การแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme ต่อการสะสมของกรดไขมันในเนื้อไก่โคราช

นายวิชพัฒน์ นามบัณฑิต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2560

EXPRESSION OF GROUP OF GENE INVOLVED WITH ANTIOXIDANT ENZYME ON ACCUMULATION OF FATTY ACID IN MEAT OF KORAT CHICKEN

Witchapat Nambundit

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 2016

การแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme ต่อการสะสมของกรดไขมันในเนื้อไก่โคราช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)
ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
กรรมการ

(รศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ

(ผศ. น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
กรรมการ

(ศ. ดร.สันติ แม้นศิริ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิชพัฒน์ นามบัณฑิต : การแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme ต่อการสะสมของกรดไขมันในเนื้อไก่โคราช (EXPRESSION OF GROUP OF GENE INVOLVED WITH ANTIOXIDANT ENZYME ON ACCUMULATION OF FATTY ACID IN MEAT OF KORAT CHICKEN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ โมพี, 48 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริม curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ในอาหารไก่ ต่อการแสดงออกของยีน Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*) และ catalase (*CAT*) ต่อการเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ และการเกิด oxidation (Thio barbituric acid reactive substance; TBARS) โดยใช้ไก่เนื้อโคราช 480 ตัว แบบคละเพศ เมื่อไก่มีอายุ 21 วัน สุ่มไก่เข้าการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มการทดลองมี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว กลุ่มการทดลองที่ 1 เป็น Control ใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็น Positive control ใช้อาหารพื้นฐานที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% และ Vitamin E 200 mg/kg กลุ่มที่ 3, 4, 5, และ 6 ใช้อาหารพื้นฐานที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% ร่วมกับสาร Curcumin Removed Turmeric Oleoresin (Curcuminoid) ที่ 20, 40, 60 และ 80 mg/kg ตามลำดับ เมื่อไก่อายุ 12 สัปดาห์ สุ่มไก่ 8 ตัวต่อ 1 กลุ่มการทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมีย เก็บตัวอย่างตับ และเนื้ออก ทดสอบนัยสำคัญของอิทธิพลเนื่องจากอาหารที่แตกต่างกันต่อระดับของการแสดงออกของยีน *SOD*, *CAT* และ *GPX* ระดับกรดไขมัน n-3 PUFA และระดับ TBARS ในเนื้อไก่ด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี TUKEY และหาความสัมพันธ์ของ Antioxidant enzyme gene ทั้งในเนื้อ และตับ, Fatty acid Profile, TBARS ด้วยวิธี correlation กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha \leq 0.05$ ผลการศึกษาพบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง Antioxidant enzyme, กรดไขมัน n-3 PUFA และค่า TBARS จากผลการศึกษาการหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง Antioxidant enzyme, กรดไขมัน n-3 PUFA และค่า TBARS พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของยีน *SOD* และ *GPX* กับกรดไขมัน C20:5n3 P-Value = 0.035 และ0.027 ตามลำดับ พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของยีนของ *SOD* และ *GPX* ในเนื้อ P-Value = 0.025 ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ผลการศึกษาไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่กำหนดไว้ กล่าวคือ curcuminoid ที่เสริมลงในอาหารในระดับที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ควบคุมการสร้าง antioxidant enzyme, การสะสมของ fatty acid ในเนื้อ, ระดับของ TBARS ในเนื้อ อย่างไรก็ตาม จากการอภิปรายผล พบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่เป็นไป

ตามสมมติฐาน กล่าวคือ ระดับของน้ำมัน Tuna ที่เสริมในอาหาร สภาพแวดล้อมในการทดลอง และสายพันธุ์ของไก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา วิชชุพัฒน์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

WITCHAPAT NAMBUNDIT : EXPRESSION OF GROUP OF GENE INVOLVED WITH ANTIOXIDANT ENZYME ON ACCUMULATION OF FATTY ACID IN MEAT OF KORAT CHICKEN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMORAT MOLEE, Ph.D., 48 PP.

ANTIOXIDANT ENZYME/GENE EXPRESSION/N-3 PUFA/CHICKEN MEAT

The current study aimed to investigate the effect of dietary curcuminoids combined with tuna oil on the expression of antioxidant enzyme genes composed of superoxide dismutase (*SOD*), glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) gene, n-3 PUFA accumulation, and oxidation occurrence (Thio barbituric acid reactive substance; TBARS). Four hundred and eighty mixed sex Korat chickens were used for the experiment. When the age of the chickens reached 21 days, they were drawn into the experimental cage, Completely Randomized Design (CRD) was applied. There were 6 experimental groups, 4 replications per group, and 20 chickens per replication. Six experimental diets composed with negative control (4% Tuna oil; cont.), positive control diet was supplemented with vitamin E at 200 mg/kg in basal diet (E-200) and other treatments were added along with curcumin removed turmeric oleoresin (CRTO) into the basal diet at 20, 40, 60 and 80 ppm curcuminoids, respectively. At the age of 12 weeks, 4 male and 4 female chickens per group were drawn and slaughtered, and their liver tissue and breast meat tissue were collected. Analysis of variance (ANOVA) was applied for testing the significant effects of the different diets on the expression of antioxidant genes, level of fatty acid profile in meat, and TBARS in meat; TURKEY was used for testing the significant differences between means. The relationship

between the expression of antioxidant genes and fatty acid accumulation, between the expression and TBARS, between the expression in the meat and liver, and between genes were analyzed by correlation. The level of significance was $\alpha \leq 0.05$. The current results found no significant effects of the different diets on the expression of antioxidant genes, fatty acid accumulation, and level of TBARS. Regarding the relationship analysis, the expressions of *SOD* and *GPX* had a significant relationship with C20:5n3 (*P*-Value = 0.035, 0.027, respectively). The current results were unaligned with the hypotheses of this study which stated that the expression of antioxidant genes would be affected by different levels of curcuminoids supplemented in the chicken diet. Moreover, when the function of the genes are impacted by the diet and different fatty acid accumulation, then TBARS in meat should also be impacted. However, based on the results and earlier discussion, it was found that there were some possible factors that may affect the results, namely the level of supplementation of tuna oil, the environment of the experiment, and the genetics of the chicken.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology Student's Signature Nitchapat

Academic Year 2017 Advisor' Signature

Co-advisor's Signature W. Molee

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัยจากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาช่วยแก้ปัญหาในทุกด้าน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง รองศาสตราจารย์สุรินทร บุญอนันธนสาร และ อ.ดร.วิทธวัช โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ให้คำแนะนำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัยและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ แพงคำ และผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์ อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สละเวลาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณทุนกิตติบัณฑิต ศูนย์วิจัยไก่โคราช และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่และน้องนักศึกษาบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิตการเรียนระดับบัณฑิตศึกษา

วิชพัฒน์ นามบัณฑิต

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 สมมติฐานของการวิจัย 3

1.4 ขอบเขตการวิจัย 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย 3

2 ปริทัศน์และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไกลไกการสะสม n-3 PUFA ในเนื้อ 4

2.1.1 การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ต่อประสิทธิภาพการผลิต 4

2.2 ระบบ Antioxidant System 7

2.2.1 กลไกการทำงานของ Superoxide Dismutase: SOD 9

2.2.2 กลไกการทำงานของ Glutathione Peroxidase: GPX 10

2.2.3 กลไกการทำงานของ Catalase: CAT 12

2.3 สาร Curcumin 13

3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วิธีดำเนินการวิจัยและการเก็บข้อมูล 16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.1 สัตว์ทดลอง และการจัดการสัตว์ทดลอง 16
3.1.2 แผนการทดลอง 16
3.1.3 ค่าสังเกตที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐาน 17
3.2 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ 19
3.2.1 การศึกษาระดับของ Gene Expression 19
3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อสกัด Total RNA 19
3.2.1.2 การสกัด Total RNA 19
3.2.1.3 การสังเคราะห์ First stand cDNA 20
3.2.1.4 ระดับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน (*SOD*, *CAT*, *GPX*) 21
3.2.1.5 การทำ Lipid Analysis โดยการใช้ Gas chromatography 21
3.2.1.6 การหาค่า TBAR (Thiobarbituric acid reactive substances) ในเนื้อ 22
3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 22

4 ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล 24
4.2 ผลการศึกษาผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil 24
4.2.1 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการสะสมกรดไขมันในเนื้อไก่ 24
4.2.2 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อค่า Thio barbituric acid reactive substance, TBAR ในเนื้อไก่ 27
4.2.3 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน 28
4.3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes กรดไขมัน n-3 PUFA และ ค่า TBAR 29
4.3.1 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes กรดไขมัน n-3 PUFA 30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes และค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBAR) ในเนื้อ....32
4.3.3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant enzyme genes และระหว่างการแสดงออกในเนื้อ และตับ....33
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุป....36
5.2 ข้อเสนอแนะ....36
รายการอ้างอิง....38
ภาคผนวก....45
ประวัติผู้เขียน....48

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ตารางแสดงผลของการเสริมแหล่งกรดไขมันต่างๆ ที่มีผลต่อค่าการเจริญเติบโตของไก่ 6

2.2 ตารางแสดงผลของการเสริมสาร Curcumin ต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ยีนในสัตว์ 14

3.1 สูตรอาหารในการเลี้ยงไก่อายุ อายุ 0-21 วัน 17

3.2 สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่อายุ 22-84 วัน 18

3.3 ไพรเมอร์ ที่ใช้สำหรับเทคนิค Real time-PCRของยีน *SOD CAT* และยีน *GPX* 21

4.1 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อปริมาณกรดไขมันในเนื้อไก่ 26

4.2 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ*GPX* ใน เนื้อและตับของไก่ 28

4.3 ความสัมพันธ์ของกรดไขมันที่สะสมในเนื้อกับการแสดงออกของยีน SOD CAT และ GPX ในตับและในเนื้อ 31

4.4 แสดงความสัมพันธ์ของค่าที่แสดงถึงปฏิกิริยาการเกิด Oxidation (TBAR) ในเนื้อกับการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ในตับ 32

4.5 แสดงความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant Enzyme ยีนในตับและในเนื้อ 34

4.6 แสดงความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant Enzyme ยีนในตับและ Antioxidant Enzyme ยีนในเนื้อ 34

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของ α-linolenic acid,18:3n3 4

2.2 การสังเคราะห์กรดไขมันที่มีต้นกำเนิดมาจาก n-3 และ n-6 แหล่งที่มาของกรดไขมัน รวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และการป้องกันการเกิดโรค 5

2.3 บทบาทหน้าที่การทำงานของ Antioxidant enzyme 8

2.4 แสดงการเกิด Lipid peroxide 9

2.5 บทบาทหน้าที่ทำงานของ Superoxide Dismutase: *SOD* 10

2.6 บทบาทหน้าที่ทำงานของ Glutathione Peroxidase: GPX 11

2.7 การบทบาทหน้าที่ทำงานของ Catalase: *CAT* 12

2.8 โครงสร้างของสาร Curcumin 13

4.1 ผลของค่าที่แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อ (Meat TBAR) 27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SOD	=	Superoxide dismutase
CAT	=	Catalase
GPX	=	Glutathione peroxidase
n-3 PUFA	=	n-3 Poly Unsaturated Fatty acid
TBARS	=	Thio barbituric acid reactive substance
ALA	=	α-Linolenic acid
EPA	=	Eicosapentaenoic acid
DHA	=	Docosahexaenoic acid
CRTO	=	Curcumin removed turmeric oleoresin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ไก่เพื่อตอบความต้องการของผู้บริโภคและสร้างจุดต่างในด้านของคุณภาพเนื้อ จะทำให้สายพันธุ์ไก่ที่พัฒนาขึ้นสามารถเข้าสู่และดำรงอยู่ในตลาดระดับบนได้อย่างเข้มแข็ง

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับการรักษาสุขภาพและอาหารที่มีประโยชน์เพิ่มมากขึ้น การทำให้เนื้อไก่มีส่วนประกอบของกรดไขมันประเภท n-3 PUFA ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) จะเป็นการทำให้เนื้อไก่มีจุดต่างและสามารถทำให้เนื้อไก่เป็นเนื้อเพื่อสุขภาพได้ เนื่องจากกรดไขมันในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA เป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านต่างๆ เช่น ป้องกันโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (C. Wang et al., 2006) ป้องกันการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก (Aronson et al., 2001) โรคไขข้ออักเสบ (Berbert, Kondo, Almendra, Matsuo, and Dichi, 2005)

ดังนั้นการพัฒนาพันธุกรรมของไก่ให้มีการสะสมกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA ในเนื้อได้ดีขึ้นและจะเป็นจุดเปลี่ยนสำคัญ สำหรับการปรับปรุงพันธุ์โดยเน้นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค และถ้าประสบความสำเร็จจะเป็นการสร้างความสามารถในการแข่งขันให้กับผู้ประกอบการในธุรกิจจำหน่ายพันธุ์ไก่

การปรับปรุงพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยการคัดเลือกสัตว์โดยใช้ค่าจากลักษณะที่ปรากฏเพื่อไปประเมินค่าทางพันธุกรรมเพื่อการคัดเลือก หรือการคัดเลือกจากยีนเครื่องหมาย เป็นกระบวนการที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวจะมีข้อจำกัดว่าการพัฒนาให้ลักษณะที่ต้องการดีขึ้นด้วยพันธุกรรม สัตว์จะแสดงลักษณะนั้นได้ดีเท่าที่พันธุกรรมสามารถเป็นไปได้เท่านั้น ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอต่อการนำไปสู่การสร้างจุดต่างของผลิตภัณฑ์ของสัตว์นั้นๆ นอกจากนี้บางลักษณะสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ เช่นกรณีของกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA ในเนื้อ การประยุกต์ใช้ความรู้ด้าน Nutrigenomics เพื่อใช้เป็นกระบวนการหนึ่งของการพัฒนายีนเครื่องหมายเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ข้อจำกัดที่กล่าวมาได้ ในกรณีของการทำให้ไก่มีกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA สะสมในเนื้อสูงขึ้น เนื่องจากร่างกายของไก่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันในกลุ่มนี้ได้เอง และต้องได้รับจากอาหารที่เป็นแหล่งของกรดไขมัน

กลุ่มนี้ ไม่เพียงเท่านี้ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่เป็นแหล่งของกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA เช่น Fish oil และ Linseed oil เป็นต้น (Lopez-Ferrer, Baucells, Barroeta, andGrashorn, 1999) ร่างกายก็ไม่สามารถนำไปสะสมในเนื้อได้ทั้งหมด สาเหตุสำคัญคือ กรดไขมันเหล่านี้จะถูก Oxidize และสูญเสียสภาพไป (YoungandMcEneny, 2001) เนื่องจากไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยระบบโรงเรือนเปิดจะเสี่ยงต่อสภาวะอากาศที่ไม่คงที่ เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะทำให้เกิดกระบวนการ Oxidize ไขมันที่ไม่อิ่มตัว และส่งผลให้การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ลงในอาหารเพื่อในมีการสะสมในเนื้อมากขึ้นจึงไม่ได้ผลเท่าที่ควร (ApelandHirt, 2004; Cortinas et al., 2005) ดังนั้นการพัฒนาพันธุกรรมโดยมีเป้าหมายเพื่อให้ไก่มีการสะสมกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA ในเนื้อให้มากขึ้น จึงต้องมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาพันธุกรรมของลักษณะความสามารถในการเก็บสะสมและการป้องกันการเกิดกระบวนการ oxidation ในเนื้อหลังจากที่ไก่ได้รับอาหารที่เป็นแหล่งของกรดไขมันเหล่านี้

