข้างจำกัด แต่อาจเป็นไปได้ว่าไก่ที่ใช้เป็นโมเดลในการศึกษาครั้งนี้ มีประสิทธิภาพการผลิตสูงสุดตามศักยภาพของพันธุกรรมอยู่แล้ว ซึ่งตามมาตรฐานไก่ไข่ช่่า บราวน์ อายุ 33-38 สัปดาห์มีผลผลิตไข่และน้ำหนักไข่ประมาณ 92.5-93.9% และ 62.4-63.3 กรัม ตามลำดับ จากงานทดลองนี้อาหารทดลองทุกสูตร ยกเว้นกลุ่มอาหารพลังงานต่ำและไม่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม สามารถเพิ่มผลผลิตไข่ได้สูงกว่ามาตรฐาน รวมถึงจากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยพบว่า สารประกอบทางเคมีจำพวก Ca^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} กลูโคส รวมถึงค่า pH ของของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเชื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิจากการถูกทำลายโดยสารอนุมูลอิสระ และยังเป็นพลังงานสำรองสำหรับการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Ahammad et al., 2013b) จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (in vitro) พบว่าของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่มีบทบาทสำคัญในการยืดระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และเพิ่มอัตราการผสมติด (Ahammad et al., 2013a) Breque et al. (2006) พบการสะสมวิตามินอีปริมาณสูงในเนื้อเยื่อบริเวณช่องคลอด ส่วนต่อระหว่างช่องคลอดและต่อมสร้างเปลือกไข่ และต่อมสร้างเปลือกไข่ ในไก่กลุ่มที่รับวิตามินอี 130 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับวิตามินอีที่ระดับ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อีกทั้งยังพบปริมาณการสะสมของวิตามินซี กลูต้าไธโอน เปอร้ออกซิเดส และ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตสในเนื้อเยื่อบริเวณข้างต้นมีปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุ ดังนั้นการปรับเปลี่ยนค่าทางชีวเคมีของของเหลวภายในต่อมสร้างเปลือกไข่ เพื่อยืดระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิและเพิ่มอัตราการผสมติด ควรคำนึงถึงสารต้านอนุมูล

อิสระชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในท่อนำไข่ เช่น Cu Zn และ Mn เป็นต้น โดยแร่ธาตุดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญลำดับแรกในกลไกการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่จะเข้ากำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ในสัตว์ปีกพบเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสได้ในไมโทคอนเดรียเป็นหลักและในไซโทซอลบางส่วน ดังนั้นการเพิ่มเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในเซลล์ท่อนำไข่หรือเซลล์อสุจิ อาจช่วยยับยั้งซูเปอร์ออกไซด์ที่เป็นสาเหตุหลักในการสร้างอนุมูลอิสระชนิดอื่นที่จะส่งผลต่อความเสียหายต่อเซลล์ของอสุจิ

ตารางที่ 4.1 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลามีชีวิตรอดของอสุจิ และอัตราการผสมติด

| Parameters | Treatments | | | | Pooled SEM | P-value | |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------|-----------------------|-------|
| | Low energy | | Normal energy | | | Contrast ¹ | |
| | Non Supplement | Supplement | Non supplement | Supplement | | 1 | 2 |
| Feed intake (g/day) | 108.31 | 108.75 | 107.70 | 107.60 | 0.197 | NS | NS |
| Energy intake (ME kcal/day) | 287.02 ^b | 287.10 ^b | 310.00 ^a | 313.00 ^a | 1.208 | 0.0001 | NS |
| Final body weight (g) | 1,736.25 | 1,745.52 | 1,725.38 | 1,732.86 | 6.671 | NS | NS |
| Body weight change (g) | 26.25 | 48.45 | 26.15 | 35.00 | 6.025 | NS | NS |
| Egg production (%) | 92.08 ^b | 93.98 ^a | 93.96 ^a | 94.58 ^a | 0.315 | 0.040 | 0.040 |
| Egg weight (g) | 58.42 ^c | 57.04 ^d | 59.00 ^b | 59.83 ^a | 0.127 | 0.0001 | 0.008 |
| Fertile period length (day) | 16.83 | 17.62 | 17.27 | 17.39 | 0.156 | NS | NS |
| Fertility (%) | 77.96 | 79.32 | 79.63 | 78.61 | 0.617 | NS | NS |

หมายเหตุ : ^{a-d} Means within the same row with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹Orthogonal contrasts: 1) low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) and 2) non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

NS= non-significant

4.2 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน

ผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายในของแม่ไก่แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 พบว่าน้ำหนักรังไข่ และไขมันในช่องท้องในไก่ไข่กลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานปกติ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ ($p < 0.05$) โดยแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีน้ำหนักรังไข่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรทดลองอื่นๆ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติ ($p > 0.05$) ขณะที่ไขมันช่องท้องมีค่าสูงสุดในแม่ไก่ที่ได้อาหารพลังงานปกติที่ไม่มีการเสริมวิตามินและแร่ธาตุเมื่อเปรียบเทียบกับกรทดลองอื่นๆ ($p < 0.05$) การที่น้ำหนักรังไข่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงาน 2,900 kcal ME/kg อาจเนื่องมาจากไก่ได้รับพลังงานอย่างเพียงพอสำหรับการรักษาความสมบูรณ์ของรังไข่ แต่อย่างไรก็ตามระดับพลังงานที่สูงก็ส่งผลทำให้การสะสมไขมันในช่องท้องเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Suder et al., 2007) น้ำหนักรังไข่ที่เพิ่มขึ้นจากการทดลองนี้บ่งชี้ถึงการพัฒนาฟอลลิเคิลในระยะต่างๆ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการตกไข่ (ovulation) ได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลผลิตไข่ที่สูงในกลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานปกติตามที่กล่าวมาข้างต้น Suder et al. (2007) พบว่าพลังงานในอาหารที่ระดับ 2,860 kcal ME/kg มีผลในการเพิ่มน้ำหนักไขมันช่องท้องและท่อนำไข่ที่มากกว่าอาหารพลังงานระดับต่ำ Buakeeree and Nualhnuplong (2016) รายงานว่าน้ำหนักรังไข่ของไก่แม่พันธุ์ที่ได้รับอาหารพลังงาน 3,000 kcal ME/kg มีค่าสูงกว่าไก่กลุ่มที่ได้รับพลังงาน 2,850 kcal ME/kg แต่ไม่พบความแตกต่างในส่วนขนานน้ำหนักและความยาวของท่อนำไข่ ส่วนไขมันในช่องท้องซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองที่สำคัญสำหรับสร้างผลผลิตไข่ในช่วงการให้ผลผลิตสูงสุด (peak production) ตามมาตรฐานไก่ไข่พันธุ์อีซ่า บราวน์ การให้ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วงอายุ 23-46 สัปดาห์ ซึ่งตรงกับช่วงอายุแม่ไก่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (33-38 สัปดาห์) แต่อย่างไรก็ตามหากมีไขมันสะสมที่มากเกินไปหลังจากช่วงให้ผลผลิตสูงสุดแล้วจะทำให้ผลผลิตไข่ อัตราการผสมติดและการฟักคลดลง อีกทั้งยังอาจเพิ่มอัตราการตายของแม่ไก่ได้ (Aviagen Inc, 2013)

เป็นที่น่าสนใจว่าอาหารพลังงานระดับปกติ เสริมด้วยวิตามินอี วิตามินซี และซีลีเนียมสามารถลดไขมันในช่องท้องในท้องลงได้เทียบเท่ากับอาหารพลังงานต่ำ ($p > 0.05$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน โดยวิตามินอีสามารถเปลี่ยนลิโปโปรตีนในรูป low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ไปเป็น high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) เนื่องจาก HDL-C จะเป็นตัวพาไขมันชนิดเลวหรือคอเลสเตอรอลจากเนื้อเยื่อมาทำลายที่ตับ (Sklan, 1983) อีกทั้งยังสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นสำหรับการสร้างไข่แดงในเลือดเช่น ไวเทลโลจีนิน และ very low-density lipoprotein นอกจากนี้วิตามินซียังทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ 7 α -hydroxylase ในการควบคุมการเปลี่ยนคอเลสเตอรอลเป็นกรดน้ำดี

ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง และใช้พลังงานในการสังเคราะห์สารตั้งต้นไข่แดง จึงทำให้การสะสมไขมันในร่างกายลดลง (Maziar and Zaghari, 2010) จึงอาจเป็นผลให้รังไข่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมไม่มีผลในการปรับปรุงระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน เนื่องจากช่วงระยะเวลาการเสริมที่สั้นซึ่งโดยปกติต้องใช้ระยะเวลาในการเสริมมากกว่า 8 สัปดาห์ขึ้นไป (Brennan et al., 2011) ดังนั้นระยะเวลาในการเสริมและช่วงอายุที่มีผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่ไก่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางที่ 4.2 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อลักษณะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะภายใน

| Parameters | Treatments | | | | Pooled SEM | P-value | |
|--|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|-----------------------|----|
| | Low energy | | Normal energy | | | Contrast ¹ | |
| | Non Supplement | Supplement | Non supplement | Supplement | | 1 | 2 |
| Ovary weight (% BW) | 1.98 ^b | 1.96 ^b | 2.26 ^{ab} | 2.36 ^a | 0.060 | 0.003 | NS |
| Oviduct weight (% BW) | 3.19 | 3.20 | 3.06 | 3.19 | 0.038 | NS | NS |
| Oviduct length (cm) | 62.60 | 63.40 | 60.40 | 66.80 | 1.467 | NS | NS |
| Small yellow follicles (the number of follicles) | 10.20 | 12.00 | 11.80 | 12.00 | 0.325 | NS | NS |
| Large yellow follicles (the number of follicles) | 4.60 | 4.80 | 4.80 | 5.20 | 0.109 | NS | NS |
| Liver weight (%BW) | 2.16 | 2.08 | 2.37 | 2.13 | 0.044 | NS | NS |
| Abdominal fat (%BW) | 1.43 ^b | 1.45 ^b | 3.28 ^a | 2.13 ^b | 0.243 | 0.002 | NS |

หมายเหตุ : ^{a-b} Means within the same row with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹ Orthogonal contrasts: 1) low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) and 2) non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

NS= non-significant

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างในส่วนของน้ำหนักและความยาวของท่อหน้าไข จำนวนฟอลิเคิล และน้ำหนักตับ ($p>0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากช่วงอายุแม่ไก่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นช่วงที่สมบูรณ์พันธุ์เต็มที่แล้ว เนื่องจากระบบสืบพันธุ์ และอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายจะถูก พัฒนาให้พร้อมในช่วงระยะไก่อุ่น (pullet) ตั้งแต่อายุสัปดาห์แรกจนกระทั่งถึงประมาณ 20 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การจัดการอาหารหรือการกระตุ้นด้วยแสง (Renema and Robinson, 2004; Cobb-Vantress Inc, 2016) โดยการศึกษาของ Sunder et al. (2007) พบว่าระดับพลังงานที่แตกต่างกันในอาหารมีผลต่อการพัฒนาอวัยวะและระบบสืบพันธุ์ในแม่พันธุ์ระยะไก่อุ่นที่อายุ 5-20 สัปดาห์ และพบว่าการใช้วิตามินซีในอาหารไม่ส่งผลต่อน้ำหนักท่อหน้าไขในแม่ไก่ที่ช่วงอายุ 50-70 สัปดาห์ (Hassan et al., 2011)

4.3 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดง

ผลของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ประกอบด้วยค่าความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) TBARS เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) และการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองแบบ Orthogonal contrast พบว่าการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมสามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส ได้ทั้งในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่และไข่แดงได้สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($p<0.05$) นอกจากนี้ความแตกต่างของระดับพลังงานทั้งที่มีการเสริมหรือไม่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมยังมีผลในการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) และ TBARS ในไข่แดง ($p<0.05$) แต่ไม่พบผลดังกล่าวในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ($p>0.05$)

วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีบทบาทสำคัญต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสทั้งจากของเหลวที่หลังจากต่อมสร้างเปลือกไข่และไข่แดง เพราะซีลีเนียม นอกจากถูกเมแทบอลิซึมเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายแล้วยังถูกส่งผลต่อเพื่อสะสมในไข่แดง ทำให้การทำงานของเอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดสในไข่แดงดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณซีลีเนียมที่ตรวจวัดในไข่แดง จึงอาจเป็นไปได้ซีลีเนียมถูกเมแทบอลิซึมให้อยู่ในรูปสารอื่น เพื่อใช้ในกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Wang et al., 2010; Mistry et al., 2011) รวมถึงการทดลองครั้งนี้ใช้ซีลีเนียมอินทรีย์ที่อยู่ในรูป ซีลีเนียมยีสต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซึมและการนำไปใช้ประโยชน์ (bioavailability) สูงกว่า ซีลีเนียมอนินทรีย์ (Jing et al., 2015) จึงอาจเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้สามารถนำซีลีเนียมไปใช้ได้ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้มากขึ้น จากการรวบรวมเอกสารพบว่า ซีลีเนียมที่สะสมอยู่ในไข่แดง

และไข่ขาว มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GPx ในตับของลูกไก่ระยะเอ็มบริโอ (Suria, 2000; Suria et al., 2016) นอกจากนี้ Brennan et al. (2011) รายงานว่า การเสริมซีลีเนียมในอาหารไก่สามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GPx ในเลือด น้ำหล่อเลี้ยงอสุจิ เนื้อเยื่อ และไข่ รวมถึงยังส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ GPx บริเวณท่อไข่ได้ คืออีกด้วย ซึ่งการสะสมของซีลีเนียมมีความผันแปรไปตามปริมาณและชนิด หรือการเสริมร่วมกับ สารอื่นๆ เช่น วิตามินอี (Yuan et al., 2011; Gjorgovska et al., 2012; Invernizzi et al., 2013; Jing et al., 2015) ซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์เอนไซม์ GPx มีหน้าที่ช่วยปกป้อง เซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระหรือลิพิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide, LOO•) และกำจัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ในขั้นตอนสุดท้ายของกลไกการต้านอนุมูลอิสระ (Hassan et al., 1988; Toyoda et al., 1990; Pavlata et al., 2001; Spears et al., 2003; Mistry et al., 2011; Ziaei et al., 2013; Surai and Fisinin, 2014) อีกทั้งความสามารถในการทำงานเสริมฤทธิ์ (synergistic) กัน ระหว่างวิตามินอีกับซีลีเนียมในกลไกการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเอนไซม์ GPx ทำให้วิตามินอี กลับคืนสภาพหลังจากสูญเสียอิเล็กตรอนเพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อีกครั้ง (detoxifying hydroperoxides) (Surai, 2000; Skrivan et al., 2008) แม้ว่าเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสใน ของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จะเพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่ออัตราการผสมติดและการมีชีวิตรอดของ อสุจิ อาจเป็นเพราะในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเฉพาะ ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่เท่านั้น อาจส่งผลช่วยป้องกันอสุจิจากอนุมูลอิสระเพียงส่วน หนึ่ง ซึ่งยังขาดการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์อสุจิโดยตรงหลังจากที่อสุจิถูก เก็บรวบรวมกลับของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่หรืออยู่ภายในท่อไข่ เพื่อที่จะสามารถพิสูจน์ ข้อเท็จจริงนี้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดย Surai (2016) พบว่าภายในเซลล์อสุจิยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอีก หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ ตัวแรกที่เข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในไซโทซอลและไมโทคอนเดรียของเซลล์อสุจิ