ในร่างกายของสัตว์มีกระบวนการที่เรียกว่า Antioxidant System ซึ่งมี 2 แบบคือ แบบที่ใช้เอนไซม์ในระบบ (Enzymatic Antioxidant System) และแบบไม่ใช้เอนไซม์ในระบบ (Non-Enzymatic Antioxidant System) (Helmut Sies, 1993) กระบวนการที่เป็น Enzymatic Antioxidant System จะเป็นกระบวนการที่มาจากตัวสัตว์จริง เหตุเพราะมาจากกระบวนการสร้างโปรตีนภายในตัวสัตว์ ซึ่งรวมถึงระบบการทำงานของพันธุกรรม โดยเอนไซม์หลักที่ทำงานในระบบนี้มี 3 ตัวคือ Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*) และ catalase (*CAT*) (H. Sies, 1997) และเอนไซม์ทั้ง 3 นี้เป็นผลผลิตของการทำงานของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) ตามลำดับ

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้ Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay, and Banerjee (2004); Pulla Reddy and Lokesh (1994); Yarru et al. (2009) พบว่า สารในกลุ่ม curcuminoid เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ antioxidant กล่าวคือ สาร Curcumin มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ Antioxidant enzyme และลดการเกิด lipid peroxidation ที่ทำให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และจากบทบาทดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่า สารดังกล่าวจะมีบทบาทในการทำงานเกี่ยวข้องกับการทำงานของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) ด้วย

จากที่กล่าวมา เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการไปสู่เป้าหมายของการพัฒนาพันธุ์คือ การทำให้ไก่มีความสามารถในการสะสมกรดไขมันในกลุ่มของ n-3 PUFA ได้ดีขึ้นโดยการลดการเกิดกระบวนการ oxidation ของกรดไขมัน การศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างยีน Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) และสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของ curcuminoid จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญที่จะนำไปสู่ความรู้เกี่ยวกับการเกิดอิทธิพลร่วมระหว่าง

ยีนในกลุ่มดังกล่าวกับสารในกลุ่ม curcuminoid และความรู้นี้สามารถนำไปสู่การพัฒนายีนเครื่องหมายโดยใช้การจัดการด้านอาหารเข้ามาร่วมในการพัฒนา

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการเสริม curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ในอาหารไก่ต่อการแสดงออกของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) การเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ และการเกิด oxidation โดยวัดจากค่า TBARS

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

ระดับของการเสริม curcuminoid ที่แตกต่างกันในอาหารไก่ที่มี Tuna oil จะมีผลต่อการแสดงออกของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) การเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ และ TBARS ที่แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ กลุ่มตัวอย่างของไก่เนื้อโคราชซึ่งเป็นไก่เนื้อลูกผสมพื้นเมือง โดยใช้อาหารไก่ที่พัฒนาโดย Mrs.Tran Thi Thuy Hang นักศึกษาปริญญาเอกของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมี อ.ดร.วิทธวัช โมพี เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ซึ่งแสดงสูตรอาหารไว้ในส่วนของวิธีการวิจัยและการเก็บข้อมูล โดยผลงานวิจัยในครั้งนี้จะประยุกต์กับการใช้งานในฝูงไก่โคราชเท่านั้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

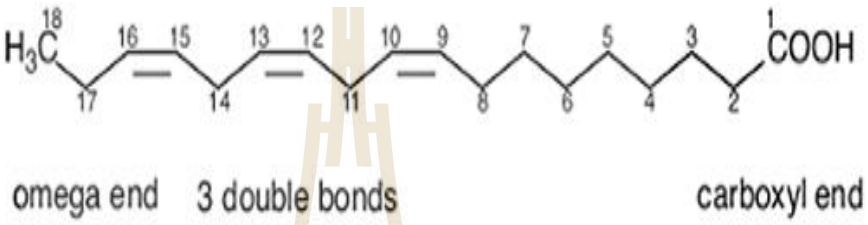
จะทำให้ทราบถึงผลของอาหารที่เสริม curcuminoid ในระดับแตกต่างกัน ร่วมกับการเสริม Tuna oil ต่อการทำงานของยีน Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาเพื่อการพัฒนายีนเหล่านี้ เป็น Gene marker เพื่อทำให้ไก่มีความสามารถในการป้องกันการเกิด Lipid peroxidation ของกรดไขมัน และสามารถสะสมกรดไขมันในเนื้อได้สูงขึ้น เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีกรดไขมันสูง

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Curcumin, Gene Expression, Nutrigenomic

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

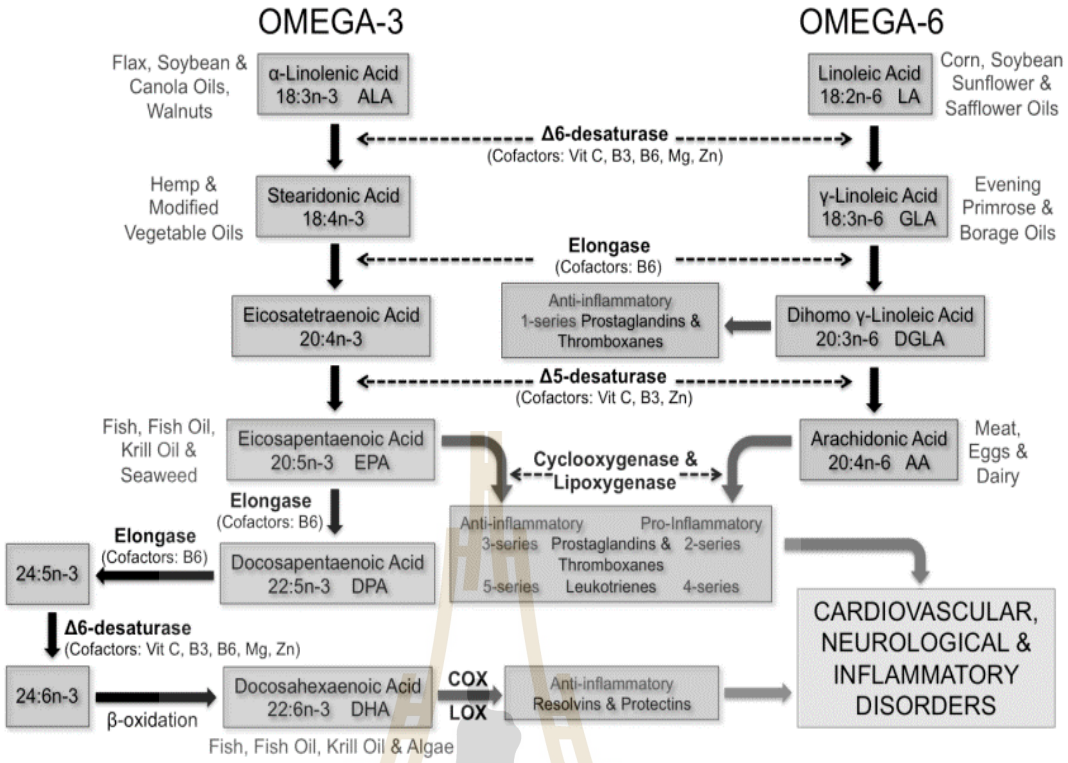
2.1 กลไกการสะสม n-3 PUFA ในเนื้อ



รูปภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ α-linolenic acid (18:3n3)
ที่มา: Medicine (2005)

n-3 PUFA หรือ n-3 Poly Unsaturated Fatty acid เป็นกรดไขมัน ที่จำเป็นต่อร่างกายแต่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้ เนื่องจากไม่มี Enzyme ในการสังเคราะห์ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็น Carbon ต่อกันเป็นสายยาว 18 ตัว และ มีตำแหน่งของ พันธะคู่อยู่ที่ C ตัวที่ 3 เมื่อนับจากด้านที่มีหมู่ Methyl Group ดังแสดงใน รูปภาพที่ 2.1

โดยกรดที่เป็นสารตั้งต้นของกรดไขมันที่จำเป็นมี 2 ชนิด คือ กรดแอลฟ่า-ลิโนเลนิค (α-linolenic acid, ALA, 18:3n-3) และกรดลิโนเลอิค (linoleic acid, LA, 18:2n-6) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไขมันชนิดต่างๆ ได้ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.1 ซึ่งกรดไขมันที่สำคัญในฝั่งของ n-3 PUFA คือ กรดไอโคซาเพนตะอิโนอิค (eicosapentaenoic acid, EPA, 20:5n-3) และกรดโดโคซาเฮกซาอิโนอิค (docosahexaenoic acid, DHA, 22:6n-3) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนาของทารกในครรภ์ การป้องกันโรคที่เกี่ยวกับโรคหลอดเลือดหัวใน รวมถึงโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น กรดไขมันชนิด n-3 PUFA พบมากในพืชน้ำมัน เช่น น้ำมันลินซีด (มีALAสูง) เป็นต้น หรือพบได้จากสัตว์ เช่น ปลาทะเลน้ำลึก (มี DHA และ EPA สูง) (Swanson, Block, andMousa, 2012) โดยกรดไขมันชนิด n-6 PUFA สามารถพบได้ในพืชน้ำมัน เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น (Gillingham, 2013) ซึ่งก็มีรายงานว่าสามารถช่วยลดผลของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้เช่นกัน (Harris et al., 2009)



รูปภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดไขมันที่มีต้นกำเนิดมาจาก n-3 และ n-6 แหล่งที่มาของกรดไขมัน รวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และการป้องกันการเกิดโรค
ที่มา: Gillingham (2013)

แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการรายงานเกี่ยวกับสัดส่วนของ n-6:n-3 ซึ่งต้องมีความสมดุลกัน จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุดแก่เมทาบอลิซึม จากรายงานของ Simopoulos (2006) สัดส่วนที่เหมาะสมแก่มนุษย์ คือ 1:1 ซึ่งก็เป็นสัดส่วนที่สามารถพบได้ในสัตว์ป่าทั่วไป ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มี n-3 จึงเป็นที่ยอมรับกันว่ามีประโยชน์ต่อร่างกาย

2.1.1 การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ต่อประสิทธิภาพการผลิต

การเสริมน้ำมันปลาลงในอาหารไก่เพื่อเพิ่มกรดไขมันที่มีประโยชน์ลงในเนื้อไก่นั้น ย่อมต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพการผลิต อัตราการตาย และคุณสมบัติต่างๆ ที่จะมีผลทางเศรษฐกิจต่อผู้ผลิตไก่ โดยจากการอ่านเอกสารงานวิจัยพบว่า การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ในอาหารไก่ ที่ทำให้มีอัตราการตายต่ำที่สุดอยู่ที่ 3% (Velasco et al., 2010) และ 2% (Ponte et al., 2008)

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงผลของการเสริมแหล่งกรดไขมันต่างๆ ที่มีผลต่อค่าการเจริญเติบโตของไก่

แหล่งของ n-3 PUFA และระดับของการเสริม	**ระยะที่เวลาเสริม**	**สิ่งที่พบ**	**References.**
การเสริม Fish oil หรือ linseed oil: 2 & 4%	1-38 วัน	การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (BW)($P<0.05$), ไม่มีผลต่อ อัตราการกินได้ (FI) และ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) รวมถึง สัดส่วน ของเนื้อสะโพก และ เนื้ออก	López-Ferrer, Baucells, Barroeta, Galobart, and Grashorn (2001)
Corn oil และ Fish oil: 5%	5 สัปดาห์	ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ BW, FI, FCR	Sadeghi, Iravani, Karimi-Torshizi, and Chamani (2012)
Fish oil 1% และ 2% กับ Poultry oil 3%	21-42 วัน	ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อ FI , แต่มีการเพิ่มขึ้นของ BW และ ลดลงของ FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)	Farhoomand and Checaniazer (2009)
เสริม vegetable oil (5%); Fresh fish oil contain 5g DHA/kg diet; Encapsulated fish oil: 5g DHA/kg diet; Algae biomass: 2.5g DHA/kg diet; 5g DHA/kg diet; 7.5g DHA/kg diet.	21-42 วัน	ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ BW, FI, FCR	Rymer and Givens (2005)

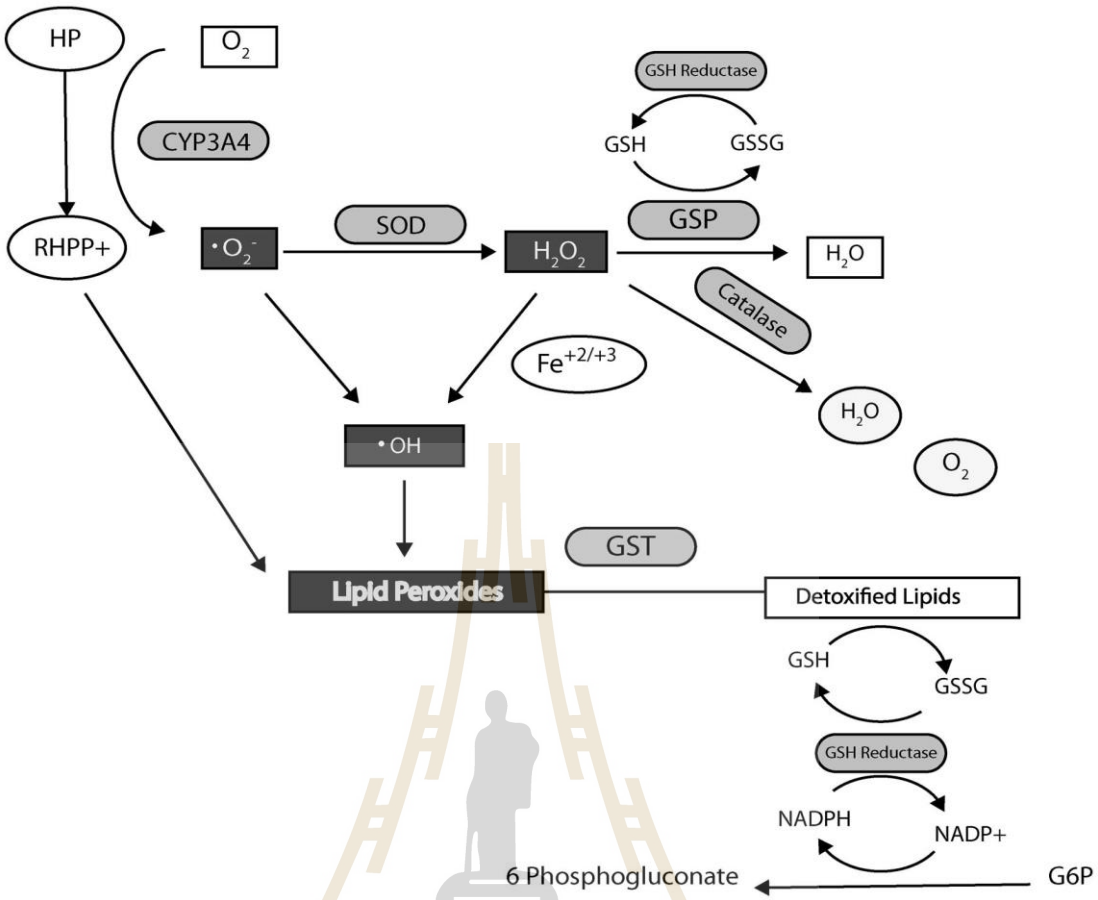
ตารางที่ 2.1 บอกถึงความแตกต่างของ ระดับการเสริม และ ระยะเวลาการเสริม กรดไขมัน n-3 PUFA ในอาหารสัตว์ โดยจากตารางจะพบว่า การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิต โดยจากงานของ Farhoomand and Checaniazer (2009) การเสริม Poultry fat

1%+fish oil 2% จะทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) ลดลง แต่อย่างไรก็ตามจากงานของ López-Ferrer et al. (2001) และKitessa and Young (2008) พบว่า การเสริมกรดไขมัน n-3 PUFA ไม่มีผลต่อสัดส่วนของเนื้อสะโพก และเนื้ออก

2.2 ระบบ Antioxidant Syste

ระบบของการต้านอนุมูลอิสระ เกิดจากการที่การเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของกิจกรรมต่างๆ ภายในร่างกายในกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดผลพลอยได้เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระที่มีสถานะที่ไม่คงตัว และไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยอนุมูลอิสระจะมีชื่อเรียกอีกชื่อว่า Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในการดำรงชีวิต จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิเคิล (superoxide radical; O_2), ไฮโดรซิลเรดิ-เคิล (hydroxyl radical; HO), อัลโคซิล เรดิเคิล (alkoxyl radical; RO) และไนตรัส เรดิเคิล (nitrous radical; NO)

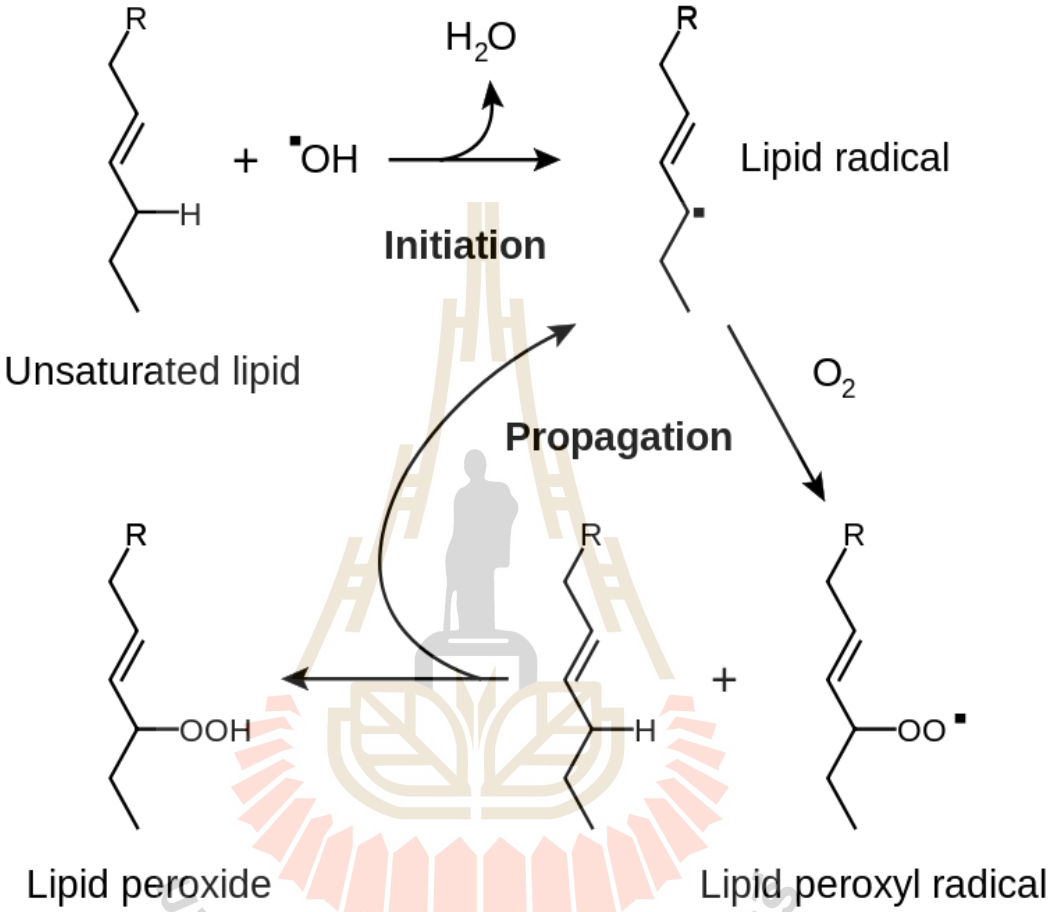
โดยเนื่องจากอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นในร่างกายได้ง่าย จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสารเหล่านั้นให้การทำงานที่ผิดพลาด ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการต่างๆ ของร่างกาย รวมทั้งยังมีผลต่อการทำงานในระดับพันธุกรรม ซึ่งจากรายงานของ Apel and Hirt (2004) พบว่ามี ROS มีผลต่อการแสดงออกของยีน ในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ สารที่เป็นเอนไซม์ เช่น ซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: SOD) คะทะเลส (Catalase: CAT) กลูทาไทออนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: GPX) กลูทาไทออนรีดักเทส (Glutathione Reductase: GR) กลูทาไทออน-ทรานส์เฟอเรส (Glutathione S- Transferase: GST) และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ เช่น กลูทาไทออน (Glutathione) กรดลิโพอิก (Lipoic acid) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) แอลบูมิน (Albumin) ทรานส์ เฟอริน (Transferrin) แฮพโทกลอบิน (Haptoglobin) ฮีโมเพกซิน (Hemopexin) กรดยูริก (Uric Acid) บิลิรูบิน (Bilirubin) และซิสทิน (Cysteine) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากร่างกายสัตว์ ได้แก่ เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดก็จะมาจากสารพันธุกรรม ซึ่งพันธุกรรมของสัตว์ หรือจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันออกไป



รูปภาพที่ 2.3 บทบาทหน้าที่การทำงานของ Antioxidant enzyme
ที่มา: Gumulec et al. (2013)

จากรูปที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการนั้นมีหลายชนิด แต่จากงานของ Helmut Sies (1993) พบว่า มีเอนไซม์ที่สำคัญอยู่ 3 ตัว คือ ซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสวัน (Superoxide Dismutase: SOD) คะทะเลส (Catalase: CAT) กลูทาไทออนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: GPX) โดยกระบวนการที่มีเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้เกี่ยวข้อง ถือว่าเป็นกระบวนการที่สั้นและใกล้ที่สุดในการป้องกันการเกิด Lipid peroxide เมื่อเกิดการออกซิไดซ์ไขมัน จะทำให้ประสิทธิภาพของการเสริมกรดไขมันลงและเกิดการเหม็นหืนในเนื้อ โดยบทบาทการทำงานของ Enzyme 3 ตัวนี้จะแสดงไว้ในส่วนถัดไป

การเกิด Lipid peroxide ร่างกายจะมีการสะสมของอนุมูลอิสระและทำให้เกิดการไปจับกับสารที่เป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของสารซึ่งจะทำให้เกิด Lipid peroxide ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.4

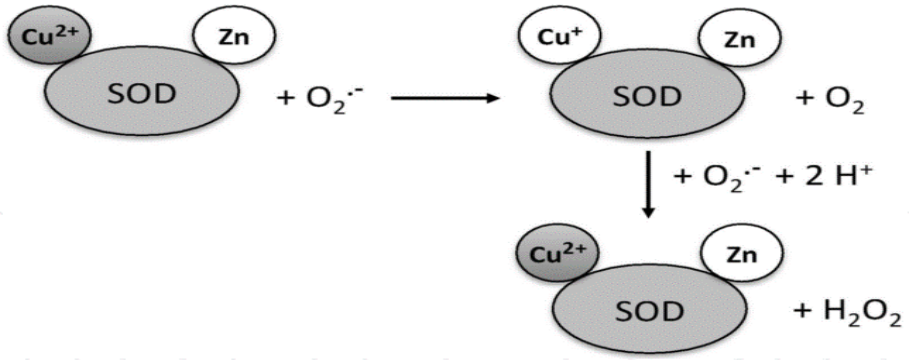


รูปภาพที่ 2.4 แสดงการเกิด Lipid peroxide

ที่มา: Young and McEneny (2001)

2.2.1 กลไกการทำงานของ Superoxide Dismutase: SOD

Superoxide Dismutase: SOD เป็นโปรตีนสายสั้นๆ ประกอบไปด้วยกรดอมิโน 153 ตัว ในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ SOD จะอาศัยการทำงานร่วมกับแร่ธาตุ 2 ตัว นั่นคือ Cu^{2+} กับ Zn ซึ่งจะมีปฏิกิริยาต่อเนื่อง 2 ขั้นตอนคือ 1. การเปลี่ยน Cu^{2+} ให้กลายเป็น Cu^{+} และ 2. เปลี่ยนให้เป็น Cu^{2+} ตามเดิม ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นสาร hydroperoxide(H_2O_2) ซึ่งจะสามารถเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระประเภท OH^{-} ได้โดยการใช้ธาตุ Fe^{2+}/Fe^{3+} ซึ่งจะทำให้เกิด Lipid peroxidase ขึ้นได้ (รูปภาพที่ 2.5) โดยยีน *SOD* จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 ในไก่



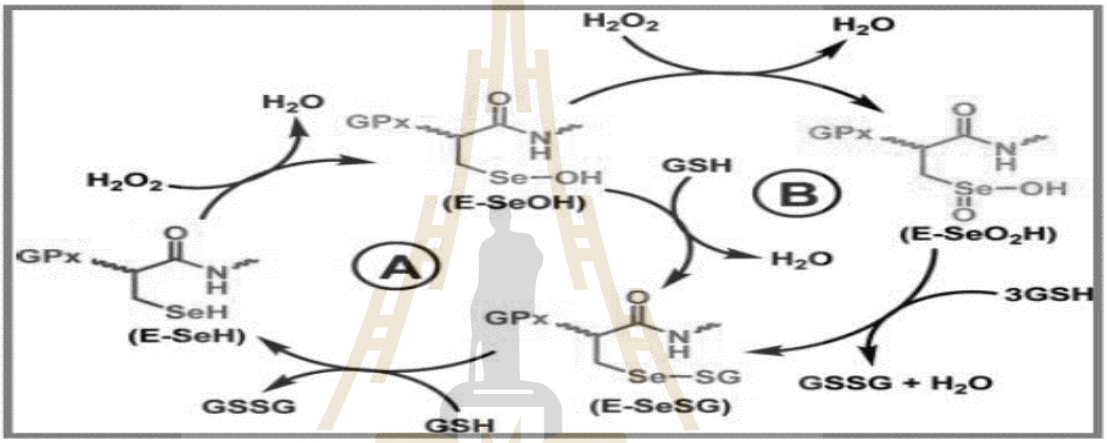
รูปภาพที่ 2.5 บทบาทหน้าที่ทำงานของ Superoxide Dismutase: *SOD*
ที่มา: M. C. Franco, Dennys, Rossi, and Estévez (2013)

จากการศึกษาเอกสารพบว่า มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของ *SOD* ยีนโดยหาความสัมพันธ์และความเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น ในงานของ Rosen et al. (1993) ได้มีการศึกษายีน *SOD* กับโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงในมนุษย์ และสำหรับงานที่ทำการทดลองในสัตว์ปีกและเป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในยุคแรกเริ่ม คืองานของ Stanton, Wilton, and Laing (1996) ซึ่งศึกษาถึง PCR product ของยีน *SOD* ใน Embryonic chicken spinal cord ของไก่ เพื่อดูและเปรียบเทียบ sequence กับของมนุษย์และของโค ต่อมาในงานของ Lenzen, Drinkgern, and Tiedge (1996) ได้มีการศึกษายีน *SOD* ด้วยเทคนิค Northern blot hybridization ในหนู เพื่อดูและเปรียบเทียบในแต่ละอวัยวะ ทั้งนี้เขายังได้ศึกษาใน Antioxidant enzyme gene อื่นด้วย ซึ่งข้อมูลที่น่าสนใจและเกี่ยวข้องกับงานนี้คือ *SOD* มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีนต่อเปอร์เซ็นต์อวัยวะ โดยในตับมีค่าเท่ากับ 100±7 % (สูงที่สุด) และในเนื้อ 59±7% ในงานของ H.-T. Wang et al. (2013) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOD* ต่อการเสริม Albusin B โดยพบการแสดงออกของยีน *SOD* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ Control โดยในงานนี้ยังได้บอกอีกว่าการทำงานของยีน *SOD* นั้นเกี่ยวข้อง Metabolism ของไขมัน อย่างไรก็ตามยังมีงานอีกมากที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน *SOD* (Dhage, Kamble, andBhargava, 2017; Milani, Gagliardi, Cova, andCereda, 2011; Zelko, Mariani, andFolz, 2002) โดยยังไม่พบการศึกษาการแสดงออกของยีนในไก่เนื้อลูกผสม ซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไป

2.2.2 กลไกการทำงานของ Glutathione Peroxidase: GPX

Glutathione Peroxidase: *GPX* เป็น Antioxidant enzyme ที่ทำการเปลี่ยนสาร hydro peroxide (H_2O_2) ให้เป็นน้ำ (H_2O) อาศัยการทำงานร่วมกับ ธาตุ Selenium(SE) โดยการใช้ Se เป็นตัว Active site ซึ่งในแรกเริ่ม เอนไซม์ GPX จะอยู่ในรูปของ Enzyme+Selenol (E-SeH) และเมื่อร่างกายมีการสร้างสาร H_2O_2 เขียนให้เป็นสัญลักษณ์ที่เป็นสากลด้วย ขึ้นมา E-SeH จะเข้าไปทำการเปลี่ยนให้

เป็น H_2O ซึ่งจะทำให้ตัวเอนไซม์เปลี่ยนรูปเป็น Enzyme+Selenic acid (E-SeOH) ในการงานขั้นถัดไป ต้องอาศัยการทำงานของ สาร Glutathione(GSH) เข้ามาช่วยเพื่อเปลี่ยนเอนไซม์ ให้ เป็น Enzyme+Selenenyl sulfide (E-SeSG) และกลับมาเป็น Enzyme+Selenol(E-SeH) ตามลำดับ ดังในรูปภาพที่ 2.6 กลไก A แต่หากในร่างกายสัตว์ มีสาร hydro peroxide (H_2O_2) อยู่มาก จะมีกระบวนการ B ขึ้นมา เพื่อช่วยลด hydro peroxide(H_2O_2) ลง ซึ่งเอนไซม์จะทำการเปลี่ยนรูปเป็น Enzyme+Seleninic acid (E-SeO2H) แล้วจึงใช้สาร Glutathione (GSH) เปลี่ยนให้เป็น Enzyme+ Selenenyl sulfide (E-SeSG) และ Enzyme+Selenol (E-SeH) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.6