ค่า DPPH เป็นกิจกรรมการต้านอนุมูลที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการยับยั้ง หรือกำจัดอนุมูล ออิสระของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง ส่วนค่า TBARS บ่งชี้ถึงการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่เกิดขึ้นหลังจากอนุมูลอิสระทำลายโครงสร้างไขมันของเซลล์ ในการทดลองนี้ การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูล ออิสระในไข่แดง โดยระดับพลังงานปกติ (2,900 kcal ME/kg) สามารถเพิ่มค่า DPPH และลดค่า TBARS เมื่อเปรียบเทียบกับระดับพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/kg) ($p < 0.05$) รวมถึงการเสริมวิตามิน ซี วิตามินอี และซีลีเนียมก็มีผลทำให้ค่า DPPH เพิ่มขึ้นและค่า TBARS ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มที่ไม่มีการเสริมเช่นกัน ($p < 0.05$) โดยกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดในรูปแบบ DPPH และ

TBARS มีประสิทธิภาพสูงสุดในกลุ่มอาหารพลังงานปกติ ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม อาจเป็นเพราะการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถเสริมสร้างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในไข่แดงได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินอี เนื่องจากวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่พบมากในไข่แดง มีประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องความเสียหายของเซลล์ และเนื้อเยื่อจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน วิตามินอีสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูล lipid peroxyl โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล lipid peroxyl นอกจากนี้การเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมยังเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น โดยกลไกนี้ได้กล่าวไว้ในพารากราฟข้างต้นแล้ว (Jana et al., 2013) ซึ่งมีงานทดลองหลายๆ งานด้วยกันที่รายงานว่า การเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมในอาหารไก่ฟักพันธุ์ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (Total antioxidant capacity) ภายในน้ำหล่อเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) (Ebeid, 2012) หรือการใช้วิตามินอี วิตามินซี หรือซีลีเนียมเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกันในอาหารแม่ไก่ (Skriwan et al., 2008; Jena et al., 2013; Jiang et al., 2013; Zdunczyk et al., 2013; Jing et al., 2015; Asadi et al., 2016) สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และช่วยยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ Puthongsiriporn et al. (2001) รายงานว่าวิตามินซีไม่มีผลในการยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เพราะวิตามินซีในไข่แดงมีปริมาณที่น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตาม พลังงานวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า DPPH และ TBARS รวมถึงปริมาณวิตามินซีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ เนื่องด้วยองค์ประกอบของของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ส่วนใหญ่เป็นน้ำ อาจทำให้ไม่สามารถตรวจวัดค่า TBARS จากปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไขมัน (Grotto et al., 2009) งานทดลองนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการสะสมวิตามินซีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ อาจเนื่องมาจากในสภาวะปกติ ร่างกายสัตว์ปีกสามารถสังเคราะห์วิตามินซีขึ้นเองได้บริเวณไตโดยใช้น้ำตาลจำพวกกลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) และแมนโนส (mannose) เป็นสารตั้งต้น (Lin et al., 2006; Elkheir et al., 2008; Khan, 2011) การสะสมวิตามินซีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จึงมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน อีกทั้งการทดลองครั้งนี้แม่ไก่ถูกเลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-28°C ซึ่งเป็นสภาพอุณหภูมิที่สัตว์อยู่สบาย (comfort zone) จึงอาจส่งผลทำให้วิตามินซีแสดงผลไม่ชัดเจนอย่างไรก็ตามจากการรวบรวมเอกสารพบว่า ภายใต้อุณหภูมิความเครียดจากความร้อน (34°C) สัตว์จะต้องการสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซีมากกว่าปกติเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ โดยจำเป็นต้องได้รับการเสริมจากอาหาร ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้แสดงประสิทธิภาพได้ชัดเจนกว่าการเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่อุณหภูมิปกติ (24°C) (Attia et al., 2011; Attia et al., 2016)

นอกจากนี้ความแตกต่างของระดับพลังงานในอาหารมีผลต่อค่า TBARS ของไข่แดง โดยเฉพาะอาหารพลังงานต่ำมีการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสูงกว่าอาหารพลังงานสูง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการทดลองนี้ได้จำกัดปริมาณอาหารที่กินต่อวันจึงทำให้แม่ไก่ได้รับอาหารพลังงานต่ำมีปริมาณพลังงานที่กินเฉลี่ย 287 ME kcal/วัน ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติที่มีปริมาณพลังงานที่กินเฉลี่ย 311 ME kcal/วัน และแม่ไก่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้อยู่ในช่วง อายุ 32-38 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่ให้ผลผลิตไข่สูงสุด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแม่ไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ มีพลังงานไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงมีการสลายไขมันที่สะสมภายในร่างกายเพื่อนำมาใช้สำหรับการดำรงชีวิตและให้ผลผลิต (Aviagen Inc, 2013) จึงก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการสลายไขมันทำให้ค่า TBARS สูงขึ้นด้วยเช่นกัน (Chance et al., 1979; Halliwell and Gutteridge, 1999; Surai, 2003)

จากการทดลองนี้พบว่าวิตามินอีมีการสะสมในไข่แดง เนื่องจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่จำเป็นและร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง จำเป็นต้องได้รับผ่านทางอาหารเท่านั้น (Chan and Decker, 1994; Ziaei et al., 2013) โดยปริมาณการสะสมมีความแปรผันไปตามระดับของวิตามินอีและรูปแบบที่เสริม (Surai et al., 1997; Surai et al., 1998; Vieira, 2007; Puthpong-siriporn et al., 2001; Scheideler et al., 2010; Jiang et al., 2013) โดยวิตามินอีสังเคราะห์ที่นิยมเสริมในอาหารสัตว์ปีกโดยทั่วไปอยู่ในรูป α -tocopherol ซึ่งจะเสริมในระดับสูงกว่า NRC กำหนดไว้ (Biswas et al., 2010; Urso et al., 2015) Jiang et al. (2013) รายงานว่าการเสริมวิตามินอีในรูป D- α -tocopherol acetate ที่ระดับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในอาหารไก่ไข่ สามารถเพิ่มการสะสมวิตามินอีในไข่แดงมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริม Scheideler et al. (2013) รายงานว่าศึกษาการเสริมวิตามินอีในรูป DL- α -tocopherol ที่ระดับ 50-150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยวิตามินอีมีการสะสมวิตามินในไข่แดงเพิ่มสูงขึ้นตามระดับการเสริม เนื่องจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน และทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระได้ดีในบริเวณเนื้อเยื่อ วิตามินอีที่อยู่ในรูป α -tocopherol มีประสิทธิภาพสูงในการดูดซึมและออกฤทธิ์ (biologically active) โดยหลังจากการดูดซึมวิตามินอีสามารถถูกเคลื่อนย้ายมาเก็บสะสมไว้ในไข่แดง ในการทดลองครั้งนี้วิตามินอีที่สะสมในไข่แดงอาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาของตัวอ่อน โดยวิตามินอีในไข่แดงสามารถส่งผ่านไปสะสมยังเนื้อเยื่อ ป้องกันอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ในช่วงของการพัฒนาตัวอ่อน (Surai et al., 1999; Cherian and Sim, 2003; Parolini et al., 2017) ส่งผลให้อัตราการฟักออกเพิ่มขึ้น (Aydin and Dikmen, 2010)

ตารางที่ 4.3 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

| Parameters | Treatments | | | | Pooled SEM | P-value | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|-----------------------|--------|
| | Low energy | | Normal energy | | | Contrast ¹ | |
| | Non supplement | Supplement | Non supplement | Supplement | | 1 | 2 |
| GPx in uterine fluid (U/ml) | 0.15 ^b | 0.18 ^{ab} | 0.23 ^{ab} | 0.28 ^a | 0.017 | NS | 0.017 |
| GPx in egg yolk (U/mg protein) | 15.44 ^b | 16.75 ^a | 15.40 ^b | 16.88 ^a | 0.160 | NS | 0.0001 |
| DPPH in uterine fluid (%) | 44.91 | 45.36 | 45.17 | 44.03 | 0.591 | NS | NS |
| DPPH in egg yolk (%) | 42.88 ^d | 59.28 ^b | 50.21 ^c | 66.73 ^a | 1.562 | 0.0001 | 0.0001 |
| TBARS in uterine fluid (nmol/ml) | ND | ND | ND | ND | - | - | - |
| TBARS in egg yolk (nmol/ml) | 5.94 ^a | 4.00 ^b | 4.85 ^{ab} | 3.27 ^c | 0.253 | 0.032 | 0.0001 |
| Vitamin C in uterine fluid (mg/L) | 4.20 | 3.98 | 2.84 | 3.94 | 0.255 | NS | NS |
| Vitamin E in egg yolk (mg/kg egg yolk) | 3.15 ^c | 15.5 ^a | 4.91 ^c | 9.04 ^b | 1.035 | NS | 0.0001 |
| Se in egg yolk (mg/kg egg yolk) | 1.89 | 1.85 | 1.78 | 1.78 | 0.044 | NS | NS |

หมายเหตุ : ^{a-d} Means within the same row with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹ Orthogonal contrasts: 1) low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) and 2) non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

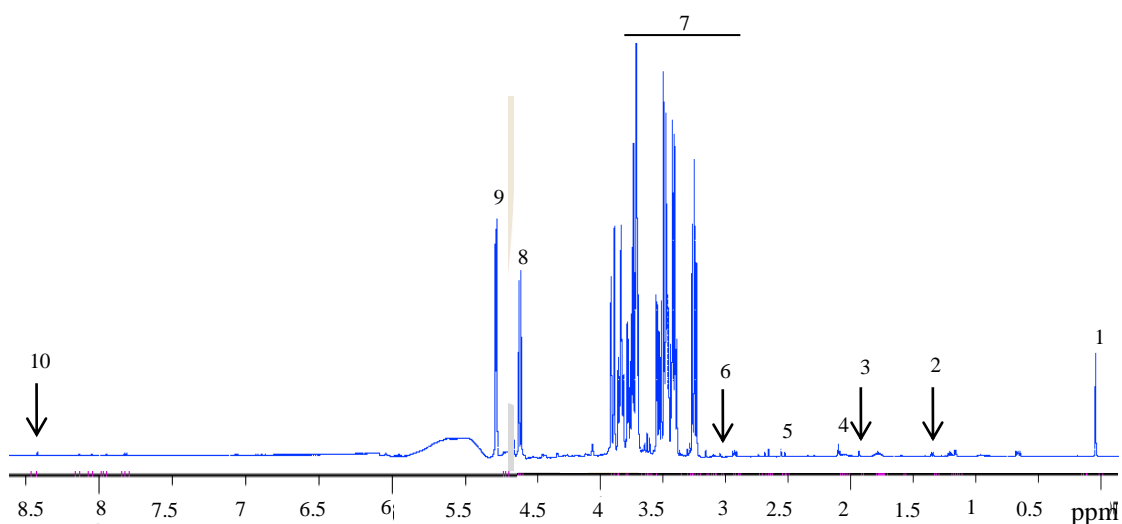
ND = no detecting; NS= non-significant

4.4 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อองค์ประกอบชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

ผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ทั้ง 4 สูตร ต่อองค์ประกอบชีวเคมีในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.1 เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบ Orthogonal contrast พบว่าอาหารพลังงานปกติ 2,900 kcal ME/kg สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose) แอลฟา-กลูโคส (α -glucose) และ เบต้า-กลูโคส (β -glucose) ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ได้สูงกว่าอาหารพลังงานต่ำ 2,650 kcal ME/kg ($p < 0.05$) โดยแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติ และพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีปริมาณกลูโคสเท่ากับ 0.82 และ 0.87 มิลลิโมล แอลฟา-กลูโคสเท่ากับ 0.344 และ 0.304 มิลลิโมล และเบต้า-กลูโคสเท่ากับ 0.787 และ 0.791 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอาหารพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ (metabolizable energy) โดยเฉพาะสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในอาหารสัตว์ปีก 60-65% เมื่อร่างกายมีการย่อยสลายอาหารพลังงานระดับสูงจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสในปริมาณเพิ่มขึ้นกว่าอาหารพลังงานระดับต่ำ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคสภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ น่าจะเป็นแหล่งพลังงานสำรองที่สำคัญสำหรับใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของอสุจิขณะที่อาศัยอยู่ในท่อนำไข่

สารอาหารจำพวก กลูโคส (glucose) กาแล็กโทส (galactose) ฟรักโทส (fructose) กรดอะมิโน (amino acid) ไขมัน (fatty) วิตามิน และเกลือแร่ที่ได้จากการย่อยอาหารพลังงานปกติเพียงพอที่จะดูดซึมผ่านกระแสเลือดและถูกลำเลียงไปยังอวัยวะต่างๆ โดยปกติอสุจิสามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรักโทส หรือ แมนโนส โดยดูดซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ด้วยกระบวนการขนส่งกลูโคส (glucose transporters) แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (glycolytic pathway) เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการสร้าง ATP (adenosine triphosphate) สำหรับใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของอสุจิ (Pasupuleti, 2007; Bucci et al., 2011) จากการรวบรวมเอกสารพบว่า ปริมาณกลูโคสภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของอสุจิ (Ahammad et al., 2013a; Ahammad et al., 2013b) ในการเคลื่อนที่ ระยะเวลาการมีชีวิตรอดและความสามารถในการผสมติด โดย Amaral et al. (2011) รายงานว่า อสุจิที่ถูกเก็บในสารที่รักษาคุณภาพน้ำเชื้อผสมกลูโคสมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานให้แก่อสุจิ เช่น fructose, citrate, glutamate และ acetate ฯลฯ (Douard et al., 2004) ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อปริมาณ Acetate, N-acetyl, Citrate, Creatin-creatinine, Formate รวมไปถึงปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ($p > 0.05$) ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ของแม่ไก่ที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตร Patra et al. (2015) รายงานว่า สารชีวเคมีจากของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่หรือของเหลวจากรังไข่

(follicular fluid) เป็นสารบ่งชี้ (biomarker) ที่สำคัญในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์หรือความแตกต่างระหว่างสารเคมีกับกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ซึ่งสารบ่งชี้ (biomarker) บางชนิด น่าจะสามารถใช้เป็นตัวติดตามการทำงาน เมื่อถูกเหนี่ยวนำโดยสารอาหารที่ให้แก่แม่ไก่ผ่านทางอาหารในอนาคตได้



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่าง $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (1) DSS, (δ 0); (2) lactate, (δ 1.33); (3) acetate, (δ 1.91); (4) N-acetyl groups, (δ 2.02-2.07); (5) citrate, (δ 2.69); (6) creatine-creatinine, (δ 3.02); (7) glucose, (δ 3.26-3.90); (8) β -glucose, (δ 4.64); (9) α -glucose, (δ 5.22) and (10) formate (δ 8.45) ใช้ฐานข้อมูลเลขเคมีกัลชิฟท์ (chemical shift, δ) ในการจำแนกสารเคมีอ้างอิงจาก Nicholson et al. (1995); Gerard et al. (2015); Settachaimongkon et al. (2014)