รูปภาพที่ 2.6 บทบาทหน้าที่ทำงานของ Glutathione Peroxidase: *GPX*
ที่มา: Bhabak and Mugesh (2010)

จากเอกสารพบว่า มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *GPX* มาตั้งแต่ปี 1993 โดยในงานของ Chu, Doroshow, and Esworthy (1993) ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะเฉพาะของยีน *GPX* ในมนุษย์และเป็นการศึกษาถึงการแสดงออกและลำดับเบสในยุคแรกของการศึกษาด้าน Transcriptomic และในงานของ Lenzen et al. (1996) ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme gene ในอวัยวะต่างๆ ของตับหนู โดยได้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของ *GPX* ยีน ซึ่งเนื้อหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับงานนี้คือการแสดงออกของยีน *GPX* ที่ตับและเนื้อ โดยผลการศึกษาได้บอกว่ายีน *GPX* ได้มีการแสดงออกในตับ 100±5% และได้มีการแสดงออกในเนื้อ 40±10 % นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนในไก่พ่อแม่พันธ์ไก่เนื้อ ได้ทำการศึกษาโดยการเสริมแหล่งของ Selenium ที่แตกต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *GPX* ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control (Yuan, Zhan, andWang, 2012) โดยยังมีการศึกษา

ถึงการแสดงออกของ *GPX* อีกหลายงานที่ศึกษาในสัตว์ต่างๆ เช่น หนู เป็นต้น (S. M. El-Bahr, 2013; Sabry M. El-Bahr, 2013; Kong, Kim, andFoster, 2003; Yarru et al., 2009; Zhang et al., 2013) ซึ่งยังไม่พบรายงานของการทำการทดลองในไก่ลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไป

2.2.3 กลไกการทำงานของ Catalase: CAT

การทำงานของ CAT เป็นปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนที่เปลี่ยนสาร สาร hydro peroxide (H_2O_2) ไปเป็น H_2O+O_2 ซึ่งเอนไซม์ Catalase จะอาศัยการทำงานร่วมกับธาตุเหล็ก (Fe) ซึ่งในสมการที่ 1 จะทำการนำเอา H_2O_2 1 ตัวมาทำการรีดิวซ์ จะได้ผลผลิตออกมาเป็นสารประกอบโลหะชนิดหนึ่งบวกกับน้ำแล้วสารประกอบโลหะ จะทำปฏิกริยากับ H_2O_2 ตัวที่ 2 แล้วจะได้กลับเป็นเอนไซม์ Catalase+ Fe และได้ผลผลิตสุดท้ายคือ น้ำ และออกซิเจน ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.7

$$\text{Catalase Fe(III)} + H_2O_2 \xrightarrow{k_1} \text{Compound I (O=Fe(IV)Por}^{+\cdot}) + H_2O \qquad \text{(Eq. 1)}$$

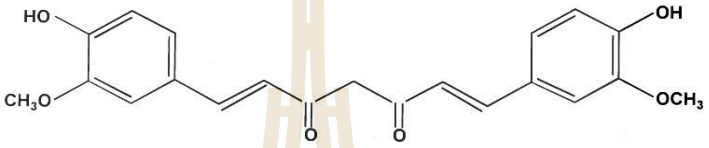
$$\text{Compound I} + H_2O_2 \xrightarrow{k_2} \text{Catalase Fe(III)} + H_2O + O_2 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

รูปภาพที่ 2.7 การบทบาทหน้าที่ทำงานของ Catalase: *CAT*
ที่มา: Kato, Ueno, Fukuzumi, and Watanabe (2004)

เช่นเดียวกับยีน *SOD* และ *GPX* ในงานของ Lenzen et al. (1996) ได้กล่าวถึงการแสดงออกของยีนในแต่ละอวัยวะ ซึ่งรวมถึงยีน *CAT* ซึ่งในส่วนของเนื้อหาสำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ คือการแสดงออกของยีน *CAT* ในตับและเนื้อ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของยีน *CAT* ในตับมีค่าเท่ากับ 100±10 และในเนื้อมีค่าเท่ากับ 41±12 และในงานของ A. A. Franco, Odom, and Rando (1999) ซึ่งได้ศึกษาถึงอิทธิพลของ Oxidative stress ต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ในกล้ามเนื้อของหนู ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน *CAT* ด้วย พบว่ามีผลต่อ Oxidative stress อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับงานของ David. et al. (2000) ศึกษาการเกิดมะเร็ง ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *CAT* ในงานของ Sabry M. El-Bahr (2013) และ El-Bahr (2015) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *CAT* ในหนู เช่นกัน ซึ่งพบว่าในงานปี 2013 ได้ทำการศึกษาโดยใช้หนูที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *CAT* ที่ต่างกัน และในงานที่ตีพิมพ์ปี 2015 นั้นทำการศึกษาโดยการเสริมสาร Curcumin ซึ่งเป็น Antioxidant Non-Enzyme ที่มาจากธรรมชาติร่วมกับการใช้สารพิษ Aflatoxin ซึ่งพบว่ามีผลอย่างมีนัยสำคัญกับ การแสดงออกของยีน *CAT* อย่างไรก็ตาม ในงานที่ทำ

การทดลองในสัตว์ปีก เช่น งานของ Ma et al. (2016) ที่ได้ทำการเสริมธาตุเหล็กลงในอาหารไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า มีผลต่อการแสดงออกของยีน *CAT* อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้พบว่ายังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *CAT* ในไก่เนื้อลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งยังต้องมีการศึกษาต่อไป

2.3 สาร Curcumin



CURCUMIN

รูปภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสาร Curcumin
ที่มา: Liu et al. (2013)

Curcumin เป็นสารที่สกัดจากขมิ้น เป็นสาร Antioxidant ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เมื่ออยู่ในรูปของเหลวจะเรียกว่า Curcuminoid โดยโครงสร้างของสาร Curcumin จะแสดงในรูปภาพที่ 2.8 ซึ่งจากการอ่านงานของ Yarru et al. (2009) พบว่า Curcumin มีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme gene ซึ่งมีผลอย่างมีนัยสำคัญกับยีน *SOD* และ *GPX* แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับยีน *CAT* ทั้งนี้การศึกษาในสารตัวนี้ต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme gene ยังไม่สารมารถพบเห็นได้มากนัก และการทำการทดลองส่วนใหญ่ได้ทำการทดลองในหนูและไก่เนื้อทางการค้า โดยยังไม่พบรายงานในไก่พื้นเมืองหรือไก่ลูกผสมพื้นเมือง ซึ่งยังต้องมีการทำการศึกษาต่อไป เนื่องจาก Curcumin เป็นสารที่มีความน่าสนใจ และกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับระบบที่จะสามารถเพิ่มคุณภาพของเนื้อไก่ โดยสามารถใช้ในการพัฒนาทั้งในด้านอาหารและในด้านการพัฒนาพันธุ์ได้เพื่อยกระดับของผลผลิตได้

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme gene จากผลของ Curcumin โดยพบว่าในงานของ El-Bahr (2015) ซึ่งทำการทดลองในหนู โดยได้ทำการเสริมสาร Curcumin & Aflatoxin พบว่ามีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนที่อวัยวะตับเพิ่มขึ้นในกลุ่มการทดลองที่มีการเสริม Curcumin & Aflatoxin และในงานของ Sabry M. El-Bahr (2013) ได้ทำการเสริมสาร Curcumin ในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน พบว่ามีผลต่อการ

แสดงออกของ Antioxidant Enzyme ยีนเมื่อเทียบกับ Control ทั้งนี้ยังมีงานทดลองในไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า เช่นในงานของ Yarru et al. (2009) โดยพบว่าการเสริม Curcumin ร่วมกับ Aflatoxin มีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนในส่วนของยีน *SOD* และ *GPX* โดยจากเอกสารทั้งหมดนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าสาร Curcumin ซึ่งจัดเป็น Antioxidant Non-enzyme ได้มีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ในสภาวะที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ยังไม่พบการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเสริมกรดไขมันร่วมกับ Curcumin ในไก่พื้นเมืองลูกผสมในอาจเป็นส่วนสำคัญ ในการช่วยพัฒนาพันธุกรรมร่วมกับอาหารในการเพิ่มกรดไขมันในเนื้อไก่พื้นเมืองลูกผสมได้

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงผลของการเสริมสาร Curcumin ต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ยีนในสัตว์

Animals	**Treatment**	**Organ**	**Gene**			**Ref.**
			SOD	***GPX***	***CAT***	
Diabetic rats	Curcumin	Liver	*	*	*	Sabry M. El-Bahr (2013)
Rat	Curcumin & Aflatoxin	Liver	*	*	*	El-Bahr (2015)
Broiler chicken	Curcumin & Aflatoxin	Liver	*	*	ns	Yarru et al. (2009)

*P<0.05; ns = P>0.05

จากประเด็นที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า ระบบ Antioxidant เป็นกลไกสำคัญในการลดอนุมูลอิสระที่มีผลต่อการเสริมกรดไขมันลงในอาหาร โดยการเสริมกรดไขมันลงในอาหารนั้นจะทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ก็ต่อเมื่อมีการลดปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการสูญเสียของกรดไขมันที่เสริมลงไป ซึ่งอนุมูลอิสระนั้นก็ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่จะมีผลต่อสารอาหารประเภทกรดไขมันที่มีประโยชน์ ดังนั้นการหาวิธีการที่จะลดอนุมูลอิสระ ทั้งในด้านของอาหาร เช่น การเสริม Curcumin ลงในอาหาร และในด้านการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การศึกษาการ แสดงออกของ Antioxidant Enzyme Gene นั้น จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่า การทำงานของ Antioxidant Enzyme gene และ Curcumin นั้นมีผลต่อลดอนุมูลอิสระ และ การลดอนุมูลอิสระจะลดความเสี่ยงต่อการเกิด Lipid peroxidation ของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว จึงนำมากสู่สมมุติฐานที่ว่า

ระดับของการเสริม curcuminoid ที่แตกต่างกันในอาหารไก่ที่มี Tuna oil จะมีผลต่อการแสดงออกของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), Catalase (*CAT*) การเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ และ TBARS ที่แตกต่างกัน

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีดำเนินการวิจัยและการเก็บข้อมูล

การดำเนินงานทดลองในครั้งนี้ เป็นการดำเนินงานที่ต่อเนื่องจากวิทยานิพนธ์ของ Mrs.Tran Thi Thuy Hang นักศึกษาปริญญาเอกของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมี อ.ดร.วิทธวัช โมพี เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก โดยในส่วนของการเลี้ยง การจัดการทั่วไป การออกแบบสูตรอาหาร และผลวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อหาระดับของกรดไขมัน n-3 PUFA และระดับของค่า TBARS ในเนื้อไก่ เป็นส่วนได้รับความอนุเคราะห์จาก Mrs.Tran Thi Thuy Hang (Hang, Molee, Khempaka, andParaksa, 2018) โดยมีรายละเอียดการดำเนินงาน ดังนี้

3.1.1 สัตว์ทดลอง และการจัดการสัตว์ทดลอง

การใช้โรงเรือนและการให้อาหาร ได้ทำภายใต้คำแนะนำและการควบคุมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยใช้ไก่เนื้อโคราชจำนวน 480 ตัว แบบคละเพศ ไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนป้องกันโรคมาเร็ก มาจากโรงฟักของฟาร์มมหาวิทยาลัย ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคลาสเซิล โรคกัมโบโร่ และโรคหลอดลมอักเสบ ที่อายุ 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ

ลูกไก่ที่ผลิตได้ จะทำการกกและเลี้ยงรวมกันจนถึงอายุได้ 20 วัน เมื่อไก่มีอายุได้ 21 วัน สุ่มไก่เข้าการทดลองในแต่ละกรง โดยใช้ความหนาแน่นในการเลี้ยงเท่ากับ 8 ตัว/ตารางเมตร ในกรงใช้แกลบในการปูพื้น ให้กินอาหารและน้ำอย่างอิสระ โดยไก่อายุ 1-21 วัน ใช้อาหารโปรตีน 21% พลังงาน 3100 kcal ME/kg ดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.2 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มการทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีไก่ทั้งหมด 20 ตัว โดยใช้การเลี้ยงแบบคละเพศ โดยกลุ่มการทดลองที่ 1 ใช้เป็น control โดยใช้อาหารพื้นฐาน (ตารางที่ 3.2) ที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% ในกลุ่มการทดลองที่ 2 ใช้เป็น Positive control โดยใช้พื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% ร่วมกับการเสริม Vitamin E ในปริมาณ 200 mg/kg โดยในกลุ่มการทดลองที่ 3 ถึงกลุ่มการทดลองที่ 6 ใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% ร่วมกับการเสริมสาร Curcumin Removed Turmeric Oleoresin (Curcuminoid) ที่ 20, 40, 60 และ 80 mg/kg ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารในการเลี้ยงไก่อายุ อายุ 0-21 วัน

วัตถุดิบอาหาร	%	คำนวณสารอาหาร	%
Soybean meal 44%	30	Protein	21.00
Full -f at soybean	12.24	Energy, kcal/kg	3100
Corn	48.88	Ether extract	8.53
Rice bran oil	4.43	Crude fiber	3.67
DL-Methionine	0.26	Digestible Lysine	1.10
L- Lysine	0.07	Digestible Methionine	0.55
L- Threonine	0.09	Dig.(Meth+Cysteine)	0.82
Salt	0.47	Digestible Threonine	0.77
CaCO3	1.64	Calcium	1.00
P21	1.42	Available Phosphorus	0.45
Premix	0.50	Sodium	0.20
Total	100	Potassium	0.94

3.1.3 ค่าสังเกตที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐาน

1. ระดับของ n-3 Poly unsaturated fatty acid (n-3 PUFA) ในเนื้อ เพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์กับระดับการ Expression ของ Antioxidant enzyme gene

2. ระดับการ Expression ของยีน คือ Superoxide Dismutase: *SOD* Catalase: *CAT* และ Glutathione Peroxidase: *GPX* ที่อวัยวะตับและเนื้อ

3. ค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBARS) ในเนื้อ เพื่อให้เห็นถึงระดับการเกิด Oxidation และ หาหาความสัมพันธ์กับระดับการ Expression ของ Antioxidant enzyme gene

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่อายุ 22-84 วัน

item	Grower (d 22 to 42)	Finisher (d 43 to 84)
Soybean meal (44% CP)	33.55	26.55
Corn (8%CP)	50.366	51.50
De-oil rice bran	6.11	12.48
Tuna oil	4.00	4.00
Rice bran oil	2.00	2.00
DL-Methionine	0.25	0.19
L-Lysine	0.13	0.10
L-Threonine	0.10	0.06
Salt	0.35	0.28
CaCO3	1.57	1.42
Monocalcium phosphate (21% P)	1.08	0.92
[1]Premix1	0.50	0.50
Calculated nutrients (% unless stated otherwise)		
ME (kcal/kg)	3,100	3,100
Crude protein	19.00	17.00
Digestible lysine	1.00	0.85
Digestible methionine	0.51	0.43
Digestible Met + Cys	0.76	0.65
Calcium	0.90	0.80
Available phosphorus	0.35	0.30
Analyzed nutrient level (%)		
Total lipid (%)	7.30	7.74
Fatty acid profile (% of total fatty acid)		
SFA	31.98	30.33
MUFA	32.93	32.56
PUFA	35.09	37.11
n-6	26.58	26.89
n-3	8.51	10.22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

[1]Premix (0.5%) คิดตามกิโลกรัมของอาหาร : 15,000 IU of vitamin A; 3,000 IU of vitamin D3; 25 IU of vitamin E; 5 mg of vitamin K3; 2 mg of vitamin B1; 7 mg of vitamin B2; 4 mg of vitamin B6; 25 µg of vitamin B12; 11.04 mg of pantothenic acid; 35 mg of nicotinic acid; 1 mg of folic acid; 15 µg of biotin; 250 mg of choline chloride; 1.6 mg of Cu; 60 mg of Mn; 45 mg of Zn; 80 mg of Fe; 0.4 mg of I; 0.15 mg of Se.

3.2 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3.2.1 การศึกษาระดับของ Gene Expression

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อสกัด Total RNA

เมื่อไก่อายุ 12 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างโดยการสุ่มไก่มา 8 ตัวต่อ 1 กลุ่มการทดลอง (กรงละ 2 ตัว ทั้ง 2 เพศ) โดยจะนำเข้าสู่กระบวนการชำแหละดังนี้

- ฆ่าไก่ด้วยการรมสาร Chloroform ก่อนและทำการตัดหัวไก่ออก
- ทำการชำแหละนำเครื่องในออกมาแยกเอาส่วนที่เป็นตับออก ทำการตัดเป็นชิ้น ชิ้นละประมาณ 1 เซนติเมตร และ เก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml
- ทำการตัดเอาเนื้อส่วนอก ออกจากโครงไก่ ตัดเป็นชิ้น ชิ้นล่ะประมาณ 1 เซนติเมตร และ เก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml
- นำตัวอย่างทั้งเนื้อและตับ เก็บลงในกล่องที่บรรจุไนโตรเจนเหลว (-195.8°C) ทำการขนส่งจากฟาร์มไปห้องทดลอง หลังจากนั้นนำตัวอย่าง เนื้อและตับ เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศา เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของ RNA ในเนื้อและตับ และ รอทำการสกัดเอา RNA ออกในขั้นตอนต่อไป

โดย เหตุผลที่เก็บตัวอย่างตับ เนื่องจากตับเป็นจุดสำคัญที่มีการขนส่งและเปลี่ยนรูปแบบของกรดไขมัน ดังนั้นจึงอาจมีการเกิดปฏิกริยา Oxidation ของไขมันในบริเวณนี้ได้ และบริเวณอวัยวะเนื้ออก เป็นอวัยวะเป้าหมายในการหวังผลให้ไขมันไปสะสม ดังนั้น การศึกษาระบบ Antioxidant และปฏิกริยา Oxidation ที่บริเวณนี้ จึงมีความสำคัญต่องานวิจัยนี้อย่างยิ่ง

3.2.1.2 การสกัด Total RNA

การสกัด Total RNA จากกล้ามเนื้อและตับเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: *SOD*) คะทะเลส (Catalase: *CAT*) และกลูทาไทออนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: *GPX*) จากตับและกล้ามเนื้อเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน อธิบายเป็นขั้นตอนอย่างละเอียดได้ดังนี้ (หมายเหตุ: ทำในตู้ดูดควันสารเคมี เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการสกัดส่งผลต่อระบบทางเดินหายใจ)

- ชั่งตัวอย่างชิ้นเนื้อและตับ ประมาณ 0.05 g ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml

จากนั้นค่อยๆ ใส่ไตรซอลครั้งละ 200 µl บดตัวอย่างให้ละเอียดจนเห็นเป็นลักษณะใสไม่มีตะกอน จากนั้นเติมไตรซอลจนครบ 1000 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา (25ºC) 5 นาที

- ใส่คลอโรฟอร์ม 200 µl นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

- จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ในหลอดตัวอย่างมา 500 µl ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่และเติมไอโซโพรพานอล 500 µl Inverse ตัวอย่างให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25ºC) เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

- ดูดสารละลายในหลอดทั้งหมดออก ยกเว้นตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอด เติมเอทานอล 1000 µl Inverse ตัวอย่างให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

- จากนั้นดูดเอทานอลในหลอดออก ยกเว้นตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอด และ air dry เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อผึ่งตะกอนให้แห้ง

- เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) 30 µl จะได้ Total RNA ของกล้ามเนื้อและตับไก่ จากนั้นดูด Total RNA ออกมา 2 µl เพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A)

3.2.1.3 การสังเคราะห์ First stand cDNA

หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยมีวิธีการดังนี้ การเตรียม RNA จะใช้ Total RNA, Oligo-dT primer และน้ำ Deionized ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 65°C และ fix บนน้ำแข็งทันทีนาน 10 นาที จากนั้นสังเคราะห์ First Strand cDNA ด้วยชุดสังเคราะห์ First Strand cDNA สำเร็จรูป (Transcriptor First Strad cDNA Synthesis Kit; Roche, Germany) โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA ดังนี้ Transcriptor RT Reaction Buffer (5x), Protector Rnase inhibitor, Deoxynucleotide mix และ Transcriptor Reverse Transcriptase mix กับ RNA ที่เตรียม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55°C 30 นาที และทำลายเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 85°C 5 นาที และเก็บตัวอย่าง First Strand cDNA ไว้ที่ -20°C จากนั้นนำ First Strand cDNA ที่ได้ส่วนหนึ่งมาตรวจสอบคุณภาพด้วย Excel Taq 5X PCR Master dye mix (SMOBIO), primer forward actin, primer reverse actin, cDNA, LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH). และน้ำ Deionized หลังจากนั้น cDNA (RT product) ที่ได้นำมาเข้าเครื่อง Real time PCR (Roche480, Germany) มา Run agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของ cDNA (RT product) ที่ได้

3.2.1.4 ระดับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน(*SOD, CAT, GPX*)

จากนั้นนำ First Strand cDNA 2 µl ที่ได้ผสมเข้ากับน้ำ Deionized 6 µl และ SYBR Green I Master 10 µl (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง Real time PCR รุ่น Roche480 ของประเทศเยอรมัน (Germany) สำหรับยีนซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: *SOD*) คะทะเลส (Catalase: *CAT*) และกลูทาไทออนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: *GPX*) จากตับและกล้ามเนื้อเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน โดย primer forward และ primer reverse ของยีนซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: *SOD*) คะทะเลส (Catalase: *CAT*) และกลูทาไทออนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: *GPX*) อย่างละ 1 µl ใช้ตามที่แสดงในตารางที่ 3.3 ซึ่งไพร์เมอร์ของทั้งสามยีนที่ใช้นั้นได้จากการอ่านงานของ Yarru et al. (2009) โดยดีไซน์มาจากโปรแกรม Primer3 ของ Rozen and Skaletsky (1999) แล้วนำมาวัดปริมาณการแสดงออกของทั้งสามยีนโดยเทียบกับยีนเจ้าบ้าน หรือ houskeeping gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GADPH*) เพื่อดูระดับปริมาณการแสดงออกของยีนที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกันของทั้งสามยีน

ตารางที่ 3.3 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิค Real time-PCR ของยีน *SOD CAT* และยีน *GPX*

Genes	5' sequence 3' forward primer 5' sequence 3' reverse primer	Annealing temperatures	PCR size (bp)
SOD1	5′-AGGGGGT*CAT*CCACTTCC-3′ 5′-CC*CAT*TTGTGTTGTCTCCAA-3′	57°C	122
CAT	5′-GGGGAGCTGTTTACTGCAAG-3′ 5′-TTTCC*CAT*TGGCTATGG*CAT*T-3	56°C	139
GPX	5′-TTGTAAA*CAT*CAGGGGCAAA-3′ 5′-TGGGCCAAGATCTTTCTGTAA-3	55°C	140
GADPH	5′-GGTGGC*CAT*CAATGATCCCT-3′ 5′-CCGTTCTCAGCCTTGACAGT-3	58°C	105

หมายเหตุ : *SOD1* = Superoxide Dismutase; *CAT* = Catalase; *GPX* = Glutathione Peroxidase; *GADPH* = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3.2.1.5 การทำ Lipid Analysis โดยการใช้ Gas chromatography

สกัดเอา Lipid ออกจากเนื้อประมาณ 5 กรัม ต่อ 1 อย่าง โดยใช้สารคลอโรฟอม: เมทานอล (2:1 v/v) (Folch, Lees, andSloane-Stanley, 1957) จากนั้นสกัดเอา Fat ออกจากตัวอย่าง

ประมาณ 20-25 มิลลิกรัม ด้วย Methylate (Metcalfe, Schmitz, andPelka, 1966) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยการใช้เทคนิคการทำ Chromatography โดยใช้แก๊สเป็นตัวพาสาร (Gas Chromatography) (Hewlett-Packard 7890A;Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ด้วยหลอด Capillary คอลั่ม (SP 2560, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA, 100 m x 0.25 mm i.d., 0.20-µm film thickness) และเครื่อง Flame ionization โดยใช้ก๊าซฮีเลี่ยมเป็นตัวพาสารอัตราการไหลอยู่ที่ 0.95 ml/min อุณหภูมิที่ใช้ฉีดสารและวิเคราะห์อยู่ที่ 260°C อุณหภูมิแรกเริ่มของหลอดอยู่ที่ 70°C จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 175°C โดยมีอัตราเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอยู่ที่ 13°C/min และสุดท้ายเพิ่มขึ้นเป็น 240°C ด้วยอัตรา 4°C/min

3.2.1.6 การหาค่า TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) ในเนื้อ

หาค่า TBARS ในเนื้อเพื่อดูว่ามีความสัมพันธ์กับระดับการ Expression โดยการแบ่งเนื้อออกเป็นชิ้น ชิ้นละ 5 กรัม ตามวิธีการทดลองแบบของ Leick et al. (2010) ซึ่งตัวอย่าง, blank และ Standards ถูกอ่านด้วย Bio-Rad Benchmark Plus® Microplate Spectrophotometer ที่ความเข้มแสง 530 นาโนเมตร

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การตรวจสอบข้อมูลที่ทำการศึกษา ตรวจสอบด้วยด้วยวิธี Descriptive statistics โดยพิจารณาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) สัมประสิทธิ์ความผันแปร (Coefficient of Variation; CV) ค่าต่ำสุด (minimum; min) ค่าสูงสุด (maximum; max) เพื่อตรวจสอบค่า outlier และใช้วิธี Normality plot with test เพื่อตรวจสอบข้อมูลที่ทำการศึกษาว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า P-Value ในตาราง Test of Normality ถ้า P>0.05 ข้อมูลจะมีการแจกแจงแบบปกติ และจะพิจารณาร่วมกับค่าความเบ้ (skewness) อยู่ในช่วง -0.8 ถึง 0.8 และความโด่ง (kurtosis) อยู่ในช่วง -3 ถึง 3 ถ้าค่าดังกล่าวเกินจากช่วงดังกล่าว จะทำการแปลงข้อมูล (Data transformation) เพื่อให้ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ

ทดสอบนัยสำคัญของอิทธิพลเนื่องจากอาหารที่แตกต่างกันต่อระดับของการ Expression ของยีน SOD, *CAT* และ *GPX* ระดับ n-3 PUFA และระดับ TBARS ในเนื้อไก่ ด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ในการทดสอบสมมุติฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี TUKEY และ Orthogonal contrast กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha \leq 0.05$ เพื่อเปรียบเทียบระดับของการ Expression ของยีน SOD, *CAT* และ *GPX* ในเนื้อไก่ และเนื้อเยื่อจากตับ ระดับ n-3 PUFA และระดับ TBARS ในเนื้อไก่ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน 6 กลุ่ม รวมถึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อ Antioxidant enzyme

gene ทั้งในเนื้อและตับ, Fatty acid Profile, TBARS โดยการหาค่า Pearson correlation coefficient (r) ด้วยโปรแกรม SPSS Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA)

บทที่ 4
ผลทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล

จากการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลพบว่าข้อมูลอยู่ในการกระจายตัวแบบปกติ โดยค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) สัมประสิทธิ์ความผันแปร (Coefficient of Variation; CV) ค่าต่ำสุด (minimum; min) ค่าสูงสุด (maximum; max) ไม่แสดงให้เห็นถึงการมีความผิดปกติของข้อมูล และในตาราง Test of Normality พบว่า P>0.05 แสดงถึงข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ โดยมีค่าความเบ้ (skewness) อยู่ในช่วง -0.8 ถึง 0.8 และความโด่ง (kurtosis) อยู่ในช่วง -3 ถึง 3

4.2 ผลการศึกษาผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil

4.2.1 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการสะสม กรดไขมัน ในเนื้อไก่

จากการศึกษาพบว่าไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในส่วนของกลุ่มกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated Fatty acid, SFA) (C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 ในทุกกลุ่มการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากงานของ Leyton, Drury, and Crawford (1987) พบว่า กรดไขมันประเภท Saturated Fatty acid (SFA) มีการถูก oxidize ในปริมาณที่ต่ำกว่ากรดไขมันที่ประเภท SFA เนื่องจากกรดไขมันที่ประเภท SFA ไม่มีพันธะคู่ในโมเลกุลทำให้ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา Oxidation และในงานวิจัยนี้ได้ทำการเสริมสาร Curcuminoid ในระดับที่ต่างกัน ซึ่งกลไกของ Curcuminoid คือการป้องกันการเกิด Oxidation ต่อกรดไขมัน โดยการลดปริมาณอนุมูลอิสระลงและลดความเสี่ยงที่จะเกิดปฏิกิริยา Oxidation ลง ดังนั้น กรดไขมันที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด Oxidation ที่ต่ำ จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการเสริม Curcumin และ Vitamin E เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

เช่นเดียวกันกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid, MUFA) (C16:1, C17:1, C18:1n-9, C20:1) พบว่าไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกกลุ่มการทดลอง โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งจากงานของ Leyton et al. (1987) พบว่าอัตราการเกิด Oxidation ของ MUFA นั้นต่ำกว่า กรดไขมันในกลุ่ม PUFA เนื่องจากจำนวนพันธะคู่ที่แตกต่างกัน ทำให้มีโอกาสในการเกิด Oxidation ได้น้อยกว่า ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าการเกิด

Oxidation ของ กรดไขมันประเภท MUFA อาจไม่มากพอที่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการเสริม Curcumin และ Vitamin E เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