ตารางที่ 4.4 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อองค์ประกอบชีวเคมีภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

| Parameters | Treatments | | | | Pooled SEM | P-value | |
|--|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------|-----------------------|----|
| | Low energy | | Normal energy | | | Contrast ¹ | |
| | Non supplement | Supplement | Non supplement | Supplement | 1 | 2 | |
| | mM | | | | | | |
| Acetate | 0.008 | 0.009 | 0.007 | 0.009 | 0.0005 | NS | NS |
| N-acetyl | 0.024 | 0.020 | 0.018 | 0.018 | 0.001 | NS | NS |
| Citrate | 0.01 | 0.014 | 0.014 | 0.011 | 0.001 | NS | NS |
| Creatin- Creatinine | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.009 | 0.0008 | NS | NS |
| Glucose | 0.71 ^b | 0.72 ^b | 0.82 ^{ab} | 0.87 ^a | 0.023 | 0.004 | NS |
| α-glucose | 0.25 ^b | 0.27 ^b | 0.344 ^a | 0.304 ^{ab} | 0.011 | 0.001 | NS |
| β-glucose | 0.63 ^b | 0.67 ^{ab} | 0.787 ^a | 0.791 ^a | 0.024 | 0.04 | NS |
| Formate | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.005 | 0.0003 | NS | NS |
| Total protein in uterine fluid (mg/ml) | 0.3 | 0.42 | 0.39 | 0.35 | 0.027 | NS | NS |

หมายเหตุ : ^{a-b} Means within the same row with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

¹ Orthogonal contrasts: 1) low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) and 2) non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

NS= non-significant

4.5 ผลของระดับพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม ต่อการแสดงออกของโปรตีน Superoxide Dismutase 1 (SOD1), Enolase 1 (ENO1) และ Malate Dehydrogenase 1 (MDH1) ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

ผลการแสดงออกของโปรตีนที่มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ (SOD1 และ ENO1) ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จากการเหนี่ยวนำด้วยพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ เมื่อเปรียบเทียบแบบ Orthogonal contrast พบว่า กลุ่มที่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมทั้งในอาหารพลังงานปกติและพลังงานต่ำ มีการแสดงออกของโปรตีน SOD1

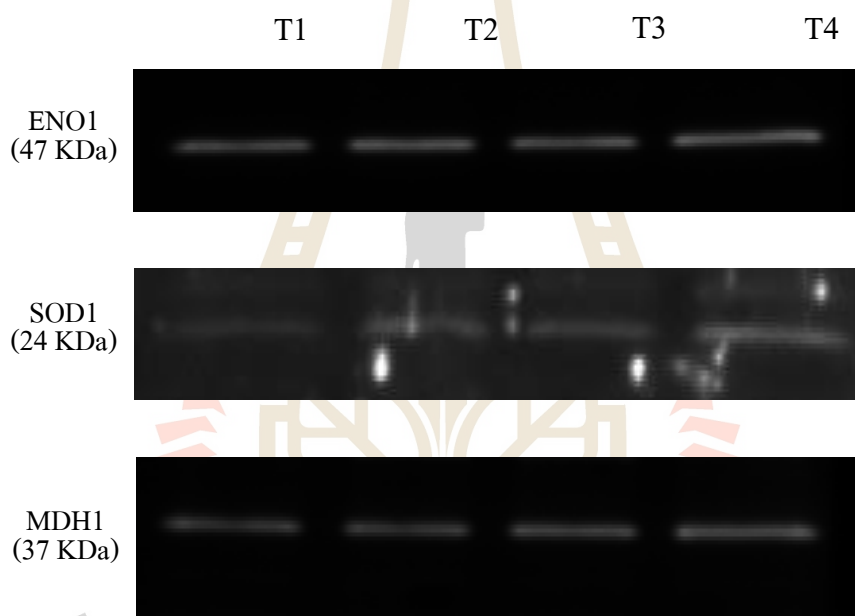
และ ENO1 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเสริม ($p < 0.05$) โดยแม่ไก่ที่ได้รับอาหารระดับพลังงานปกติ ร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีการแสดงออกของโปรตีน ENO1 สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ($p < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.2, 4.3 และ 4.4

การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน SOD1 และ ENO1 ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยลดผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อเซลล์จากอนุมูลอิสระ รวมถึงช่วยกระตุ้นกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากโปรตีน SOD เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ ทำหน้าที่ในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide, O_2^*) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบริเวณเนื้อเยื่อของระยะเอ็มบริโอและอสุจิในสัตว์ปีก โดย (Surai, 2016) รายงานว่า SOD มีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อสัตว์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดแสดงให้เห็นถึงร่างกายหรือเซลล์มีการปรับกลไกเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระจากการรวบรวมผลการทดลองอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกัน พบว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระไรโบฟลาวิน (riboflavin) สามารถเหนี่ยวนำยีนในกลุ่มต้านอนุมูลอิสระ enolase (ENO1), superoxide dismutase 1 (SOD1) รวมถึง catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPX1), haem oxygenase 1 (HMOX1), transketolase (TKT), NADPH oxidase 5 (NOX5), dual oxidase 1 (DUOX1) cDNA, mitochondrial ferritin (FTMT) และ aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALD3A1) ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หรือการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ (กากเมล็ดอ่อนแห้ง) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารไก่พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณท่อนำไข่ (magnum, uterus และ vagina) มีการแสดงออกของโปรตีน SOD, GPX และ CAT เพิ่มขึ้น (Cheung et al., 2014; Carillon et al., 2016) ในส่วนของโปรตีน ENO พบว่ามีบทบาททั้งในด้านกระบวนการเมแทบอลิซึมพลังงานและการต้านอนุมูลอิสระ โดย ENO เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล (metalloenzyme) ทำหน้าที่กระตุ้นการเปลี่ยน 2-phosphoglyceric acid ไปเป็น phosphoenolpyruvic acid เกิดขึ้นได้ทั้งในวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) และกลูโคซิโกลิโคเนอเจเนซิส (gluconeogenesis) เกี่ยวข้องกับรักษาระดับน้ำตาลกลูโคสและกระบวนการสร้างพลังงานที่อยู่ใน ATP ที่สำคัญสำหรับเซลล์ รวมถึงการเคลื่อนที่ของอสุจิ การพัฒนาอวัยวะและระบบสืบพันธุ์ ขณะที่การแสดงออกของ ENO ยังบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Nakamura et al., 2013; Ji et al., 2016) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ แม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียมมีการแสดงออกของโปรตีน ENO สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม แม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำที่ไม่มีการเสริมมีการแสดงออกโปรตีน ENO สูงกว่าแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำที่มีเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียม และอาหารพลังงานปกติที่ไม่มีการเสริม ทั้งนี้อาจผลมาจากความแตกต่างของระดับพลังงาน และการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร เนื่องจากกระบวนการแคแทบอลิซึม

และเมแทบอลิซึม ของสิ่งมีชีวิต เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ต้องการเอนไซม์ ENO ใช้สำหรับปฏิกิริยาเร่ง (catalyzed reaction) ในวิถีไกลโคลิซิส หรือปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse reaction) ในวิถีกลูโคเนโอจีนิซีสอย่างใดอย่างหนึ่ง เพื่อเปลี่ยน 2-phosphoglyceric acid เป็น phosphoenolpyruvic acid ซึ่งการเกิดกระบวนการดังกล่าวนี้ขึ้นอยู่กับ การปรับเปลี่ยนกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตในขณะนั้น (Avilan et al., 2011) นอกจากนี้แม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำที่ไม่มีเสริม อาจเกิดจากการปรับสมดุลการต้านอนุมูลอิสระให้เพียงพอต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระ โดยปกติร่างกายและเซลล์สิ่งมีชีวิตมีกลไกการปรับสมดุลอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ โดยอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างสามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณ (signaling) หรือกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของเซลล์ให้เกิดกระบวนการต้านอนุมูลอิสระเพื่อปรับสมดุลอนุมูลอิสระให้เป็นกลาง (Surai, 2016) จึงอาจทำให้การแสดงออกโปรตีน ENO ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่เพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

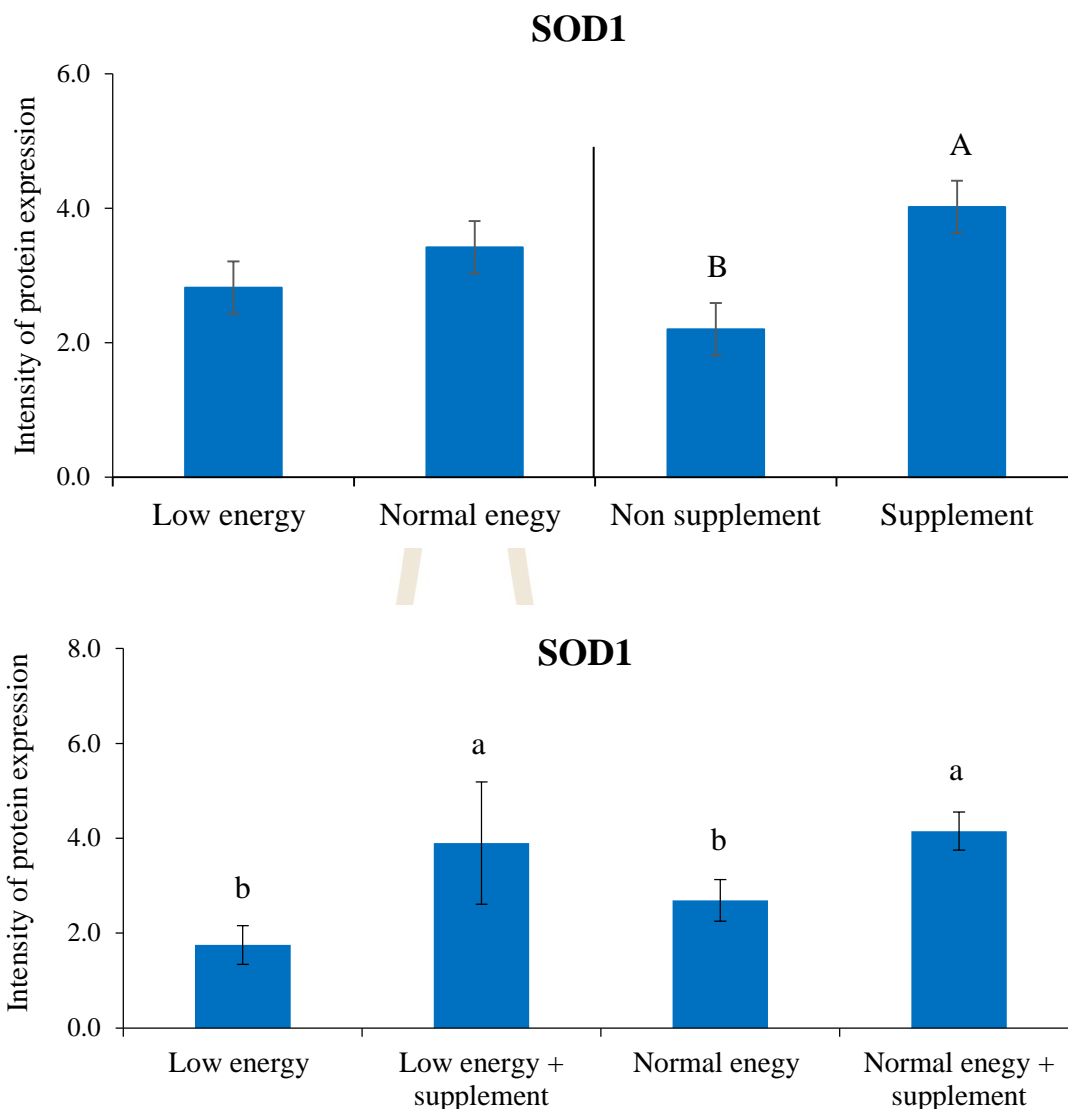
การแสดงออกของโปรตีน MDH1 ในของเหลวที่ได้จากต่อมสร้างเปลือกไข่ของแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติมีค่าสูงกว่าอาหารพลังงานต่ำ ($p < 0.05$) โดยแม่ไก่ที่ได้รับอาหารพลังงานปกติร่วมกับการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมมีปริมาณการแสดงออกของโปรตีน MDH1 สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4.2 และ 4.5) แสดงให้เห็นว่า แม่ไก่ได้รับพลังงานที่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจาก MDH1 มีบทบาทสำคัญใน Krebs cycle เพื่อสร้างพลังงานผ่านการสลายสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน เมื่อยิน MDH1 เข้าถอดรหัสเพื่อผลิตเอนไซม์ MDH1 ทำหน้าที่ควบคุมการขนส่ง NADH เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่ง NADH สามารถถ่ายอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจน โดยผ่านลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ทำให้เกิดพลังงานที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่าง ADP กับฟอสเฟตกลายเป็น ATP (Zhou et al., 2012; Filho et al., 2014) โดยการศึกษาของ Fouchecourt et al. (2000) พบว่า ทำงานของไซม์ MDH ภายใต้วีถี TCA cycle ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมภายในตัวอสุจิ และเพิ่มความสามารถในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นพลังงาน มีผลทำให้ความสามารถในการเข้าปฏิสนธิของอสุจิเพิ่มสูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า อาหารพลังงานปกติที่มีการเสริมวิตามินซี วิตามินอีและซีลีเนียมมีการแสดงของโปรตีน MDH1 สูงสุด อาจเป็นผลมาจากกลุ่มการทดลองดังกล่าว มีปริมาณกลูโคสภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่สูงด้วยเช่นกัน ซึ่งอสุจิสามารถย่อยสลายโมเลกุลของกลูโคสไปเป็นไพรูเวต จากนั้นเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นอะเซทิลโคเอนไซม์ เอ (acetyl-coA) เพื่อเข้าสู่ TCA cycle ด้วยเหตุผลนี้จึงอาจส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน MDH เพิ่มขึ้น เนื่องจาก เอนไซม์ MDH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้กรดมาลิก (malic acid) สูญเสีย 2H ให้แก่ NAD^+ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น $\text{NADH} + \text{H}^+$ และกรดออกซาโลแอสีติก (oxaloacetate) ในปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของ TCA cycle (Minarik et al., 2002)

การที่พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมสามารถปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางชีวเคมี และ การแสดงออกของโปรตีนภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ต่อเซลล์อสุจียังขาดข้อมูล การศึกษา ซึ่งในการศึกษารั้งต่อไปควรนำเทคนิคอื่น ๆ ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมี และการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์อสุจิ เช่น เทคนิคเมแทบอลอไมกส์ (metabolomics) หรือโปรตีโอมิกส์ (proteomics) เพื่อตรวจหาสารเคมีหรือโปรตีนตัวบ่งชี้ (biomarkers) (พัชรา และเทวินทร์, 2559; Wu et al., 2011) แต่ในการศึกษารั้งนี้โดยเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่า การปรับเปลี่ยนสารอาหารมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ดังนั้นการประยุกต์โดยใช้สารอาหาร เพื่อเหนี่ยวนำการออกโปรตีนที่มีบทบาทต่อการรักษาความสมบูรณ์พันธุ์ และการมีชีวิตรอดของอสุจิ น่าจะนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้



ภาพที่ 4.2 การแสดงออกของโปรตีน ENO1, SOD1 และ MDH1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่เมื่อวัดโดยวิธี Western blot