แต่ในส่วนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งประกอบด้วย C18:2n-6, C20:4n-6, C18:3n-3, C20:5n-3, C22:6n-3 พบความแตกต่างกันของ Linoleic acid (C18:2n-6) โดย กลุ่ม Control, กลุ่มที่เสริม Vitamin E, กลุ่มที่เสริม Curcuminoid 40, 60 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในกลุ่มที่เสริม Curcuminoid 20, 80 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่ม Control, กลุ่มที่เสริม Vitamin E และ ในส่วนของ total n-6 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่เสริม Curcuminoid 20 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของกรดไขมันประเภท n-3 ในทุกกลุ่มการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า กรดไขมันประเภท PUFA มีความไวต่อการเกิด Oxidation สูง (Leyton et al., 1987; Sanz, Lopez-Bote, Menoyo, andBautista, 2000) และเป็นตัวหลักในการเกิด Lipid peroxidation ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่า C18:2n-6 (linoleic acid) เป็นไปตามผลการทดลองของงานวิจัยก่อนหน้า (Cortinas et al., 2005) และส่งผลให้เกิดความแตกต่างของ total n-6 เนื่องจากพบปริมาณที่มากที่สุดเมื่อเทียบสัดส่วนกับกรดไขมันประเภท PUFA ทั้งหมดที่พบ โดย Hang et al. (2018) ได้กล่าวไว้ว่าแหล่งของกรดไขมันชนิด C18:2n-6 (linoleic acid) พบได้ถึง 25% ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบว่ามีการสะสมมากกว่า PUFA ชนิดอื่นๆ โดยจากผลการทดลองในงานนี้พบว่ากลุ่มที่เสริม Curcuminoid ในระดับต่างๆ มีแนวโน้มที่จะพบการสะสมของ C18:2n-6 (linoleic acid) ในเนื้อเพิ่มขึ้น และจากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เสริม Antioxidant มีแนวโน้มที่จะพบการสะสมของกรดไขมันประเภท n-6 ในเนื้อมากขึ้น อาจแสดงให้เห็นได้ว่า แท้จริงแล้วกรดไขมันชนิด PUFA อาจถูก Oxidize โดยอนุมูลอิสระหรือ Reactive oxygen species (ROS) เพียงแต่ต้องมีการสะสมที่มากพอจึงจะสามารถพบนัยสำคัญได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.1 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อปริมาณกรดไขมันในเนื้อไก่

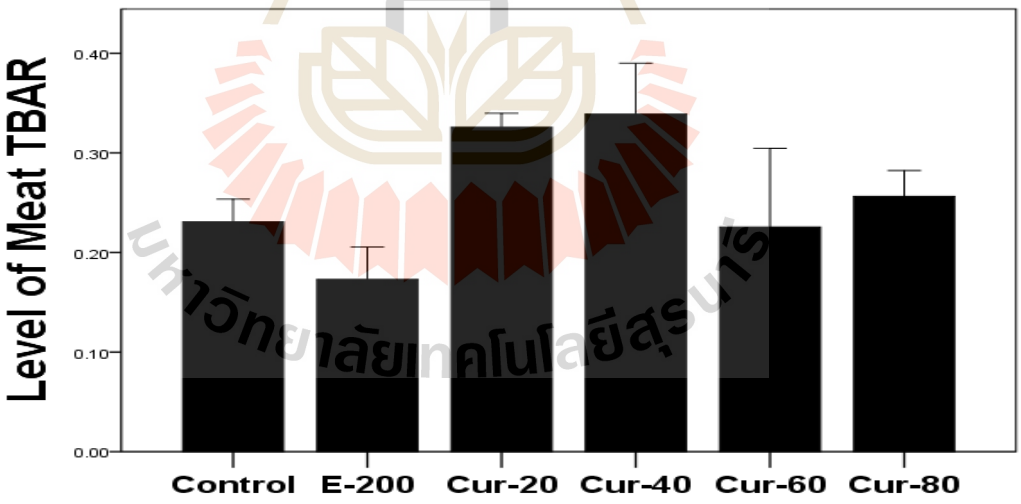
item	Treatment						SEM	*P*–Value
	Control[1]	E-200[2]	Cur-20[3]	Cur-40[4]	Cur-60[5]	Cur-80[6]		
C14:0	1.06	1.00	1.25	1.07	1.16	1.27	0.05	0.460
C16:0	25.08	25.61	24.82	25.81	25.64	23.76	0.30	0.403
C18:0	10.03	10.82	10.32	11.52	10.35	8.72	0.31	0.190
C20:0	0.70	0.51	0.27	0.34	1.12	0.34	0.11	0.176
C22:0	0.26	0.36	0.18	0.19	0.50	0.33	0.05	0.575
C16:1	1.57	1.30	1.41	1.48	1.60	2.67	0.16	0.109
C17:1	0.73	0.11	0.06	19.54	0.10	0.19	0.10	0.327
C18:1n-9	27.12	26.27	28.17	27.38	24.54	29.62	0.64	0.320
C20:1	0.21	0.14	0.31	0.11	0.33	0.46	0.06	0.547
C18:2n-6	16.20^{b}	15.94^{b}	19.54^{a}	16.98^{ab}	17.28^{ab}	19.39^{a}	0.43	0.028*
C20:4n-6	4.49	5.56	3.88	4.60	4.62	3.05	0.29	0.230
C18:3n-3	0.68	0.64	0.76	0.41	0.61	0.76	0.07	0.767
C20:5n-3	1.23	1.55	1.38	1.31	1.39	1.48	0.08	0.891
C22:6n-3	9.53	9.59	7.15	8.45	9.81	7.25	0.62	0.717
SFA	37.55	38.53	37.03	39.06	39.15	34.67	1.06	0.065
MUFA	29.94	27.98	30.09	29.09	26.82	33.17	1.71	0.205
PUFA	32.51	33.48	32.87	31.85	34.03	32.16	1.54	0.915
Total n-6	20.92^{b}	21.63^{ab}	23.53^{a}	21.66^{ab}	22.11^{ab}	22.60^{ab}	0.52	0.038*
Total n-3	11.58	11.85	9.34	10.20	11.92	9.56	1.65	0.763

1 = Control: basal diet + 4% Tuna oil; 2 = basal diet + vitamin E 200 mg/kg; 3 = basal diet + Curcuminoid 20 ppm; 4 = basal diet + Curcuminoid 40 ppm; 5 = basal diet + Curcuminoid 60 ppm; 6 = basal diet + Curcuminoid 20 ppm; *SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = Catalase; SFA = Saturated Fatty acid; MUFA = Monounsaturated fatty acid; PUFA = Polyunsaturated fatty acid * P-value < 0.05

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2.2 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อค่า Thio barbituric acid reactive substance, TBARS ในเนื้อไก่

ค่า TBARS ในเนื้อ เป็นค่าที่แสดงปฏิกิริยาการเกิด Oxidation ในเนื้อ พบว่าไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต (P - value > 0.05) โดยแสดงในรูปภาพที่ 4.1 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า มีการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อ แต่การเสริม Antioxidant ไม่ได้ทำให้ผลของการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่า สาร Curcumin มีผลในการลดการค่า TBARS ในเนื้อได้ (Sahin, Orhan, Tuzcu, Tuzcu, andSahin, 2012; J. Zhang et al., 2015; J. F. Zhang et al., 2015) แต่เมื่อวิเคราะห์จากงานวิจัยก่อนหน้าเช่นในงานของ J. F. Zhang et al. (2015) พบว่าในการทดลองมีการใส่ปัจจัยที่มีผลชัดเจนกับค่า TBARS เช่น อุณหภูมิที่สูง ซึ่งเหนี่ยวนำให้มีปริมาณของ ROS ที่สูงขึ้น มากพอจะทำให้พบนัยสำคัญของการทำงานของ Antioxidant แต่ในงานวิจัยนี้ปัจจัยที่จะมีผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS มีเพียงการเสริม 4% Tuna oil และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเท่านั้น ซึ่งอาจไม่เพียงพอจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS มากพอจนทำให้พบการทำงานของ Antioxidant อย่างมีนัยสำคัญได้



รูปภาพที่ 4.1 ผลของค่าที่แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อ (Meat TBARS) ; Control = basal diet + 4% Tuna oil; E-200 = basal diet + vitamin E 200 mg/kg; Cur-20 = basal diet + Curcuminoid 20 ppm; Cur-40 = basal diet + Curcuminoid 40 ppm; Cur-60 = basal diet + Curcuminoid 60 ppm; Cur-80 = basal diet + Curcuminoid 20 ppm

4.2.3 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ Antioxidant โดยการเสริมสาร Curcuminoid ที่ระดับต่างกันร่วมกับ Tuna oil พบว่า ทั้ง 3 ยีน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในตับและในเนื้อ (ตารางที่ 4.2) แต่พบว่าในส่วนของการแสดงออกของยีน *GPX* ในตับ และ *CAT* ในเนื้อ มีแนวโน้มที่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่า *P*-value เท่ากับ 0.07 และ 0.061 ตามลำดับ

จากรายงานของ Yarru et al. (2009) พบว่า การเสริม Turmeric (Curcuma longa) ร่วมกับ aflatoxin ซึ่งทำให้พบความแตกต่างของการแสดงออกของ ยีน *SOD* และ ในงานของ J. Zhang et al. (2015) พบว่าการเสริม Curcumin ในระดับที่แตกต่างกัน มีผลต่อเอนไซม์ CAT อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ SOD และ GPX ในไก่ Broiler โดยผลการศึกษาของงานวิจัยเหล่านี้ขัดแย้งกับผลการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 4.2 ผลของการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ใน เนื้อ และ ตับ ของไก่

Item	[1]Treatment							
	Control	**E200**	**Cur20**	**Cur40**	**Cur60**	**Cur80**	**SEM**	***P*-value**
Liver								
SOD	1.08	0.72	0.83	0.61	0.66	0.85	±0.07	0.37
CAT	1.22	0.76	0.88	1.14	1.31	1.60	±0.13	0.53
GPX	1.10	1.09	0.74	0.34	1.12	0.76	±0.09	0.07
Meat								
SOD	1.02	0.72	0.88	1.08	1.42	1.01	±0.08	0.169
CAT	1.06	0.80	1.47	1.22	2.02	1.05	±0.13	0.061
GPX	1.04	0.64	0.67	1.06	0.90	1.01	±0.06	0.161

[1]Control = basal diet + 4% Tuna oil; E200 = basal diet + vitamin E 200 mg/kg; Cur20 = basal diet + Curcuminoid 20 ppm; Cur40 = basal diet + Curcuminoid 40 ppm; Cur60 = basal diet + Curcuminoid 60 ppm; Cur80 = basal diet + Curcuminoid 80 ppm; *SOD* = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = Catalase

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสริม Curcuminoid ร่วมกันกับการเสริม Tuna oil 4% ไม่มีผลต่อความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Antioxidant enzyme (*SOD*, *CAT* และ *GPX*) อย่างมีนัยสำคัญ เพราะการทำงานของ Antioxidant Enzyme ยีน จะต้องถูกเหนี่ยวนำด้วย ROS (ApelandHirt, 2004) และการที่ Antioxidant Non-enzyme ยกตัวอย่างเช่น Curcumin จะมีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ได้นั้นก็จะต้องผ่านกลไกของการลดอนุมูลอิสระลง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ยีน (El-Bahr, 2015) อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ อาจไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS ภายในร่างกายได้ ทำให้กลไกของ Antioxidant Enzyme และ Non-Enzyme ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงซึ่งกันและกัน ทำให้ผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมมุติฐานและไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้

นอกจากนี้อีกเหตุผลหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ ที่เป็นสาเหตุทำให้การศึกษาในครั้งนี้พบว่า การแสดงออกของยีน Antioxidant Enzyme ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาร Curcumin ร่วมกับ Tuna oil กล่าวคือ การทดลองนี้ใช้ไก่ลูกผสมไก่พื้นเมือง โดยจัดเป็นไก่ชนิดที่มีการเจริญเติบโตช้า (Slow growing chicken) ซึ่งมีหลักฐานสนับสนุนว่า ไก่ในกลุ่มดังกล่าวสามารถทนต่อการเกิด Oxidative stress ได้มากกว่าไก่เนื้อที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เช่นในการศึกษาของ Castellini et al. (2002) ได้ทำการศึกษาไก่ 3 ชนิด โดยแบ่งเป็นชนิดที่มีการเจริญเติบโตที่ช้ามาก ชนิดที่มีการเจริญเติบโตที่ช้า และชนิดที่มีที่มีการเจริญเติบโตเร็ว โดยใช้รูปแบบการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิด โดยจากผลการทดลองพบว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ และในงานของ Aengwanich (2007) ได้ทำการทดลองในไก่พื้นเมืองไทย, ไก่ลูกผสมพื้นเมืองไทย และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า โดยใช้อิทธิพลของความร้อน โดยเก็บค่าสัดส่วน Heterophil/lymphocyte ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ในส่วนของไก่พื้นเมืองไทย และไก่ลูกผสมพื้นเมืองไทย มีค่าสัดส่วน Heterophil/lymphocyte ต่ำกว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน โดยจากข้อมูลนี้สามารถบ่งชี้ได้อีกนัยหนึ่งว่า ในไก่ชนิดที่มีการเจริญเติบที่ช้า สามารถทนต่อ Oxidative stress (โดย Heat stress เป็นประเภทหนึ่งของ Oxidative stress)ได้มากกว่าไก่ชนิดที่มีการเจริญเติบโตเร็ว ที่กล่าวมาจึงเป็นเหตุผลที่อภิปรายว่าเหตุใดการศึกษาในครั้งนี้ จึงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการแสดงออกของยีนในกลุ่ม antioxidant เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาร Curcumin ร่วมกับ Tuna oil

4.3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes กรดไขมัน n-3 PUFA และ ค่า TBARS

เนื่องจากไม่พบอิทธิพลการเสริม Curcuminoid ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน ทั้งในส่วนของตับและในส่วนของเนื้อในทุกกลุ่มการทดลอง ดังนั้นการหา

ค่าความสัมพันธ์ (correlation) ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนกับค่าสังเกตต่อจากนี้จะไม่ถูกจัดเป็นกลุ่มการทดลอง

4.3.1 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes กรดไขมัน n-3 PUFA

ผลของการหาความสัมพันธ์ระหว่างกรดไขมันที่สะสมในเนื้อกับการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ในตับ โดยไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางในทุกกลุ่มการทดลองที่ทำการหาความสัมพันธ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ผลของการหาความสัมพันธ์ระหว่างกรดไขมันที่สะสมในเนื้อกับการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ในเนื้อ พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของยีน *SOD* และ *GPX* กับกรดไขมัน C20:5n3 (Eicosapentaenoic acid, EPA)

จากงานของ Young and McEneny (2001) พบว่ากรดไขมันกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) นั้นสามารถเกิด Oxidation โดยอนุมูลอิสระหรือ ROS ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของกรดไขมันไม่อิ่มตัวไปเป็นสารอื่นที่เรียกว่า Lipid Peroxide ทำให้เกิดการสูญเสียกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว หรือลดการสะสมกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวลงในกรณีหากต้องการเพิ่มการสะสมกรดไขมันที่มีประโยชน์ในเนื้อได้

อย่างไรก็ตามจากงานของ Gumulec et al. (2013) พบว่า ร่างกายมีกระบวนการในการลดจำนวนของ ROS ลงเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในร่างกายที่มากเกินไป โดยกลไกของ Antioxidant enzyme ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้การทำงานร่วมระหว่างปฏิกิริยาร่วมกันของ Enzyme หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญที่ทำหน้าที่ในกลไกนี้คือ SOD CAT และ GPX ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เราศึกษาการแสดงออกของยีน ดังนั้น จึงพบว่า ระหว่างการทำงานของ Antioxidant enzyme และกรดไขมันมีความสัมพันธ์ร่วมกัน ก็ต่อเมื่อมี ROS เกิดขึ้นภายในร่างกาย โดยการที่พบความสัมพันธ์ในบางยีนและบางอวัยวะนั้น อาจส่งสัญญาณบางอย่างถึงการมีระดับ ROS ภายในอวัยวะนั้น โดยจากผลการทดลองการพบความสัมพันธ์ในทางลบของการแสดงออกของยีน *SOD* และ *GPX* ที่แสดงออกในเนื้อกับกรดไขมัน EPA ในเนื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ROS อาจไปมีผลกระทบต่อกรดไขมัน EPA ในเนื้อ ทำให้กรดไขมันลดลง อีกทั้ง ROS ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *SOD* และ *GPX* เพิ่มมากขึ้นเพื่อต้องการเอนไซม์มาควบคุมปริมาณของ ROS

ส่วนการที่ไม่พบความสัมพันธ์ในส่วนของยีน *CAT* อธิบายได้ว่าตามกลไกการทำงานของ Antioxidant enzyme หลังจากที่ SOD ทำการเปลี่ยน ROS เป็น H_2O_2 แล้ว ร่างกายจะเลือกใช้ปฏิกริยาได้สองทางคือ การใช้เอนไซม์ GPX เพื่อเปลี่ยน H_2O_2 เป็น H_2O และใช้เอนไซม์ CAT เพื่อเปลี่ยน H_2O_2 เป็น H_2O และ O_2 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการ O_2 ภายในร่างกาย Gumulec et al. (2013)

ซึ่งจากผลการทดลองอาจเป็นไปได้ว่า ภายใต้สภาวะการทดลองนี้มี O_2 เพียงพอแล้วจึงต้องการใช้เพียง Enzyme *GPX* ในการเปลี่ยน H_2O_2 เป็น H_2O เท่านั้น

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ของกรดไขมันที่สะสมในเนื้อกับการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ในตับและในเนื้อ

Gene expression	C18:3n3		C20:5n3		C22:6n3	
	R	*P*-value	R	*P*-value	R	*P*-value
Liver						
SOD	-0.080	0.732	-0.103	0.631	0.049	0.822
CAT	0.320	0.158	-0.105	0.626	-0.133	0.535
GPX	-0.390	0.081	0.237	0.265	0.249	0.240
Meat						
SOD	0.022	0.926	-0.431	0.035*	-0.243	0.253
CAT	0.198	0.389	-0.188	0.379	-0.227	0.286
GPX	0.155	0.503	-0.450	0.027*	0.255	0.229

SOD = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = Catalase * P-value < 0.05

ส่วนการที่ไม่พบความสัมพันธ์กับกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่นเช่น C18:3n-3 (α-Linolenic acid, ALA) หรือ C20:5n-3 (Docosahexaenoic acid, DHA) ตามกลไกในงานของ Gillingham (2013) พบว่าในส่วนของ ALA นั้นสามารถเปลี่ยนผ่านไปเป็น EPA ได้ ซึ่งตามผลการศึกษาในตารางที่ 4.1 พบว่า ALA มีการสะสมในเนื้อน้อยกว่า EPA ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ALA อาจไม่ถูก Oxidize ด้วย ROS ในขณะที่มีการสะสมทำให้ไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน แต่ในขณะที่ทำการเปลี่ยน ALA ไปเป็น EPA อาจถูก Oxidize ด้วย ROS จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ EPA มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน ทั้งนี้การที่ DHA ไม่มีความสัมพันธ์กับเนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสารอื่นทำให้อาจพบการถูก Oxidize ด้วย ROS ได้ยากกว่า EPA

จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายเชิงอนุมานได้ว่า การทดลองหาการแสดงออกของยีนด้วยการวัดระดับของ mRNA ซึ่งยังไม่ได้เปลี่ยนเป็น Enzyme อาจทำให้พบความสัมพันธ์ที่แตกต่างจากการวัดความสัมพันธ์กับระดับของ enzyme จากการศึกษาของ Vogel and Marcotte (2012) พบว่าผลการทดลองในระดับแสดงออกของยีนและระดับของการทำงานของ เอนไซม์ มี

ความสัมพันธ์กันเพียง 40% ขึ้นอยู่กับสภาวะการทดลอง โดยงานนี้วัดจากการหาค่าการแสดงออกของยีนโดยการวัดปริมาณของ mRNA และวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีน พบว่ามีค่า Pearson square correlation coefficient (R) ประมาณ 0.40 โดยพบว่าผลการศึกษานี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานก่อนหน้า(Abreu, Penalva, Marcotte, andVogel, 2009; Tobias, Marc, andLuis, 2009) ดังนั้นการพบความสัมพันธ์ของกรดไขมันและ Enzyme ยังต้องการข้อมูลสนับสนุนที่มากกว่านี้ จึงจะสามารถหาข้อสรุปได้ต่อไป

4.3.2 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme genes และ ค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBARS) ในเนื้อ

จากผลการศึกษาพบว่า ไม่พบความความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในทุกระหว่างการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนในอวัยวะตับและเนื้อกับค่า TBARS ในเนื้อไก่ โดยผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ของค่าที่แสดงถึงปฏิกิริยาการเกิด Oxidation (TBARS) ในเนื้อกับการแสดงออกของยีน *SOD CAT* และ *GPX* ในตับและในเนื้อ

Gene expression	Meat TBARS	
	R	*P*-value
Liver		
SOD	-0.004	0.983
CAT	0.167	0.434
GPX	-0.217	0.308
Meat		
SOD	-0.018	0.932
CAT	0.303	0.150
GPX	0.086	0.690

SOD = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = Catalase

จากการศึกษาของ Janero (1990) พบว่าค่า TBARS คือการวัดสารที่เป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ซึ่งพบว่าสามารถเป็นตัวชี้วัดการเกิด Lipid peroxidation ได้ และเป็นการแสดงว่าในร่างกายมีอนุมูลอิสระหรือ ROS อยู่มากหรือน้อยเพียงใด ในงานของ Gumulec et al. (2013) พบว่า กลไกของ Antioxidant enzyme สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระหรือ ROS ได้ ดังนั้น ค่าทั้ง

สองควรจะมีความสัมพันธ์ในเชิงแปรผกผันกัน แต่ในงานวิจัยนี้ไม่พบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน และค่า TBARS การที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้ อาจเป็นไปตามเหตุผลในงานของ Vogel and Marcotte (2012) ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ หรือโปรตีน มีความสัมพันธ์กันเพียง 40% โดยขึ้นอยู่กับสภาวะการทดลอง เช่น จากงานของ Abreu et al. (2009) ซึ่งพบว่าการทำงานของยีนไปจนถึงการเปลี่ยน mRNA ให้เป็นโปรตีนนั้นขึ้นอยู่การควบคุมกระบวนการหลังการ Transcription และ Translation ที่จะทำกระบวนการสร้างโปรตีนนั้นมี Variation เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมนั้นเข้ามามีผล แต่อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าค่า TBARS มีความสัมพันธ์กันกับการทำงานของเอนไซม์ ดังเช่นงานของ Srivastava, Austin, Shrivastava, Sethupathy, and Rajesh (2012) ที่พบความสัมพันธ์ของ ค่า TBARS และระดับของ Antioxidant enzyme แต่ในความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน ยังต้องการข้อมูลมาสนับสนุนต่อไป

4.3.3 ผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant enzyme genes และระหว่างการแสดงออกใน เนื้อ และ ตับ

จากผลการศึกษา ไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนในตับ แต่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของยีนของ *SOD* และ *GPX* ในอวัยวะเนื้อ โดยไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างการแสดงออกของยีน *CAT* ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ในส่วนของผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ Antioxidant enzyme ยีนในเนื้อและในตับ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบแนวโน้มของความสัมพันธ์ในเชิงลบระหว่างการแสดงออกของยีน *GPX* ในเนื้อกับในตับ (P-Value = 0.057) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากกลไกการทำงานของ Antioxidant enzyme ที่รายงานโดย Gumulec et al. (2013) พบว่าในระดับของโปรตีน เอนไซม์ทั้งสามมีกลไกการทำงานร่วมกันในการลดอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามในส่วนของอวัยวะตับ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการแสดงออกของยีน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ตามงานของ Vogel and Marcotte (2012) ที่กล่าวว่าการทำงานในระดับยีนและระดับโปรตีน มีความสัมพันธ์กันเพียง 40% ขึ้นอยู่กับสภาวะของการทดลอง ซึ่งในสภาวะการทดลองนี้นั้น ไม่พบความสัมพันธ์กันในระดับของการแสดงออกของยีนในตับ

ตารางที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant Enzyme ยีนในตับและในเนื้อ

Gene expression	***SOD***		***CAT***		***GPX***	
	R	***P*-value**	**R**	***P*-value**	**R**	***P*-value**
Liver						
CAT	0.181	0.396	-	-	-0.067	0.756
GPX	-0.125	0.560	-0.067	0.756	-	-
Meat						
CAT	0.206	0.335	-	-	0.765	-0.061
GPX	.455	0.025*	0.765	-0.061	-	-

SOD = superoxide dismutase; *GPX* = glutathione peroxidase; *CAT* = Catalase * P-value < 0.05

อย่างไรก็ตาม การพบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *SOD* และ *GPX* ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ในเชิงบวกอยู่ในส่วนของอวัยวะเนื้อ อาจเนื่องจากระดับการทำงานของโปรตีนนั้น เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งเป็นไปตามกลไกของ Gumulec et al. (2013) ที่พบว่าการทำงานของ Enzyme SOD กับ *GPX* มีการทำงานที่ต่อเนื่องกัน

ตารางที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant Enzyme ยีนในตับและ Antioxidant Enzyme ยีนในเนื้อ

Genes	***SOD*-M**		***CAT*-M**		***GPX*-M**	
	R	*P*-value	R	*P*-value	R	*P*-value
***SOD*-L**	-0.001	0.995	-0.108	0.615	0.146	0.497
***CAT*-L**	0.347	0.096	-0.021	0.924	0.273	0.196
***GPX*-L**	-0.016	0.940	0.052	0.808	-0.393	0.057

SOD-M = superoxide dismutase in meat; *GPX*-M = glutathione peroxidase in meat; *CAT*-M = Catalase in meat; *SOD*-L = superoxide dismutase in Liver; *GPX*-L = glutathione peroxidase in Liver; *CAT*-L = Catalase in Liver

การไม่พบความสัมพันธ์ของ Antioxidant enzyme ยีนระหว่างอวัยวะเนื้อและตับ แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ Antioxidant Enzyme ยีนไม่มีความสัมพันธ์กันและไม่ได้ทำงานร่วมกัน

แต่อย่างใด โดยพบว่าอาจเป็นไปตามการรายงานของ Seim, Ma, and Gladyshev (2016) ที่ทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในต่างเนื้อเยื่อกันในมนุษย์ และพบว่า การแสดงออกของยีนในตับกับในกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์กันในระดับที่ต่ำมาก ($R<0.14$) ดังนั้นการไม่พบความสัมพันธ์ของ Antioxidant enzyme ยีนระหว่างอวัยวะเนื้อและตับอาจเป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้า

พบแนวโน้มของความสัมพันธ์ในเชิงลบของ *GPX* ยีนในเนื้อและในตับ โดยงานของ Lenzen et al. (1996) พบว่าในส่วนของการแสดงออกในแต่ล่ะอวัยวะของ Antioxidant enzyme ยีนมีการแสดงออกที่ไม่เท่ากัน โดยในตับนั้นมีการแสดงออกที่มากกว่าในเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน คือ ROS ดังนั้นการทำงานของ Antioxidant enzyme ยีน จะขึ้นอยู่กับปริมาณของ ROS ในแต่ละอวัยวะ (Helmut Sies, 1993) ซึ่งการที่พบแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงลบของ *GPX* นั้น อาจบ่งบอกได้ถึงการมีระดับของ H_2O_2 ที่สัมพันธ์กันในเชิงลบที่เหนี่ยวนำให้ *GPX* แสดงออกไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งการเกิดของ H_2O_2 ได้มีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากการเปลี่ยน ROS ของ *SOD* ดังนั้นในเรื่องของความสัมพันธ์ของ Antioxidant enzyme ยีน ยังไม่สามารถสรุปได้และควรต้องมีการศึกษาต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากผลการศึกษาที่กล่าวในบทที่ 4 สรุปได้ว่าระดับของการเสริม curcuminoid ที่แตกต่างกันในอาหารไก่ที่มี Tuna oil ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) การเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ และ TBARS ที่แตกต่างกัน เมื่อทำการทดลองกับประชากรไก่โคราช และยังไม่สามารถนำยีนไปเข้าสู่กระบวนการการสร้าง Gene Marker ได้ เนื่องจากผลของอิทธิพลภายใต้สภาวะการทดลองนี้ยังไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามในงานทดลองนี้ได้พบความสัมพันธ์ของ antioxidant enzyme ยีนบางตัว ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ ดังนั้น จึงสามารถสร้างสมมุติฐานงานวิจัยต่อไปภายใต้สภาวะการทดลองแบบงานวิจัยนี้ ดังนี้

- การที่ไม่พบอิทธิพลของการเสริม curcuminoid ที่แตกต่างกันในอาหารไก่ที่มี Tuna oil ต่อการแสดงออกของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), Glutathione peroxidase (*GPX*), catalase (*CAT*) นั้นอาจเป็นไปได้ว่าระดับของ Tuna oil ซึ่งเป็นแหล่งของกรดไขมัน อาจไม่เพียงพอต่อการทำให้เกิด ROS และปฏิกิริยา Oxidation ทำให้ไม่พบอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนการเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่และTBARS ที่แตกต่างกัน ดังนั้น การเพิ่มระดับของ Tuna oil อาจส่งผลให้เกิดการสร้าง ROS ทำให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation และมีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีนได้
- ความสัมพันธ์ของยีนภายใต้สภาวะการทดลองนี้ อาจสามารถนำไปทำการทดสอบ Genetic Linkage เพราะยีนมีการทำงานที่สัมพันธ์กันและอาจมีแนวโน้มที่จะถ่ายทอดไปด้วยกัน ซึ่งสามารถทำการทดลองโดยใช้วิธีการ Parametric linkage analysis โดยอาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธ์ภายใต้อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมตามการทดลองนี้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทำงานวิจัยเพิ่มเติมภายใต้สมมุติฐานใหม่ที่ว่าด้วยการเพิ่มระดับของแหล่งของกรดไขมัน เพื่อทดสอบอิทธิพลที่มีผลต่อการแสดงออกของ Antioxidant enzyme ยีน โดยหากผลการทดลองออกมาพบว่าการสะสมกรดไขมันมีผลต่อการแสดงออกของยีน จะสามารถนำเอายีนเข้า

สู่กระบวนการทดสอบการเป็น Gene marker เพื่อใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธ์ภายใต้วัตถุประสงค์นี้ต่อไป

2. ควรมีการทดสอบความสัมพันธ์ของยีนที่พบความสัมพันธ์ในงานนี้ เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการทดสอบคุณสมบัติการเป็น Gene marker ภายใต้การทดสอบด้วยวิธีการ Parametric linkage analysis

รายการอ้างอิง

Abreu, R. d. S., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., andVogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Molecular bioSystems**. 5(12): 1512-1526.