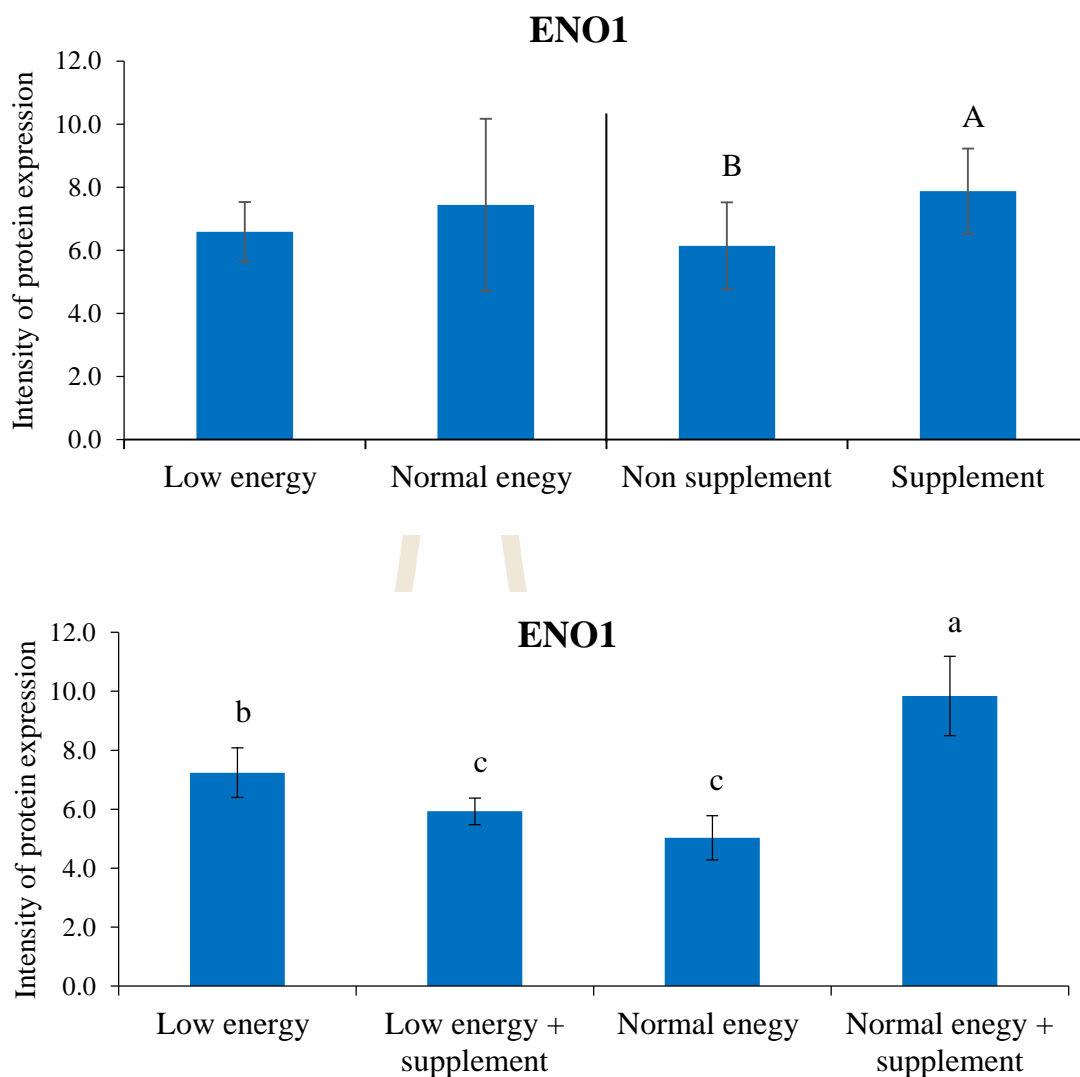
หมายเหตุ : T1; low energy diet (2,650 kcal ME/kg), T2; low energy diet and supplement 200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se, T3; normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) and T4; normal energy diet and supplement 200 mg/kg of vitamin C, 100mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se.



ภาพที่ 4.3 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน SOD1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลเชิงปริมาณจากความหนาแน่นของแถบ (Band density) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง)

หมายเหตุ : ^{A-B} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using orthogonal contrasts: low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) or non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

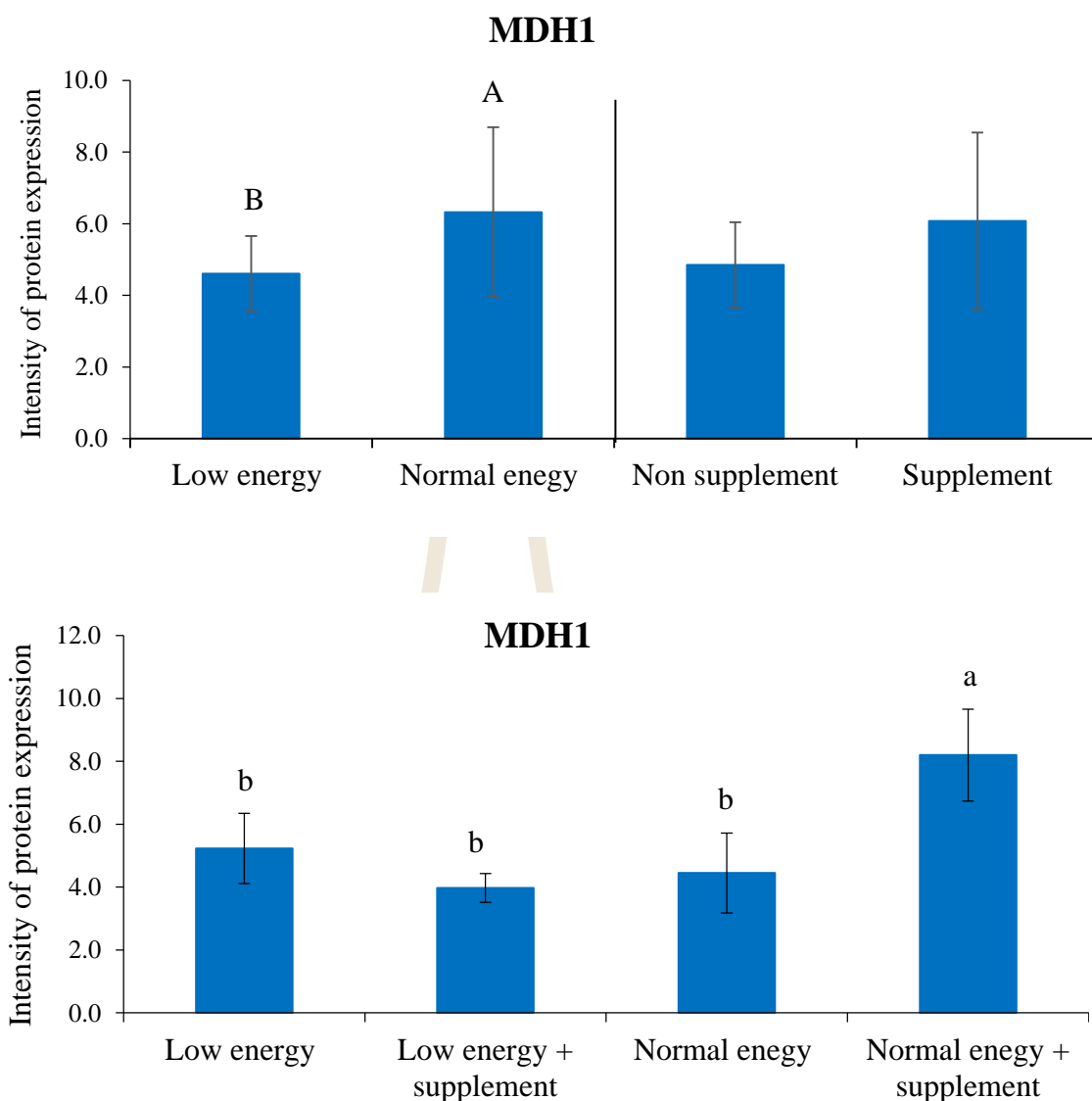
^{a-b} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using Duncan's new multiple range test.



ภาพที่ 4.4 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน ENO1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลเชิงปริมาณจากความหนาแน่นของแถบ (Band density) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง)

หมายเหตุ : ^{A-B} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using orthogonal contrasts: low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) or non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

^{a-c} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using Duncan's new multiple range test.



ภาพที่ 4.5 ผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมต่อการแสดงออกของโปรตีน MDH1 ภายในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลเชิงปริมาณจากความหนาแน่นของแถบ (Band density) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง)

หมายเหตุ : ^{A-B} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using orthogonal contrasts: low energy diet (2,650 kcal ME/kg) vs. normal energy diet (2,900 kcal ME/kg) or non-supplement vs. supplement (200 mg/kg of vitamin C, 100 mg/kg of vitamin E and 0.3 mg/kg of Se).

^{a-b} Means within the different letters differ significantly ($p < 0.05$) by using Duncan's new multiple range test.

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

การศึกษาผลของพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารแม่ไก่ต่อสมรรถนะการผลิต ระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการต้านอนุมูลอิสระในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ โดยภาพรวมสรุปได้ดังนี้

5.1.1 พลังงานในอาหารที่ระดับปกติ (2,900 kcal ME/kg) สามารถเพิ่ม น้ำหนักไข่ ผลผลิตไข่ และรักษาความสมบูรณ์ของรังไข่ ได้ดีกว่าอาหารพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/kg)

5.1.2 การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมในอาหารพลังงานต่ำ (2,650 kcal ME/kg) สามารถเพิ่มผลผลิตไข่ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มน้ำหนักไข่ และลดการสะสมไขมันในช่องท้องเมื่อเสริมร่วมกับอาหารพลังงานปกติ

5.1.3 การเสริมวิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมสามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการสะสมวิตามินอีในไข่แดงทั้งในอาหารพลังงานต่ำและพลังงานปกติ อีกทั้งเมื่อเสริมในอาหารพลังงานปกติสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในไข่แดงได้ดีขึ้น

5.1.4 อาหารพลังงานปกติสามารถเพิ่มปริมาณกลูโคส และการแสดงออกของโปรตีน malate dehydrogenase 1 (MDH1) นอกจากนี้วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน superoxide dismutase 1 (SOD1) ทั้งในอาหารพลังงานต่ำและพลังงานปกติ รวมถึงยังช่วยเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน enolase 1 (ENO1) ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ได้ดีขึ้นเมื่อเสริมในอาหารพลังงานปกติ อย่างไรก็ตามทั้งพลังงาน วิตามิน และแร่ธาตุดังกล่าว ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ และการผสมติด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาอัตราการฟักออกเพิ่มเติม เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าพลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียมสามารถปรับปรุงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระภายในไข่แดงได้ ดังนั้นอาจมีผลช่วยปกป้องตัวอ่อน (embryo) ที่อยู่ในฟองไข่จากสารอนุมูลอิสระ

5.2.2 ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้พลังงาน วิตามินซี วิตามินอี และซีลีเนียม จะสามารถปรับปรุงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ องค์ประกอบทางชีวเคมี และการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ แต่อย่างไรก็ตาม ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติดและระยะเวลาการมีชีวิตรอดของอสุจิ โดยกลไกดังกล่าวยังไม่ชัดเจนแต่อาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจมีผลน้อยต่ออสุจิ เนื่องจากภายในเซลล์อสุจิยังมีสารชีวเคมี สารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงโปรตีนอีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้นควรศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แคตาเลส กลูตาไธโอนรีดักเทส หรือกลูตาไธโอนทรานสเฟอเรส เป็นต้น เพื่อดูว่าสารต้านอนุมูลอิสระใดน่าจะมีบทบาทในการเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิมากที่สุด เพื่อนำไปสู่การเลือกเสริมสารตั้งต้นในอาหารที่มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของสารดังกล่าว



รายการอ้างอิง

- จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์. 2551. ผลของซีลีโนเมทไทโอนีน โซเดียมซีลีโนท์ และวิตามินอีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปวีณา พันทอง. 2559. การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC โดยใช้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์. 2554. ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาตุ๊กตาสวมต่อความต้านทานความเครียดภายใต้สภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พัชรา ธนาบุรุษ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2559. แนวทางการใช้เทคนิคโปรตีนโอมิกส์ในการหาตัวบ่งชี้ที่จำเพาะต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในเซมินอลปลาสมและอสุจิ. วารสารแก่นเกษตร. 44 (2): 333-342.
- มนต์สรวย ยางทอง. 2557. การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 32 (2): 66-75.
- ไมตรี สุทธิจิตต์ รัตนา บรรณเจตพงษ์ชัย วิรพล คู่คงวิริยพันธุ์ ศิริธร ศิริอมรพรรณ ไชยวัฒน์ ไชยสุดสุพัตรา ปรศุพัฒนา อุไรวรรณ พานิช ชลธิดา เทพหินลัพ และศุภชัย เจริญสิน. 2555. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย (สวอ.). พิมพ์ครั้งที่ 1 เชียงใหม่: สมาร์ทโคตรดิง แอนด์ เซอร์วิส. 450 หน้า
- พจน์ ศรีบุญลือ พัทรี บุญศิริ ชฎามาศ พินิจสุนทร และเปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์. 2555. ตำราชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พิมพ์ครั้งที่ 6: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. 545 หน้า.
- อชิป สกุดเผือก. 2557. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. บทความวิชาการ ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 12 หน้า.
- AAFCO. (2003). **Page 285 in Feed Ingredient definitions. 57. Mineral products. Tentative T57:163 official publication.** Association of American Feed Control Officials Inc., Olympia, WA.

- Ahammad, M. U., Miyazato, T., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y., and Nakada, T. (2013a). Effects of fluid secreted from the uterus on duration of retille egg production in hen, and survivability and penetrability of fowl sperm in vitro. **Poultry Science Journal**. 50: 74-82.
- Ahammad, M. U., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y., and Nakada, T. (2013b). Plumping fluid added to storage medium increases twofold the functional life span of fowl spermatozoa in vitro at 4°C. **British Poultry Science**. 54(2): 270-280.
- Ahangari, Y. J., Parizadian, B., and Zamani, M. (2013). The impact of organic selenium supplementation on rooster semen quality in liquid condition. **Poultry Science Journal**. 1(1): 21-28.
- Ahsan, U., Kamrana, Z., Razaa, I., Ahmada, S., Babara, W., Riaza, M. H., and Iqbalb, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction. **Animal Reproduction Science**. 146: 55-62.
- Aljamal, A. 2011. The effect of vitamin E, selenomethionine and sodium selenite supplementation in laying hens. Theses and Dissertations in Animal Science. University of Nebraska.
- Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, A. P., and Ramalho-Santo, J. 2011. Exogenous glucose improves long-standing human spermatozoa motility, viability, and mitochondrial function. **American Society for Reproductive Medicine**. 96: 848-850.
- AOAC. (1998). **Official Method of Analysis**. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Asadi, F., Shariatmadari, F., Karimi-Torshizi, M. A., Mohiti-Asli, M., and Ghanaatparast-Rashti, M. (2016). Comparison of different selenium sources and vitamin E in laying hen diet and their influences on egg selenium and cholesterol content, quality and oxidative stability. **Iranian Journal of Applied Animal Science**. 7(1): 83-89.
- Attia, Y. A., Abdallah, A. A., Merval, A. B., Abd El-Hamid, E. A. E., and Bahaa, M. A. (2011). Effect of betaine with or without two antioxidant on the performance of dual purpose breeding hens exposed to heat stress. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**. 10(1): 73-107.
- Attia, Y. A., Abdalah, A. A., Zeweil, H. S., Bovera, F., Tag E-Din, A. A., and Araft, M. A. (2010). Effect of inorganic or organic selenium supplementation on productive performance, egg

- quality and some physiological traits of dual-purpose breeding hens. **Czech Journal of Animal Science**. 5(11): 505-519.
- Attia, Y. A., Abd El-Hamid, E. A. E., Ahmed A. A., Marfat, A. B., Mohammed, A. A., Osman, K., Kazim, S., and Baha, M. A. (2016). Laying performance, digestibility and plasma hormones in laying hens exposed to chronic heat stress as affected by betaine, vitamin C, and/or vitamin E supplementation. **SpringerPlus**. 5: 1-12.
- Attia, Y. A., Hassan, R. A., and Qota, E. M. A. (2009). Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks in the tropics 1: Effect of ascorbic acid and different levels of betaine. **Tropical Animal Health and Production**. 41: 807-818.
- Attia, K. M., Tawfeek, F. A., Mady, M. S., and Assar, M. H. (2015). Effect of dietary chromium, selenium and vitamin C on production performance and some blood parameters of local strain Dokki-4 under Egyptian summer conditions. **Egyptian Poultry Science Journal**. 35(1): 311-329.
- Aviagen Inc. (2013). **Ross PS Management Handbook**. Aviagen Inc., Huntsville, AL
- Aviagen Inc. (2016). **Ross 308 Parent stock: Nutrition Specification**. Aviagen Inc., Huntsville, AL.
- Avilan, L., Gualdrón-López, M., Quinones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A. M., and Concepción, J. (2011). Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. **Enzyme Research**. pp. 14.
- Aydin, I., and Dikmen, B. Y. (2014). The effects of vitamin E and vitamin C on sexual maturity body weight and hatching characteristics of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) reared under heat stress. **Animal Science Papers and Reports**. 32: 261-26.
- Bakst, M. R. (1985). Zinc reduces turkey sperm oxygen uptake in vitro. **Poultry Science**. 64: 564-566.
- Bakst, M. R. (2011). Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. **Journal of Animal Science**. 89(1): 1323-1329.
- Bakst, M. R., and Richards, M. P. (1985). Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. **Poultry Science**. 64: 555-563.
- Bakst, M. R., Wishart, G., and Brullard, J. P. (1994). Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. **Poultry Science**. 5: 117-143.

- Beaumont, C., Brillard, J. P., Millet, N., and De, R. M. (1992). Comparison of various characteristics of duration of fertility in hens. **British Poultry Science**. 33: 649-661.
- Biswas, A., Mohan, J., and Sastry, K. V. H. (2010). Effect of vitamin E on production performance and egg quality traits in Indian Native Kadaknath hen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 23(3): 396-400.
- Blesbois, E. (2012). Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. **Journal of Poultry Science**. 49: 141-149.
- Brennana, K. M., Crowder, C. A., Cantor, A. H., Pescatore, A. J., Barger, J. L., Horgan, K., Xiao, R., Power, R. F., and Dawson, K. A. (2011). Effects of organic and inorganic dietary selenium supplementation on gene expression profiles in oviduct tissue from broiler-breeder hens. **Animal Reproduction Science**. 125: 180-188.
- Breque, C., Surai, P., and Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**. 66: 314-323.
- Breque, C., Surai, P., and Brillard, J. P. (2006). Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. **Molecular Reproduction and Development**. 73: 1045-1051.
- Buakeeree, K., and Nualhnuplong, P. (2016). Effects of dietary protein and energy levels on growth performances and reproductive system development in female Betong chicken (*Gallus domesticus*) during growing-pullet period. **Khon Kaen Agriculture Journal**. 44(3): 469-478.
- Bucci, D., Rodriguez-Gil, J. E., Vallorani, C., Spinaci, M., Galeati, G., and Tamanini, C. (2011). GLUTs and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**. 32(4): 348-355.
- Carillon, J., Barbe, F., Barial, S., Saby, M., Sacy, A., and Rouanet, J. M. (2016). Diet supplementation with a specific melon concentrate improves oviduct antioxidant defenses and egg characteristics in laying hens. **Poultry Science**. 95: 1898-1904.
- Chan, K. M., and Decker, E. A. (1994). Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 34: 403-426.
- Chance, B. S., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**. 59: 527-605.

- Cherian, G., and Sim, J. S. (2003). Maternal and post-hatch dietary ploy unsaturated fatty acids alter tissue tocopherol status of chicks. **Poultry Science**. 82: 681-686.
- Cheung, I. M. Y., McGhee, C. N. J., and Sherwin, T. (2014). Beneficial effect of the antioxidant riboflavin on gene expression of extracellular matrix elements, antioxidants and oxidases in keratoconic stromal cells. **Clinical and Experimental Optometry**. 97: 349-355.
- Ciftci, M., Nihat-Ertas, O., and Guler, T. (2005). Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to a chronic heat stress. **Revista De Medicina Veterinaria**. 156: 107-111.
- Cinar, M., Yildirim, E., Yigit, A. A., Yalcinkaya, I., Duru, O., Kisa, U., and Atmaca, N. (2014). Effects of dietary supplementation with vitamin C and vitamin E and their combination on growth performance, some biochemical parameters, and oxidative stress induced by copper toxicity in broilers. **Biological Trace Element Research**. 158: 186-196.
- Cobb-Vantress Inc. (2016). **Breeder management guide**. Coob[®]. Siloam Springs, AR, United States. pp. 74.
- Cufadar, Y., Olgum, O., Bahtiyarca, Y., and Yildiz, A. O. (2010a). Effects of dietary energy content on the performance and laying traits of the breeder chukar partridge (*Alectoris chukar*) housed in battery cages or litter floor pens. **Revista De Medicina Veterinaria**. 161(3): 99-103.
- Cufadar, Y., Olgum, O., Bahtiyarca, Y., and Yildiz, A. O. (2010b). Effects of dietary energy and protein on performance, reproduction traits and nitrogen excretion of breeder chukar partridges (*Alectoris chukar*). **Revista De Medicina Veterinaria**. 161(4): 151-156.
- Daghir, N. J. (2008). **Poultry Production in Hot Climates**. 2nd Edition, Published by CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK. pp. 387.
- Das, S. C., Isobe, N., Nishibori, M., and Yoshimura, Y. (2006). Expression of transforming growth factor- β isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of the hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. **Journal of Reproduction and Fertility**. 132: 781-790.
- Dekalb Inc. (2015). **Dekalb white commercial management guide**. Hendrix-ISA LLC., Ephrata, PA USA.

- Dias, T. R., Marco, G. A., Branca, M. S., and Pedro, F. O. (2014). Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 396: 37-45.
- Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Labee, C., and Blesbois, E. (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. **Theriogenology**. 61: 1-13.
- Ebeid, T. A. (2009). Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**. 50: 641-647.
- Ebeid, T. A. (2012). Vitamin E and organic selenium enhances the antioxidative status and quality of chicken semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**. 53(5): 708-714.
- Edens, F. W., and Sefton, A. E. (2009). Sel-Plex[®] improves spermatozoa morphology in broiler breedermales. **International Journal of Poultry Science**. 8(9): 853-861.
- Elkheir, S., Mohammed, M. K., Ahmed, M. M., and Abdelgadir, S. M. (2008). Effect of feed restriction and ascorbic acid supplementation on performance of broiler chicken reared under heat stress. **Research Journal of Animal and Veterinary Sciences**. 3: 1-8.
- Enting, H., Boersma, W. J., Cornelissen, J. B., van Winden, S. C., Verstegen, M. W., and van der Aar, P. J. (2007). The effect of low-density broiler breeder diets on performance and immune status of their offspring. **Poultry Science**. 86: 282-290.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**. 11(1): 81-128.
- Figuerola-Méndez, R., and Rivas-Arancibia, S. (2015). Vitamin C in health and disease: It's role in the metabolism of cells and redox state in the brain. **Frontiers in Physiology**. 6: 1-11.
- Filho, A. G., Cunha, R. M. S., Vasconcelos, P. R. L., and Guimaraes, S. B. (2014). Glutamine and ornithine alpha-ketoglutarate supplementation on malate dehydrogenases expression in hepatectomized rats. **Acta Cirurgica Brasileira**. 29(6): 366-371.
- Fouchecourt S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**. 62(6):1790-1803.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**. 15: 1583-1606.

- Gagne, A., Shu, Q. W., William, D. F., and Pierre, J. (2009). Absorption, transport, and bioavailability of vitamin E and its role in pregnant women. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**. 31(3): 210-217.
- Gautron, J., Hincke, M. T., and Nys, Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. **Connective Tissue Research**. 36: 195-210.
- Gerard, N., Fahiminiya, S., Grupen, C. G., and Nadal-Desbarats, L. (2015). Reproductive physiology and ovarian folliculogenesis examined via 1H-NMR metabolomics signatures: a comparative study of large and small follicles in three mammalian species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* and *Equus ferus caballus*). **Journal of Integrative Biology**. 19: 31-40.
- Ghazi, H. S., Habibiyan, M., Moeini, M. M., and Abdolmohammadi, A. R. (2012). Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. **Biological Trace Element Research**. 148: 322-330.
- Gherraf, N., Ladjei, S., Labeled, B., and Hameurlaine, S. (2011). Evaluation of antioxidant potential of various extracts of *Traganum Nudatum* Del. **Plant Science**. 1(9): 155-159.
- Ghonim, A. I. A., Awad, A. L., Elkloub, K., and Moustafa, M. E. (2010). Effect of feeding different levels of energy and crude protein on semen quality and fertility of Domyati ducks. **Egyptian Poultry Science Journal**. 30(2): 583-600.
- Gjorgovska, N., Filev, K., Levkov, V., and Kostadinov, T. (2012). The effect of different levels of selenium in feed on egg production, egg quality and selenium content in yolk. **Lucrari Stiintifice - Seria Zootehnie**. 58: 270-273.
- Gregory, A., Barding, J., Salditos, R., and Larive, C. K. (2012). Quantitative NMR for bioanalysis and metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 404: 1165-117.
- Grotto, D., Lucas, S. M., Juliana, V., Clovis, P., Gabriela, S., and Solange, C. G. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quimica Nova**. 32(1): 169-174.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1999). **Free radicals in biology and medicines**. 3rd Edition. Oxford University Press. Oxford.

- Hanafy, M. M., El-Sheikh, A. M. H., and Abdalla, E. A. (2009). The effect of organic selenium supplementation on productive and physiological performance in a local strain of chicken. **Egyptian Poultry Science Journal**. 29(4): 1061-1084.
- Hassan, R. A., El-Samra, H. A. A. E., Ismail, F. S. A., and Gaber, E. O. Z. (2013). Efficacy of dietary vitamin C, E and their combination on egg production and egg quality of Dokki-4 laying hens during Egyptian summer season. **Journal of Animal and Poultry Sciences**. 4(1): 37-48.
- Hassan, S., Hakkarainen, J., Lindberg, P., and Sankari, S. (1988). Comparative effect of dietary sodium selenite on whole blood and plasma selenium and glutathione peroxidase in the chick. **Nutrition Reports International**. Int. 38.
- Hassan, M. S. H., Youssef, S. F., and El-bahy, N. M. A. (2011). Effects of l-carnitine and ascorbic acid supplementation on productive, reproductive, physiological and immunological performance of golden montazah laying hen. **Egyptian Poultry Science Journal**. 31(2): 557-578.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., and Storey, M. B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 120: 437-448.
- Higuchi, I. (2014). Wheat and rice in disease prevention and health benefits, risks and mechanisms of whole grains in health promotion. Chapter 15, antioxidant properties of wheat bran against oxidative stress. pp. 181-199.
- Holm, L., Ridderstrale, Y., and Knutsson, P. G. (1996). Localization of carbonic anhydrase in the sperm storing regions of the domestic hen oviduct. **Acta Anatomica**. 156: 253-260.
- Inoue, M. (2011). **Protective mechanisms against reactive oxygen species**. Chapter 19. Department of Biochemistry and Molecular Pathology, Osaka City University Medical School, Abeno, Osaka, Japan. pp. 281-290.
- Invernizzi, G., Alessandro, A., Mariella, F., Raffaella, R., Andrea, F., Antonella, B., Vittorio, D., and Giovanni, S. (2013). Effects of inclusion of selenium-enriched yeast in the diet of laying hens on performance, eggshell quality, and selenium tissue deposition. **Italian Journal of Animal Science**. 12: 1-8.
- Ipek, A., and Dikmen, B. Y. (2014). The effects of vitamin E and vitamin C on sexual maturity body weight and hatching characteristics of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*)

- reared under heat stress. **Animal Science Papers and Reports**. 32(3): 261-268.
- Ismail, F. S. A., Mostafa, M. Y., Azzam, M. M. M., and Gorgy, M. A. L. (2016). Effect of some sources of antioxidants on the productive and reproductive performance of turkey hens. **Mansoura Journal of Animal and Poultry Production**. 7(10): 393-401.
- Jeejeebhoy, K. N. (1991). *In vivo* breath alkane as an index of lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**. 10: 191-193.
- Jena, B. P., Panda, N., Patra, R. C., Mishra, P. K., Behura, N. C., and Panigrahi, B. (2013). Supplementation of vitamin E and C reduces oxidative stress in broiler breeder hens during summer. **Food and Nutrition Sciences**. 4: 33-37.
- Ji, H., Wang, J., Guo, J., Li, Y., Lian, S., Guo, W., Yang, H., Kong, F., Zhen, L., Guo, L., and Liu, Y. (2016). Progress in the biological function of alpha-enolase. **Animal Nutrition**. 2: 12-17.
- Jiang, W., Zhang, L., and Shan, A., (2013). The effect of vitamin E on laying performance and egg quality in laying hens fed corn dried distillers grains with solubles. **Poultry Science**. 92: 2956-2964.
- Jing, C. L., Dong, X. F., Wang, Z. M., Liu, S., and Tong, J. M. (2015). Comparative study of DL-selenomethionine vs sodium selenite and seleno-yeast on antioxidant activity and selenium status in laying hens. **Poultry Science**. 94: 965-975.
- Joachim, J. A., Bello, A. P., and Trujillo, A. M. (2011). Impact of heat stress on egg quality in layer hens supplemented L-ascorbic acid and DL-tocopherol acetate. **Veterinarski arhiv**. 81(1): 119-132.
- Khan, R. U. (2011). Antioxidant and poultry semen quality. **World's Poultry Science Journal**. 67: 297-308.
- Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Selvaggi, M., Laudadio, V., and Farelli, V. (2012). Effect of ascorbic acid in heat - stressed poultry. **World's Poultry Science Journal**. 68: 477-490.
- Lake, P.E., and Ravie, O. (1987). Effect on fertility of low numbers of fowl spermatozoa in aqueous diluent or semen components of the fowl and turkey. **British Poultry Science**. 28: 75-80.
- Leeson, S., Namkung, H., Caston, L., Durosoy, S., and Schlege, P. (2008). Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broiler breeders and layer hens. **Poultry Science**. 87(12): 2605-2612.

- Leeson, S., and Summers, D. J. (2001). **Scott's Nutrition of the Chicken**. 4th Edition, University Books, Guelph.
- Leeson, S., and Summers, D. J. (2005). **Commercial Poultry Nutrition**. 3rd Edition. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Lin, H., Jiao, H. C., Buyse, J., and Decuyper, E. (2006). Strategies for preventing heat stress in poultry. **World's Poultry Science Journal**. 62: 71-86.
- Long, E. L., Sonstegard, T. S., Long, J. A., Tassell, C. P. V., and Zuelke, K. A. (2003). Serial analysis of gene expression in turkey sperm storage tubules in the presence and absence of resident sperm. **Biology of Reproduction**. 69: 469-474.
- Marinova, G., and Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the method for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. 17(1): 11-24.
- Maziar, M. A., and Zaghari, M. (2010). Does dietary vitamin E or C decrease egg yolk cholesterol?. **Biological Trace Element Research**. 138: 60-68.
- Minarik, P., Tomakova, N., Kollarova, M., and Antalík, M. (2002). Malate dehydrogenases-structure and function. **General Physiology and Biophysics**. 21(3): 257-265.
- Mistry, H. D., Pipkin, F. B., Redman, W. G., and Poston, L. (2011). Selenium in reproductive health. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 206(1): 21-30.
- Nadia, L. R., Hassan, R. A., Qota, E. M., and Fayek, H. M. (2008). Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. **Poultry Science**. 7(2): 134-150.
- Nakamura, N., Dai, Q., Williams, J., Goulding, E. H., Willis, W. D., and Brown, P. R. (2013). Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (ENO4) gene causes sperm structural defects and male infertility. **Biology of Reproduction**. 88(4): 1-12.
- National Research Council. (1994). **Nutrient Requirements of Poultry**. 9th Edition. National Academy Press, Washington, DC.
- Nicholson, J. K., Foxall, P. J. D., Spraul, M., Farrant, R. D., and Lindon, J. C. (1995). 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C nmr spectroscopy of human blood plasma. **Analytical Chemistry**. 67(5): 793-811.

- Nowaczewski, S., and Kontecka, H. (2005). Effect of dietary vitamin C supplement on reproductive performance of aviary pheasants. **Czech Journal of Animal Science**. 50(5): 208-212.
- Oke, O. E., Ladokun, S. O., and Onagbesan, O. M. (2016). Reproductive performance of layer chickens reared on deep litter system with or without access to grass or legume pasture. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 100: 229-235.
- Panda, A. K., and Cherian, G. (2014). Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in poultry. **Poultry Science**. 51: 109-117.
- Parolini, M., Khoraiuli, L., Possenti, C. D., Colombo, G., Caprioli, M., Santagostino, M., Nergadze, S. G., Milzani, A., Giulotto, E., and Saino, N. (2017). Yolk vitamin E prevents oxidative damage in gull hatchlings. **Royal Society Open Science**. 4: 1-6.
- Patra, B. K., Mohanty, D. N., Das, S. D., Das, R. K., Sahoo, G. R., Karna, D. K., and Sahoo, L. (2015). Total protein, glucose and steroid protein in the ovarian follicular fluid of buffaloes of coastal odisha. **Buffalo Bulletin**. 34(4): 423-428.
- Pavlata, L., Illek, J., and Pechova, A. (2001). Blood and tissue selenium concentrations in calves treated with inorganic or organic selenium compounds-A comparison. **Acta Veterinaria Brno**. 70:19-26.
- Pasupuleti, V. (2007). **Role of glycolysis and respiration in sperm metabolism and motility**. M.B., B.S., Kasturba Medical College, M.S., Kent State University. pp. 1-60.
- Premanand, R., Kumar, P. H. S., and Mohan, A. (2007). Study of thiobarbituric reactive substances and total reduced glutathione as indices of oxidative stress in chronic smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. **Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences**. 49: 9-12.
- Prez-Bonilla, A., Novoa, S., Garca, J., Mohiti-Asl, M., Frikha, M., and Mateos, G. G. (2012). Effects of energy concentration of the diet on productive performance and egg quality of brown egg laying hens differing in initial body weight. **Poultry Science**. 91: 3156-3166.
- Puthongsiriporn, U., Scheideler, S. E., Shell, J. L., and Beck, M. M. (2001). Effect of vitamin E and C supplementation on performance, *In Vitro* lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. **Poultry Science**. 80: 1190-1200.

- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., and Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. **British Journal of Nutrition**. 114(8): 1113-1122.
- Renema, R. A., and Robinson, F. E. (2004). Defining normal: comparison of feed restriction and full feeding of female broiler breeders. **World's Poultry Science Journal**. 60: 508-522.
- Rengaraj, D., and Hong, Y. H. (2015). Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. **International Journal of Molecular Sciences**. 16: 9910-9921.
- Ribeiro, P. A. P., Matos, J. J. B., Lara, L. J. C., Araujo, L. F. I., Albuquerque, R. I., and Baiao, N. C. (2014). Effect of dietary energy concentration on performance parameters and egg quality of white leghorn laying hens. **Braz. Poultry Science**. 16: 381-388.
- Scheideler, S. E., Weber, P., and Monsalve, D. (2010). Supplemental vitamin E and selenium effects on egg production, egg quality, and egg deposition of α -tocopherol and selenium. **The Journal of Applied Poultry Research**. 19: 354-360.
- Schmolz, L., Birringer, M., Lorkowski, S., and Wallert, M. (2016). Complexity of vitamin E metabolism. **World Journal of Biological Chemistry**. 7(1): 14-43.
- Schweigert, F. J., Luppertz, M., and Stobo, W. T. (2002). Fasting and lactation effect fat-soluble vitamin A and vitamin E levels in blood and their distribution in tissue of grey seals (*Halichoerus grypus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 13: 901-908.
- Scott, M. L. (1982). **Nutrition of the chicken**. 1st Edition. Ithaca, NY.
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J., Antunes Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Vervoort, J. M., van Hooijdonk, T. C., Zwietering, M. H., Smid, E. J., and van Valenberg, H. J. (2014). Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**. 177: 29-36.
- Sexton, T. J., and Fewlass, T. A. (1978). A new poultry semen extender 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. **Poultry Science**. 57: 277-284.
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2012). **Glutathione peroxidase cellular activity assay kit**. Sigma-Aldrich Co. LLC., Louis, USA.

- Sklan D. (1983). Effect of high vitamin A or tocopherol intake on hepatic lipid metabolism and intestinal absorption and secretion of lipids and bile acids in the chick. **British Journal of Nutrition**. 50: 409-416.
- Skrivan, M., Marounek, M., Dlouha, G., and Seucitova, S. (2008). Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. **British Journal of Nutrition**. 49: 482-486.
- Skrivan, M., Marounek, M., Englmaierova, M., and Skrivanova, V. (2013). Influence of dietary vitamin C and selenium, alone and in combination, on the performance of laying hens and quality of eggs. **Animal Science**. 58(2): 91-97.
- Spears, J. W., Grimes, J., Lloyd K., and Ward, T. L. (2003). **Efficacy of a novel organic selenium compound (zinc-l-selenomethionine, Availa Se) in broiler chicks**. In: Proceedings of the 1st Latin American Congress of Animal Nutrition. 197-198.
- Sunder, G. S., Kumar, C. V., Panda, A. K., Raju, M. V. L. N., Rama Rao, S. V., Gopinath, N. C. S., and Reddy, M. R. (2007). Restriction of metabolizable energy in broiler growers and its impact on grower and breeder performance. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. 20(8): 1258-1265.
- Surai, P. F. (2000). Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. **British Poultry Science**. 41:235-243.
- Surai, P. F. (2003). **Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction**. Nottingham University Press. Nottingham.
- Surai, P. F. (2005). **Minerals and anti-oxidants**. Anti-oxidant Research, Alltech (UK) Ltd., Stamford, Lincs.
- Surai, P. F. (2006). **Selenium in nutrition and health**. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Surai, P. F. (2016). Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase. **Journal of Animal Research and Nutrition**. 1: 1-8.
- Surai, P. F., Blesbois, E., Grasseau, I., Chalah, T., Brillard, J. P., Wishart, G. J., Cerolini, S., and Sparks, N. H. C. (1998). Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 120: 527-533.

- Surai, P. F., and Fisinin, V. I. (2014). Selenium in poultry breeder nutrition: An update. **Animal Feed Science and Technology**. 191: 1-15.
- Surai, P. F., Fisinin, V. I., and Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part I. Vitamin E, carotenoids and selenium. **Animal Nutrition**. 2: 1-11.
- Surai, P. F., Gaal, T., Noble, R. C., and Speake, B. K. (1997). The relationship between the alpha-tocopherol content of the yolk and its accumulation in the tissues of the newly hatched chick. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 75: 212-216.
- Surai, P. F., Noble, R. C., and Speake, B. K. (1999). Relationship between vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. **British Poultry Science**. 40: 406-410.
- Surai P. F., Wishart, G. J., Maldjian, A., Noble, R. C., and Sparks, N. H. (1998). Lipid peroxidation in avian semen: protective effect of seminal plasma. **British Poultry Science**. 39: 57-58.
- Toyoda, H., Himeno, S. I., and Imura, N. (1990). Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1049: 213-215.
- Urso, U. R. A., Dahlke, F., Maiorka, A., Bueno, I. J. M., Schneider, A. F., Surek, D., and Rocha, C. (2015). Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: effect on live performance, hatching process, and chick quality. **Poultry Science**. 94: 976-983.
- Vieira, S. L. (2007). Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **British Poultry Science**. 19: 1-8.
- Wang, Z. G., Pan, X. J., Zhang, W. Q., Peng, Z. Q., Zhao, R. Q., and Zhou, G. H. (2010). Methionine and selenium yeast supplementation of the maternal diets affects antioxidant activity of breeding eggs. **Poultry Science**. 89: 931-937.
- Whitehead, C. C., and Keller, T. (2003). An update on ascorbic acid in poultry. **World's Poultry Science Journal**. 59: 161-184.
- Wu, R. Q., Zhao, X. F., Wang, Z. Y., Zhou, M., and Chen, Q. M. (2011). Novel molecular events in oral carcinogenesis via integrative approaches. **Journal of Dental Research**. 9(5): 561-572.
- Yang, D., Bu, X., Zhang, N., Li, L., and Zou, X. (2016). Effects of metabolizable energy and crude protein levels on laying performance, egg quality and serum biochemical indices of Fengda-1 layers. **Animal Nutrition**. 2: 93-98.

- Yuan, D., Zhan, X., and Wang, Y. (2011). Effects of selenium sources and levels on reproductive performance and selenium retention in broiler breeder, egg, developing embryo, and 1-day-old chick. **Biological Trace Element Research**. 144: 705-714.
- Zaniboni, L., and Bakst, M. R. (2004). Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct. **Poultry Science**. 83: 1209-1212.
- Zdunczyk, Z., Drazbo, A., Jankowski, J., Juskiewicz, J., Czech, A., and Antoszkiewicz, Z. (2013). The effect of different dietary levels of vitamin E and selenium on antioxidant status and immunological markers in serum of laying hens. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. 16(2): 333-339.
- Zhou, S. L., Li, M. Z., Li, Q. J., Guan, J. Q., and Li, X. W. (2012). Differential expression analysis of porcine MDH1, MDH2 and ME1 genes in adipose tissues. **Genetics and Molecular Research**. 11(2): 1254-1259.
- Ziaei, N., Moradi kor, N., and Esfandiari Pour, E. (2013). The effects of different levels of vitamin E and organic selenium on performance and immune response of laying hens. **African Journal of Biotechnology**. 12(24): 3884-3890.



ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการดำเนินงานการเก็บตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดง

1. การเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ (uterus fluid)

การเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่จะเก็บหลังจากแม่ไก่วางไข่แล้ว 10 ชั่วโมง หรือเก็บเมื่อไข่เคลื่อนตัวมาตั้งแต่ปากแตรจนมาถึงต่อมสร้างเปลือกไข่ ณ ชั่วโมงที่ 10 ของกระบวนการสร้างไข่

วัสดุและอุปกรณ์

1. กรวยกรองแก้วขนาด 62 มิลลิเมตร
2. หลอดทดลองพลาสติก
3. Eppendorf tube
4. กระจบอกน้ำกลั่น
5. Micropipette
6. เข็มอินซูลิน
7. กระดาษชำระ
8. Heat box

สารเคมี

1. Normal saline solution
2. ฮอร์โมนโพรสตาแกลนดิน (Lutalyse™)
3. Phosphate buffer saline 2X
4. Laemmli buffer 5X

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย laemmli buffer 5X โดยเตรียมสารละลาย trizma ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยชั่ง trizma 1.8 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรจนสารละลายแล้วใช้ HCl ความเข้มข้น 3.12 มิลลิโมลาร์ ปรับค่า pH เท่ากับ 6.8 โดยการไตเตท ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้น นำสารละลาย trizma ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 6.8 ที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวผสมกับ glycerol ปริมาณ 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.74 มิลลิลิตร และ sodium dodecyl sulfate 1 กรัมผสมให้เข้ากันแล้วเติม bromophenol blue sodium salt เพียงเล็กน้อยจนจน

สารละลาย หลังจากนั้นเติม β -mercaptoethanol ปริมาณ 1.25 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน(ปริมาณสารละลายในหลอดพลาสติกฝาเกลียวทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร) นำไปเก็บไว้ที่ -20°C

2. Phosphate buffer saline 2X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้ phosphate buffer saline จำนวน 2 เม็ด ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเก็บไว้ที่ 4°C

ขั้นตอนการเก็บของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

1. เช้าระยะเวลาของไข่ที่ 10 ชั่วโมงภายในต่อมสร้างเปลือกไข่หลังจากที่แม่ไก่ออกไข่แล้ว ใช้นิ้วกลางด้านขวาสอดเข้าไปภายในท่อนำไข่ซึ่งด้านซ้ายของตัวไก่ประมาณ 1 ซ่อนิ้วมือหรือ 3 เซนติเมตร เมื่อสัมผัสกับฟองไข่ที่ 10 ชั่วโมงต้องสามารถใช้ปลายนิ้วหมุนรอบฟองไข่ เชื้อหุ้มเปลือกไข่มีลักษณะดังฟองไข่ไม่อยู่ติดจนเกินไป และไม่มีเกาะของแคลเซียม

2. เมื่อพบฟองไข่ที่ 10 ชั่วโมงแล้ว หลังจากนั้นจับแม่ไก่บนตะแกรงลงบนโต๊ะโดยหันปีกขาขึ้นด้านบน และใช้เชือกผูกตรึงบริเวณหน้าแข้งเพื่อป้องกันการดิ้น ฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน 0.1 มิลลิลิตร (ฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน 1 ส่วนมาผสมกับ normal saline solution 9 ส่วน) เข้าเส้นเลือด wing vein ดังภาพที่ ก1



ภาพที่ ก1 การฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินเข้าสู่เส้นเลือด wing vein

3. หลังจากฉีดฮอร์โมนแล้วใช้มือซ้ายจับบริเวณโคนหางแม่ไก่ และใช้มือขวากดท้องแม่ไก่เบาๆ เพื่อปลิ้นกัน แล้วใช้น้ำกลั่นฉีดเช็ดด้วยกระดาษชำระเพื่อทำความสะอาดทวารรวม (cloaca) ต้องระมัดระวังสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างของเหลวให้มากที่สุด

4. ประมาณ 2-3 นาที แม่ไก่จะแสดงอาการออกไข่ ใช้มือขวาค่อยๆ นวดบริเวณช่องท้องด้านออกมาทวารรวมให้ท่อนำไข่ส่วนปลายไหลออกมา นำกรวยแก้วขนาด 60 มิลลิเมตรสวมเข้ากับหลอดทดลองรองรับบริเวณท่อนำไข่ส่วนปลายที่ไหลออกมา หลังจากนั้นนวดกระตุ้นเร็วขึ้นจนแม่

ไก่หลังของเหลวออกมาพร้อมด้วยฟองไข่แล้วรีบหยิบไข่ออกเพื่อป้องกันไข่แตกไปปนเปื้อนกับของเหลวแสดงดังภาพ ก2



ภาพที่ ก2 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

5. นำตัวอย่างของเหลวจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf เติมสารละลาย laemlli buffer 5X จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อน 95°C ด้วย heat box หรือ water bath เป็นเวลา 3 นาที เก็บไว้ที่ -80°C เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ western blots ในส่วนตัวอย่างของเหลวสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีเตรียม โดยนำตัวอย่างเหลวผสมกับสารละลาย phosphate buffer saline 2X ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แบ่งออกเป็นหลอดๆ ตามการวิเคราะห์ที่กำหนดไว้เก็บไว้ที่ -20°C

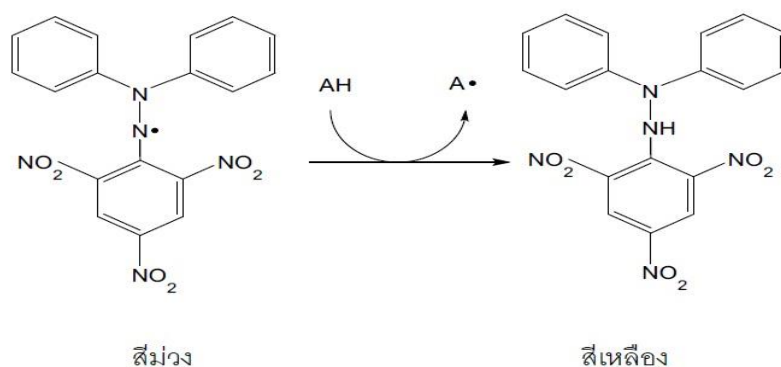
6. ในขณะที่ไข่แดงทำการแยกไข่ขาวทิ้งแล้วนำไข่แดงใส่กล่องพลาสติกเก็บไว้ที่ -20°C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์



วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

1. การวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

การวัดค่า DPPH ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ และไข่แดง เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคือ อนุมูลอิสระดีฟีพีเอช (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมทำให้สีม่วงจางลงๆ จนเป็นสีเหลือง DPPH : H (ภาพที่ ข1) การวัดผลทำโดยการนำสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (Marinova and Batchvarov, 2011)



ภาพที่ ข1 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระดีฟีพีเอชทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา: ปวีณา (2559)

1.1 การวัดค่า DPPH ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube
2. Vortex mixer
3. 96 well plate
4. Microplate spectrophotometer

5. Micropipette
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

สารเคมี

1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
2. Methanol

วิธีการทดสอบค่า DPPH

1. นำของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่ถูกผสมกับสารละลาย PBS 2X ออกจากตู้ -80°C ทำให้ละลายโดยใช้นิ้วมือสัมผัสที่หลอดแล้วเก็บไว้ในกล่องน้ำแข็ง ปิดตัวอย่างของเหลว 500 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf เดิมเมทานอล 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่อง vortex mixer
2. นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
3. จากนั้นดูดส่วนใส (supernatant) จำนวน 250 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf แล้วเติมสารละลาย 0.08 mM DPPH (ละลายในเมทานอล) 250 ไมโครลิตร ส่วน control เตรียมโดยใช้สารละลายเมทานอล 250 ไมโครลิตร และสารละลาย 0.08 mM DPPH 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำหลอดตัวอย่างและ control เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ระยะเวลาในการเก็บขึ้นอยู่กับเกิดการเกิดปฏิกิริยาโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง)
5. เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำออกจากที่มืดแล้ว ปิดตัวอย่างและ control จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ 96 well plate อย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์การความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ทำปฏิกิริยากันระหว่างตัวอย่างกับสาร DPPH เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ตามสมการของ Gherraf et al. (2011) ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

หมายเหตุ: A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง + สารละลาย DPPH

1.2 การวัดค่า DPPH ในไข่แดง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง
2. หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด
3. Eppendorf tube

4. Vortex mixer
5. 96 well plate
6. Microplate spectrophotometer
7. Micropipette
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
9. Homogenizer

สารเคมี

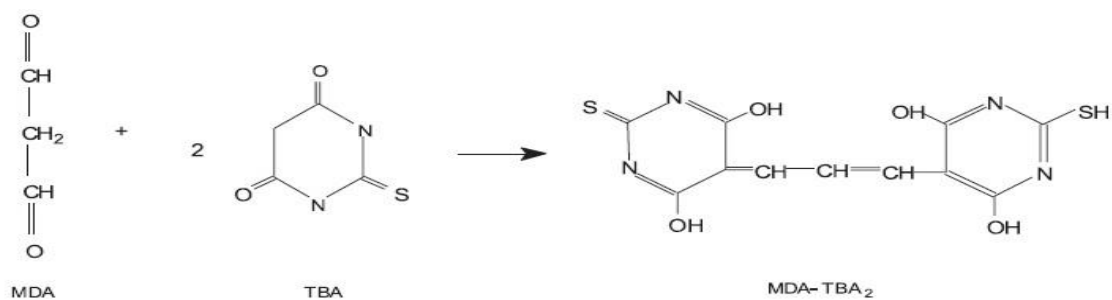
1. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
2. ethanol

วิธีการทดสอบค่า DPPH

1. นำตัวอย่างไข่แดงออกจากตู้ -20 °C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสามารถตักได้แล้ว
ซึ่งตัวอย่างไข่แดง 2.5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิตร เติมเอทานอล
10 มิลลิตรแล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer จนกระทั่งไข่แดงกับเอทานอลเข้ากัน
2. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
3. ปิเปตส่วนใส (supernatant) จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf แล้วเติม
สารละลาย 0.11 mM DPPH (ละลายในเอทานอล) 400 ไมโครลิตร ส่วน control เตรียมโดยใช้
สารละลายเอทานอล 250 ไมโครลิตร และ สารละลาย 0.11 mM DPPH (ละลายในเอทานอล) 250
ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำหลอดตัวอย่างและ control เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปิเปต
ตัวอย่าง และ control จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ 96 well plate อย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อนำไปวัดค่าดูดกลืน
แสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระตามสมการข้อ 1.1

2. การวัดค่า Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

การวัดตรวจวัดมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) assay เป็นการที่ MDA ที่เกิดขึ้นภายในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) ภายใต้สภาวะกรดและความร้อนจะกลายเป็นสารประกอบ MDA-TBA adduct ที่มีสีชมพู แสดงไว้ดังภาพที่ ข2



ภาพที่ ข2 ปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBA เป็น MDA-TBA adduct

ที่มา: Grotto et al. (2009)

2.1 การวัดค่า TBARs (Thiobarbituric acid reactive substances) ในไข่แดง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง
2. Eppendorf tube
3. หลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวขนาด
4. Eppendorf tubec
5. Vortex mixer
6. 96 well plate
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
8. Homogenizer
9. Microplate spectrophotometer
10. Water bath
11. Volumetric flask

สารเคมี

1. Thiobarbuturic acid (TBA)
2. Trichloroacetic acid (TCA)
3. Butylhydroxytuluene (BHT)
4. น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (Deionized water)
5. Malondialdehyde bis (dimethyl acetate) (MDA)

วิธีการทดสอบค่า TBARs

1. นำไข่แดงออกจากตู้ -20°C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายแล้วชั่งตัวอย่างไข่แดง 2 กรัม

ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวแล้วเติมสารละลาย BHT 7.2% จำนวน 34 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์จำนวน 6 มิลลิลิตร นำไปบดให้เข้ากันโดยเครื่อง homogenizer ประมาณ 40 วินาที

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1:2 ตัวอย่าง:สารละลาย TBA-TCA (ปริมาตร: ปริมาตร) เตรียมโดยการบีบตัวอย่างที่บดเข้ากันแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวอันใหม่แล้วเติมสารละลาย TBA-TCA (เตรียม 20 mM ในสารละลาย TCA 15%) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ปิดฝาให้เรียบร้อยแล้วนำไปใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำทิ้งไว้ในเย็นในกล่องน้ำแข็ง

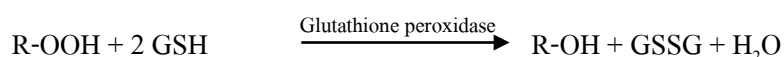
3. จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที บีบตัวอย่างส่วนใสด้านบน 200 ไมโครลิตรใส่ 96 well plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

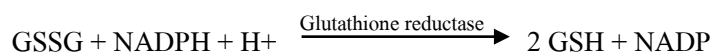
การเตรียมสารละลายมาตรฐาน MDA

สารละลายมาตรฐาน MDA ความเข้มข้น 100 นาโนโมล/มิลลิลิตร เตรียมโดยบีบสารละลายมาตรฐาน MDA จำนวน 17 ไมโครลิตรใส่ในขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (ควรเก็บไว้ในที่มืดหรือห่อฟรอยด์ไม่ให้สัมผัสแสง) เพื่อนำมาใช้เตรียมสารละลายมาตรฐาน MDA ตามระดับความเข้มข้นที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาโนโมล/มิลลิลิตร ตามตารางที่ ข1 จากนั้นบีบสารละลายมาตรฐาน MDA แต่ละความเข้มข้นจำนวน 200 ไมโครลิตรใส่หลอด eppendorf เติมสารละลาย TBA-TCA ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วบีบ 200 ไมโครลิตรใส่ 96 well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาค่า TBARS ในตัวอย่าง โดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข3

3. การวัดค่า Glutathione peroxidase enzyme (GPx)

ปฏิกิริยากำจัดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) โดยเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) จะเร่งปฏิกิริยาให้ glutathione (GSH) 2 โมเลกุล เปลี่ยนไปเป็น glutathione disulfide (GSSG) 1 โมเลกุล ในการทดลองจะวัดการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้โดยทางอ้อม คือวัดการปฏิกิริยาเปลี่ยนกลับเป็น GSH โดย GSSG จะเร่งปฏิกิริยา glutathione reductase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADPH ที่ลดลง เนื่องจาก NADPH เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็น NADP⁺ จากสมการออกซิเดชันของ NADPH เป็น NADP⁺ การลดลงของ NADPH เป็นผลมาจาก GPx โดยตรง



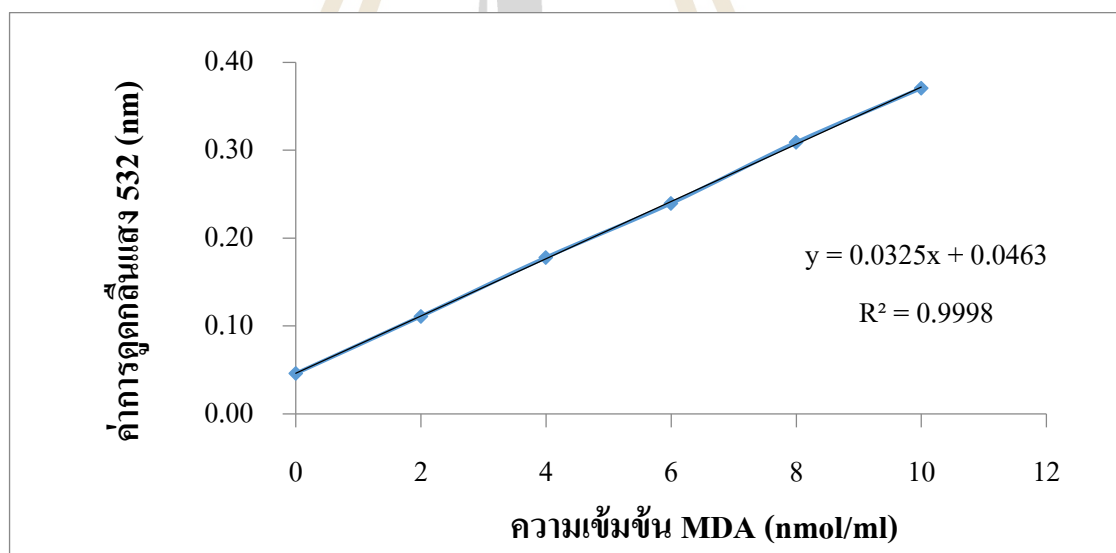


ตารางที่ ข1 วิธีการเตรียมระดับความเข้มข้นสารมาตรฐาน MDA

| Concentration (nmol) | MDA Standard (µl) | Deionized water (µl) |
|----------------------|-------------------|----------------------|
| 0 | 0 | 1000 |
| 2 | 20 | 980 |
| 4 | 40 | 960 |
| 6 | 60 | 940 |
| 8 | 80 | 920 |
| 10 | 100 | 900 |

วิธีการทำคำนวณ

ทำการอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของ Malondialdehyde bis (dimethyl acetate)



ภาพที่ ข3 กราฟมาตรฐาน MDA

3.1 การวัดค่า GPx ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

วัสดุและอุปกรณ์

1. Eppendorf tube

2. Vortex mixer
3. 96 well plate
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
5. Microplate spectrophotometer
6. Volumetric flask
7. Homogenizer

สารเคมี

1. Sodium phosphate buffer (Sigma Prod. No. S-0751)
2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma Stock No. ED4SS)
3. Sodium azide solution (Sigma Prod. No. S-2002)
4. β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH, Reduced Form, Tetrasodium Salt, Sigma Stock No. 201-201)
5. Glutathione reductase, (GR, Sigma Prod. No. G-3664)
6. Glutathione (GSH, Free Acid, Reduced Form, Sigma Prod. No. G-4251)
7. Sodium phosphate buffer (Sodium phosphate, Monobasic, Anhydrous, Sigma Prod. No. S-0751)
8. DL-Dithiothreitol (Sigma Prod. No. D-0632)
9. Glutathione Peroxidase from bovine erythrocytes (Sigma Prod. No. G6137)
10. Sodium hydroxide (NaOH)
11. Tris-HCL
12. น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (Deionized water)

วิธีการเตรียมสาร

1. สารละลาย A เตรียมจาก sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ร่วมกับ ethylenediaminetetraacetic acid ความเข้มข้น 0.40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่ง sodium phosphate buffer 600 มิลลิกรัม และ EDTA 16.65 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ ที่อุณหภูมิ 25 °C แล้วปรับ pH 7.01 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ปรับปริมาตร
2. สารละลาย B เตรียมโดย sodium azide ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ซึ่ง sodium azide 3.25 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 50 มิลลิลิตรแล้วเก็บไว้ที่ 4°C
3. สาร C ซึ่ง β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate จำนวน 1.0 มิลลิกรัมใส่ในขวด vial สีชาขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายบัพเฟอร์ D เอนไซม์ glutathione reductase ความเข้มข้น 100 หน่วย/มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา ละลายด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์เย็น 4°C แล้วเก็บไว้ที่ 4°C

5. สารละลาย E Glutathione ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่ง glutathione 307 มิลลิกรัม ในขวดสีชาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ เก็บไว้ที่ 4°C

6. สารละลาย F เตรียมจาก sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ DL-Dithiothreitol ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่ง sodium phosphate buffer 120 มิลลิกรัม และ DL-Dithiothreitol 15.43 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์และปรับ pH ที่ 7.01 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นดีไอโอไนซ์นำไปเก็บไว้ที่ 4°C

7. สารละลาย G เอนไซม์ glutathione Peroxidase, GPx ความเข้มข้น 3 หน่วย/มิลลิลิตร เตรียมโดยเปิดสารละลาย F จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมลงในขวด Glutathione Peroxidase เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายที่ความเข้มข้น 100 Unit/ml เพื่อเป็น stock กลาง (เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นเปิดเอนไซม์ GPx จาก stock กลางจำนวน 30 ไมโครลิตรใส่ลงในขวดสีชาขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย F จำนวน 970 ไมโครลิตรปิดฝาเขย่าให้เข้ากันจะได้เอนไซม์ GPx ที่ความเข้มข้น 3 หน่วย/มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่ -20°C ควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์

8. สารละลาย H เตรียม Hydrogen Peroxide (H_2O_2 , 30%, w/w) ความเข้มข้น 0.042% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เปิด 7 ไมโครลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 4,993 ไมโครลิตร

9. สารละลาย Reagent cocktail เตรียมโดยทำการเปิดสารละลาย B จำนวน 9.20 มิลลิลิตร สารละลาย D จำนวน 0.10 มิลลิลิตร และสารละลาย E จำนวน 0.05 มิลลิลิตรใส่ในขวดสารละลาย C ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วยใช้ NaOH หรือ HCL ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดและอุณหภูมิที่ 4°C

วิธีการทดสอบ

1. นำตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่ผสมอยู่กับ PBS 2X ออกจากตู้ -80°C ในกล่องน้ำแข็งทำให้ตัวอย่างละลายโดยใช้นิ้วมือหมุนสัมผัสรอบหลอดจนละลายใช้ syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร กรองตัวอย่างของเหลวใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่แช่ในกล่องเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์

2. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาได้แบ่งหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ออกเป็นหลอด Test, Blank และ Control โดยใส่ตัวอย่างและสารละลายตามตารางที่ ข2 ดังนี้

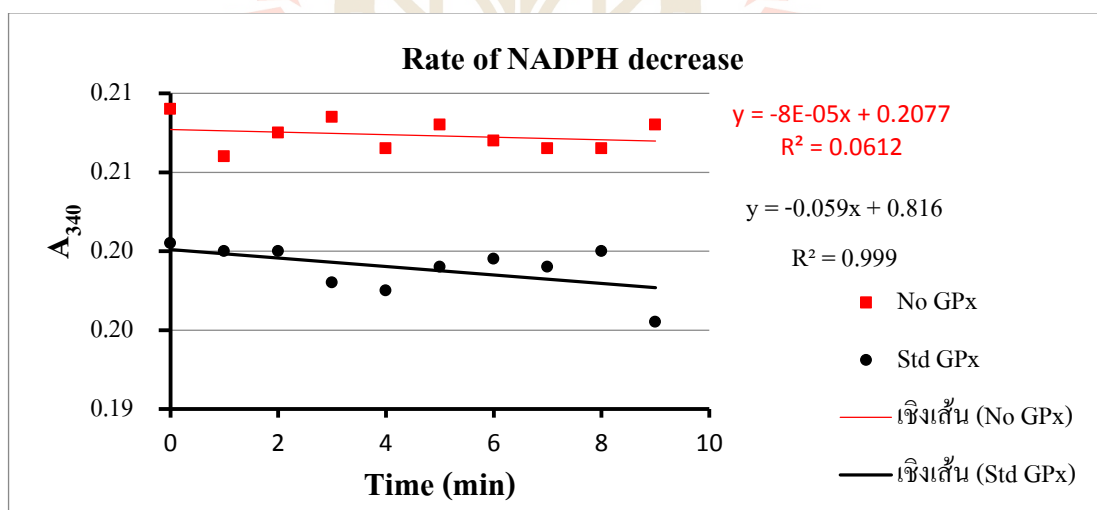
ตารางที่ ข2 วิธีการเติมสารละลายในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่

| | หลอด Test | หลอด Blank | หลอด Control |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| สารละลาย Reagent cocktail | 40 μ l | 40 μ l | 40 μ l |
| สารละลาย F | 250 μ l | 250 μ l | 430 μ l |
| ตัวอย่างของเหลว (uterus fluid) | 180 μ l | - | - |
| สารละลาย G (GPx) | - | 180 μ l | - |

3. เมื่อผสมสารละลายตามตารางเรียบร้อยแล้วเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นปิดสารในแต่หลอด Test, Blank และ Control ใส่ลงในถาดหลุม 96 well plats หลอดละ 2 ซ้ำจนครบ

4. จากนั้นเติมสารละลาย H (H_2O_2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่อง automatic pipette เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพร้อมกัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยทันทีที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยวัดผลค่าดูดกลืนแสงทุกๆ 1 นาทีเป็นระยะเวลา 10 นาที (Kinetic)

5. นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จของ Trevigen's HT glutathione peroxidase assay kit โดยกราฟมาตรฐานสร้างจากค่าดูดกลืนแสงของหลอด Blank ที่ได้เอนไซม์ GPx และหลอด Control ที่ไม่ได้เอนไซม์ GPx ตามภาพที่ ข4 เพื่อใช้คำนวณเปรียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ GPx ในตัวอย่างจากค่าดูดกลืนแสง



ภาพที่ ข4 กราฟมาตรฐานของกิจกรรมเอนไซม์ GPx

3.2 การวัดค่า GPx ในไข่แดง

เตรียมสารละลายเหมือนกันกับวิธีการวัด GPx ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือก

วิธีการทดสอบ

1. ทำการสกัดตัวอย่างไข่แดงโดยชั่งนำตัวอย่างไข่แดง 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว เติมสารละลาย Tric-HCL ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer แล้วนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
2. จากนั้นนำส่วนใสด้านบนมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการกรองมาใช้ในการวิเคราะห์
3. ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาได้แบ่งหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ออกเป็นหลอด Test, Blank และ Control โดยใส่ตัวอย่างและสารละลายดังตารางต่อไปนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 วิธีการเติมสารละลายในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาในไข่แดง

| | หลอด Test | หลอด Blank | หลอด Control |
|---------------------------|-------------|-------------|--------------|
| สารละลาย Reagent cocktail | 40 μ l | 40 μ l | 40 μ l |
| สารละลาย F | 280 μ l | 280 μ l | 430 μ l |
| ตัวอย่างไข่แดงที่สกัดแล้ว | 150 μ l | - | - |
| สารละลาย G (GPx) | - | 150 μ l | - |

4. เมื่อผสมสารละลายตามตารางเรียบร้อยแล้วเขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเปิดสารในแต่ละหลอด Test, Blank และ Control ใส่ลงในถาดหลุม 96 well plats หลอดละ 2 ซ้ำจนครบ
5. จากนั้นเติมสารละลาย H (H_2O_2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่อง automatic pipette เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพร้อมกัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยทันทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยวัดผลค่าดูดกลืนแสงทุกๆ 1 นาทีเป็นระยะเวลา 10 นาที (Kinetic)
6. นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จของ Trevigen's HT glutathione peroxidase assay kit

4. วิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีนในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ด้วยวิธี BSA

Protein Assay Kits

1. นำตัวอย่างของเหลวที่ผสมกับ PBS 2X ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. ปิเปตตัวอย่างเฉพาะส่วนใสจำนวน 10 ไมโครลิตรใส่ใน 96 well plate หลังจากนั้นเติมสารละลาย Reagent (0.5 ml Reagent B + 25 ml Reagent A) 200 ไมโครลิตร
3. เตรียมสารมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin, BSA) ตามตารางที่ ข4

ตารางที่ ข4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

| Tube | Cone. (mg/ml) | BSA 2 mg/ml (µl) | น้ำกลั่นหรือ PBS (µl) |
|------|---------------|------------------|-----------------------|
| 1 | 0 | - | - |
| 2 | 0.05 | 5 | 195 |
| 3 | 0.1 | 10 | 190 |
| 4 | 0.25 | 25 | 175 |
| 5 | 0.5 | 30 | 90 |
| 6 | 1 | 60 | 60 |
| 7 | 1.5 | 90 | 30 |
| 8 | 2 | - | - |

4. นำสารมาตรฐาน BSA ในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 10 ไมโครลิตรไมโครลิตรลงใน 96 well plate หลังจากนั้นเติมสารละลาย Reagent (A+B) จำนวน 200 ไมโครลิตรเช่นเดียวกับตัวอย่าง

5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ช่วงแสง 550 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานจากค่าดูดกลืนแสงสารมาตรฐาน BSA และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

5. การวัดการแสดงออกของโปรตีน Enolase 1, (ENO1); Superoxide Dismutase 1, (SOD1) และ Malate Dehydrogenase1, (MDH1) ในของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ด้วยวิธี Western blots

ใช้ตัวอย่างของเหลวจากต่อมสร้างเปลือกไข่ที่ผสมกับ laemmli buffer 5X จากแม่ไก่จำนวน 5 ตัวในกลุ่มทดลองเดียวกันนำมาผสมรวมกันโดยมีระดับความเข้มข้นโปรตีน 10 มิลลิกรัมต่อปริมาณ

ไม่เกิน 60 มิลลิลิตร (ใช้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อ 4 ในการคำนวณ) เพื่อใช้ตัวอย่างสำหรับรันเจล

วิธีการเตรียมสาร

1. สารละลาย solution L2X ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เตรียมจากชั่ง Tris base (3 โมลาร์) 18.15 กรัม ร่วมกับ Sodium dodecyl sulfate (0.8%) 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับ pH เท่ากับ 8.8 ด้วย HCL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำมากรอกด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่ 4°C

2. สารละลาย solution M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชั่ง Tris base (0.5 M) 3 กรัม ร่วมกับ Sodium dodecyl sulfate (0.4%) 0.2 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งละลายแล้วปรับ pH เท่ากับ 6.3 ด้วย HCL จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร

3. สารละลาย electrophoresis buffer 10X (ความเข้มข้น 10 เท่า) ปริมาตร 2 ลิตร ชั่ง Tris base (0.25 M) 60.4 กรัม ร่วมกับ Glycine (1.9 M) 288 กรัม และ Sodium dodecyl sulfate (0.8%) 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับ pH เท่ากับ 8.5-9 ด้วย HCL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำมากรอกด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เมื่อต้องการใช้ควรเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 เท่า หรือ electrophoresis buffer 1X โดยเจือจางในอัตราส่วน 1:9 ปริมาณ:ปริมาณ (1 ส่วน electrophoresis buffer 10X ใน 9 ส่วนน้ำกลั่น)

4. สารละลาย wet transfer buffer ปริมาตร 1 ลิตร ชั่ง Tris base (0.25 M) 3 กรัม ร่วมกับ Glycine (1.9 M) 14.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตรแล้วเติม ethanol 200 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 8.3 ด้วย HCL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่ 4°C

5. สารละลาย TBS Tween 10X ปริมาตร 2 ลิตร เตรียมจาก ชั่ง Tris base (0.1 M) 24 กรัม ร่วมกับ NaCl (1.99 M) 174 กรัม และ Tween 20 (0.5%) 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 1.5 ลิตร ผสมให้ละลายแล้วปรับ pH เท่ากับ 7.3 ด้วย HCL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เมื่อต้องการใช้ควรเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 เท่า หรือ TBS Tween 1X โดยเจือจางในอัตราส่วน 1:9 ปริมาณ:ปริมาณ (1 ส่วน TBS Tween 10X ใน 9 ส่วนน้ำกลั่น)

6. สีย้อม Rouge Ponceau 10X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการชั่ง Ponceau S (2%) 2 กรัม ร่วมกับ TCA (30%) 30 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ขณะใช้ควรเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 เท่า (Rouge Ponceau 1X)

7. สารละลาย Nonfat-dried milk bovine ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่ง Nonfat-dried milk bovine จำนวน 5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย TBS Tween 1X เก็บไว้ที่ 4°C

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis เตรียมเจลขนาด 1.5 มิลลิเมตร โดยให้มีระดับความเข้มข้นของ polyacrylamide gel 8-16% โดยเตรียมจาก Separating gel 8% และ Separating gel 16% และเติม Stacking gel ตามวิธีการเตรียมดังตารางที่ ข5 และ ข6

ตารางที่ ข5 ส่วนประกอบของ Separating gel 8% และ 16%

| ส่วนประกอบ separating gel สำหรับ 2 เจล | Separating gel 8% | Separating gel 16% |
|--|-------------------|--------------------|
| Solution L2X (ml) | 1 | 1 |
| Acrylamide 30% (ml) | 2.2 | 4.4 |
| Glycerol (ml) | 0 | 1.7 |
| น้ำกลั่น (ml) | 5 | 1.1 |
| Ammonium persulfate 10% (μ l) | 33.2 | 33.2 |
| Temed (μ l) | 6.6 | 6.6 |
| Total value | 8.3 | 8.3 |

ตารางที่ ข6 ส่วนประกอบของ stacking gel

| ส่วนประกอบ stacking gel 2 เจล | Stacking gel |
|------------------------------------|--------------|
| Solution M (ml) | 1.25 |
| Acrylamide 30% (ml) | 0.75 |
| น้ำกลั่น (ml) | 3 |
| Ammonium persulfate 10% (μ l) | 50 |
| Temed (μ l) | 5 |

1. เมื่อเตรียมเจลเสร็จแล้วทำการประกอบอุปกรณ์ electrophoresis สำหรับรันเจลเติมสารละลาย electrophoresis buffer 1X แล้วเปิดตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุมเจล ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

2. จากนั้นนำแผ่นเจลมาทำการย้ายโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ด้วยวิธี wet blotting เตรียมโดยนำแผ่นเจลวางบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้ววางประกบด้วยกระดาษกรองและ medium well ที่แช่สารละลาย wet transfer buffer มาแล้วทั้งสองด้าน จากนั้น

ประกอบเข้ากับชุด blot transfer system แล้วเติมสารละลาย wet transfer buffer เพิ่ม ทำการย้ายโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 155 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที (ระหว่างการรันควรใส่น้ำแข็งเพื่อป้องกันโปรตีนเสียสภาพ)

3. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสออกจากระบบ blot transfer system แล้วย้อมสีด้วย Rouge Ponceau 1X โดยเติม Rouge Ponceau 1X ให้ท่วมแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ 5 นาที โดยการวางไว้บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้งแล้วจึงนำมาสแกนด้วยเครื่อง western blot scanner

4. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่อุณหภูมิต่ำ ด้วย TBS Tween 1X 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บนเครื่องเขย่าเพื่อล้างสีออก แล้วบ่มด้วยสารละลาย Nonfat-dried milk bovine 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. บ่มแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย primary antibody ที่มีความจำเพาะได้แก่ ENO1, SOD1 และ MDH1 ในอัตราส่วนเจือจาง 1:1,000 (ใน 5% milk in TBST 1X) โดยใส่แผ่น ไนโตรเซลลูโลส 1 ลงในช่องพลาสติกแล้วเติม primary antibody 5 มิลลิลิตรผึ่งให้เรียบโดยสังเกตไม่ให้มีฟองอากาศและแผ่นไนโตรเซลลูโลสเคลือบด้วย primary antibody เท่ากันทั้งแผ่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

6. หลังจากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBS Tween 1X จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บนเครื่องเขย่า (agitation) ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อกำจัด primary antibody ควรแยกกล่องล้างตามชนิดของ antibody

7. นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ล้างเสร็จแล้วมาบ่มด้วย secondary antibody คือ goat anti rabbit ในอัตราส่วนเจือจาง 1:5,000 (ใน 5% milk in TBST 1x) จำนวน 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1-1.30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลส 3 ครั้งด้วย TBS Tween 1X

8. ถ่ายภาพการแสดงผลออกโปรตีนที่จำเพาะโดยเติมสารละลาย western blotting detection reagent (1:1, Solution A:Solution B) จำนวน 1 มิลลิลิตรให้เคลือบผิวหน้าของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็นเวลา 2 นาทีแล้วนำไปถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation system ทำการเปรียบเทียบตำแหน่งน้ำหนักริโบโซมของ primary antibody กับน้ำหนักริโบโซมของตัวอย่างที่แสดงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วใช้โปรแกรมวัดปริมาณความเข้มของโปรตีนที่แสดงออก

ประวัติผู้เขียน

นายพรพล พะศรี เกิดวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดลพบุรี เริ่มศึกษาระดับ
ระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนวัดโคกโพธิ์กฤษ และศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนวินิตศึกษา
ในพระราชูปถัมภ์ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี เข้า
ศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะสัตวศาสตร์และ
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จ
การศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2554 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนัก
วิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2557