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

Apel, K., andHirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**. 55(1): 373-399.

Aronson, W. J., Glaspy, J. A., Reddy, S. T., Reese, D., Heber, D., and Bagga, D. (2001). Modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated ratios with dietary fish oils in men with prostate cancer. **Urology**. 58(2): 283-288.

Berbert, A. A., Kondo, C. R. M., Almendra, C. L., Matsuo, T., andDichi, I. (20005). Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition.** 21(2): 131-136.

Bhabak, K. P., andMugesh, G. (2010). Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. **Accounts of Chemical Research**. 43(11): 1408-1419.

Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., andBanerjee, R. K. (2004). Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **CURRENT SCIENCE-BANGALORE**. 87: 44-53.

Chu, F. F., Doroshow, J. H., andEsworthy, R. S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. **J biol Chem**. 268(4): 2571-2576.

Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., andBaucells, M. D. (2005). Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. **Poultry Science**. 84(1): 48-55.

David., G. B., E., A. E., Rohini, S., Ailin, S., Junqi, Q., M., S. R., W., O. L., Tao, Y., Weixiong, Z., Xiaohong, J., andD., O. T. (2000). Antioxidant enzyme expression and reactive

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. **Cancer**. 89(1): 123-134.

Dhage, P. A., Kamble, L. K., andBhargava, S. Y. (2017). Localization and distribution of superoxide dismutase-1 in the neural tube morphogenesis of chick embryo. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 56: 1-9.

El-Bahr, S. M. (2013). Biochemistry of free radicals and oxidative stress. **Science International**, 1.

El-Bahr, S. M. (2013). Curcumin regulates gene expression of insulin like growth factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13(1): 1-11.

El-Bahr, S. M. (2015). Effect of Curcumin on Hepatic Antioxidant Enzymes Activities and Gene Expressions in Rats Intoxicated with Aflatoxin B1. **Phytotherapy Research**. 29(1): 134-140.

Farhoomand, P., andChecaniazer, S. (2009). Effects of graded levels of dietary fish oil on the yield and fatty acid composition of breast meat in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**. 18(3): 508-513.

Folch, J., Lees, M., andSloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**. 226(1): 497-509.

Franco, A. A., Odom, R. S., andRando, T. A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. **Free Radical Biology and Medicine**. 27(9-10): 1122-1132.

Franco, M. C., Dennys, C. N., Rossi, F. H., andEstévez, A. G. (2013). Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Gillingham, L. (2013). The metabolic fate of alpha linolenic acid (ALA). **Integr Healthc Pract Mag**. 72-80.

Gumulec, J., Raudenska, M., Hlavna, M., Stracina, T., Sztalmachova, M., Tanhauserova, V., Pacal, L., Ruttkay‐Nedecky, B., Sochor, J., andZitka, O. (2013). Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. **Experimental and therapeutic medicine**. 5(2): 479-484.

Hang, T. T. T., Molee, W., Khempaka, S., andParaksa, N. (2018). Supplementation with curcuminoids and tuna oil influenced skin yellowness, carcass composition, oxidation status, and meat fatty acids of slow-growing chickens. **Poultry Science**. 97(3): 901-909.

Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., Engler, M. M., Engler, M. B., andSacks, F. (2009). Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. **Circulation**. 119(6): 902-907.

Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**. 9(6): 515-540.

Kato, S., Ueno, T., Fukuzumi, S., andWatanabe, Y. (2004). Catalase Reaction by Myoglobin Mutants and Native Catalase:Mechanistic Investigation by Kinetic Isotope effect. **Journal of Biological Chemistry**. 279(50): 52376-52381.

Kitessa, S. M., andYoung, P. (2008). Echium oil is better than rapeseed oil in enriching poultry meat with n-3 polyunsaturated fatty acids, including eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid. **British Journal of Nutrition**. 101(5): 709-715.

Kong, B. W., Kim, H., andFoster, D. N. (2003). Cloning and Expression Analysis of Chicken Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. **Animal Biotechnology**. 14(1): 19-29.

Leick, C. M., Puls, C. L., Ellis, M., Killefer, J., Carr, T. R., Scramlin, S. M., England, M. B., Gaines, A. M., Wolter, B. F., Carr, S. N., andMcKeith, F. K. (2010). Effect of distillers dried grains with solubles and ractopamine (Paylean) on quality and shelf-life of fresh pork and bacon. **Journal of Animal Science**. 88(8): 2751-2766.

Lenzen, S., Drinkgern, J., andTiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**. 20(3): 463-466.

Leyton, J., Drury, P. J., andCrawford, M. A. (1987). Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. **British Journal of Nutrition**. 57(3): 383-393.

Liu, T.-Y., Tan, Z.-J., Jiang, L., Gu, J.-F., Wu, X.-S., Cao, Y., Li, M.-L., Wu, K.-J., andLiu, Y.-B. (2013). **Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells** (Vol. 13).

Lopez-Ferrer, S., Baucells, M., Barroeta, A., andGrashorn, M. (1999). n-3 enrichment of chicken meat using fish oil: alternative substitution with rapeseed and linseed oils. **Poultry Science**. 78(3): 356-365.

López-Ferrer, S., Baucells, M. D., Barroeta, A. C., Galobart, J., andGrashorn, M. A. (2001). n-3 Enrichment of Chicken Meat. 2. Use of Precursors of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: Linseed Oil. **Poultry Science**. 80(6): 753-761.

Ma, X., Liao, X., Lu, L., Li, S., Zhang, L., andLuo, X. (2016). Determination of Dietary Iron Requirements by Full Expression of Iron-Containing Enzymes in Various Tissues of Broilers. **The Journal of Nutrition**. 146(11): 2267-2273.

Medicine, I. o. (2005). **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington, DC: The National Academies Press.

Metcalfe, L., Schmitz, A. A., andPelka, J. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical chemistry**. 38(3): 514-515.

Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., andCereda, C. (2011). SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. **Neurology Research International**. 2011: 458427.

Ponte, P. I. P., Prates, J. A. M., Crespo, J. P., Crespo, D. G., Mourão, J. L., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Chaveiro-Soares, M. A., Ferreira, L. M. A., andFontes, C. M. G. A. (2008). Improving the Lipid Nutritive Value of Poultry Meat Through the Incorporation of a Dehydrated Leguminous-Based Forage in the Diet for Broiler Chicks. **Poultry Science**, 87(8): 1587-1594.

Pulla Reddy, A. C., andLokesh, B. R. (1994). Alterations in lipid peroxides in rat liver by dietary n-3 fatty acids: modulation of antioxidant enzymes by curcumin, eugenol, and vitamin E. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 5(4): 181-188.

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D. W., Smyth, C., Laing, N. G., Soriano, E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J., Rouleau, G. A., Gusella, J. S., Horvitz, H.

R., andBrown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**. 362(6415): 59-62.

Rozen, S., andSkaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics methods and protocols**. 365-386.

Rymer, C., andGivens, D. I. (2005). n-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: A review. **Lipids**. 40(2): 121-130.

Sadeghi, A. A., Iravani, H., Karimi-Torshizi, M., andChamani, M. (2012). Fatty acids profiles in meat of broiler chicks fed diet containing corn oil switched to fish oil at different weeks of age. **World Applied Science Journal**. 18(2): 159-165.

Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, Z., Tuzcu, M., andSahin, N. (2012). Curcumin ameloriates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. **Food and Chemical Toxicology**. 50(11): 4035-4041.

Sanz, M., Lopez-Bote, C. J., Menoyo, D., andBautista, J. M. (2000). Abdominal Fat Deposition and Fatty Acid Synthesis Are Lower and β-Oxidation Is Higher in Broiler Chickens Fed Diets Containing Unsaturated Rather than Saturated Fat. **The Journal of Nutrition**. 130(12): 3034-3037.

Seim, I., Ma, S., andGladyshev, V. N. (2016). Gene expression signatures of human cell and tissue longevity. **Npj Aging And Mechanisms Of Disease**. 2: 16014.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. 215(2): 213-219.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. 82(2): 291-295.

Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 60(9): 502-507.

Srivastava, K. C., Austin, R. D., Shrivastava, D., Sethupathy, S., andRajesh, S. (2012). A Case control study to evaluate oxidative stress in plasma samples of oral malignancy. **Contemporary Clinical Dentistry**. 3(3): 271-276.

Stanton, J. L., Wilton, S. D., andLaing, N. G. (1996). Characterisation of the chicken Cu,Zn superoxide dismutase gene. **DNA Seq**. 6(6): 357-360.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Swanson, D., Block, R., andMousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**. 3(1): 1-7.

Tobias, M., Marc, G., andLuis, S. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**. 583(24): 3966-3973.

Velasco, S., Ortiz, L. T., Alzueta, C., Rebolé, A., Treviño, J., andRodríguez, M. L. (2010). Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. **Poultry Science**. 89(8): 1651-1662.

Vogel, C., andMarcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature reviews. Genetics**. 13(4): 227-232.

Wang, C., Harris, W. S., Chung, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B., Jordan, H. S., andLau, J. (2006). n−3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 84(1): 5-17.

Wang, H.-T., Li, Y.-H., Chou, I. P., Hsieh, Y.-H., Chen, B.-J., andChen, C.-Y. (2013). Albusin B modulates lipid metabolism and increases antioxidant defense in broiler chickens by a proteomic approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 93(2): 284-292.

Yarru, L. P., Settivari, R. S., Gowda, N. K. S., Antoniou, E., Ledoux, D. R., andRottinghaus, G. E. (2009). Effects of turmeric (Curcuma longa) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. **Poultry Science**. 88(12): 2620-2627.

Young, I. S., andMcEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Biochemical Society Transactions**. 29(2): 358-362.

Yuan, D., Zhan, X. A., andWang, Y. X. (2012). Effect of selenium sources on the expression of cellular glutathione peroxidase and cytoplasmic thioredoxin reductase in the liver and kidney of broiler breeders and their offspring. **Poultry Science**. 91(4): 936-942.

Zelko, I. N., Mariani, T. J., andFolz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene

structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**. 33(3): 337-349.

Zhang, J., Hu, Z., Lu, C., Bai, K., Zhang, L., andWang, T. (2015). Effect of Various Levels of Dietary Curcumin on Meat Quality and Antioxidant Profile of Breast Muscle in Broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63(15): 3880-3886.

Zhang, J. F., Hu, Z. P., Lu, C. H., Yang, M. X., Zhang, L. L., andWang, T. (2015). Dietary curcumin supplementation protects against heat-stress-impaired growth performance of broilers possibly through a mitochondrial pathway1. **Journal of Animal Science**. 93(4): 1656-1665.

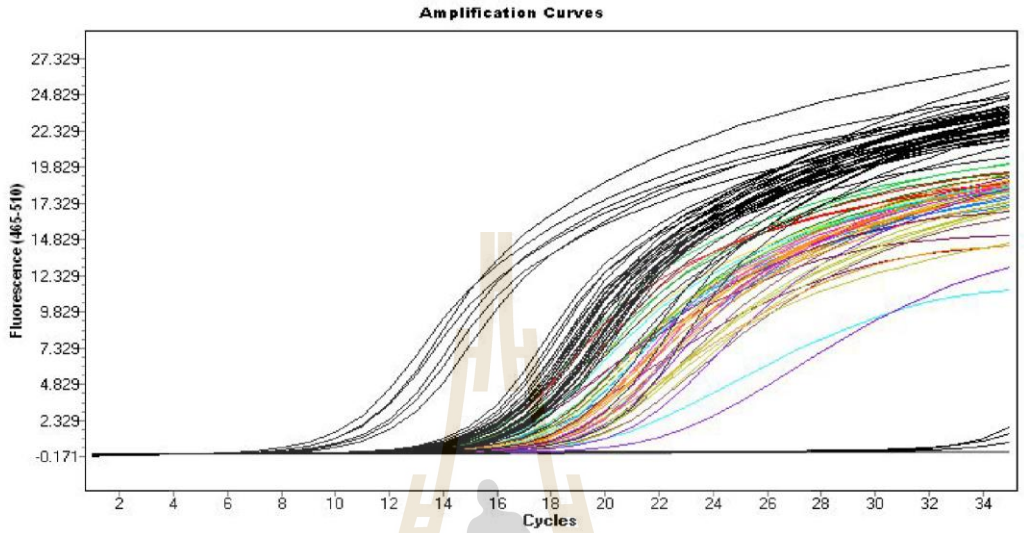
Zhang, Q., Chen, L., Guo, K., Zheng, L., Liu, B., Yu, W., Guo, C., Liu, Z., Chen, Y., andTang, Z. (2013). Effects of Different Selenium Levels on Gene Expression of a Subset of Selenoproteins and Antioxidative Capacity in Mice. **Biological Trace Element Research**. 154(2): 255-261.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

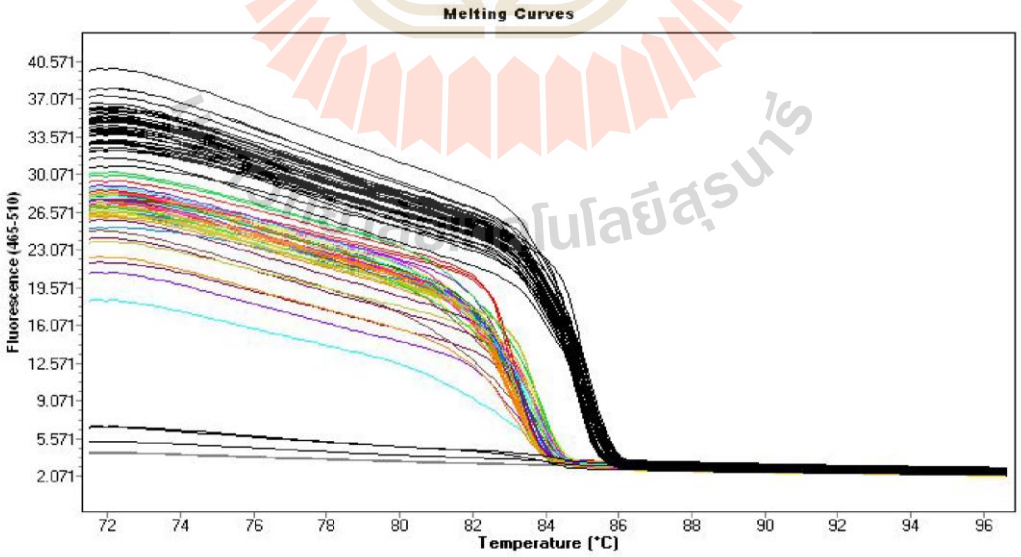
ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

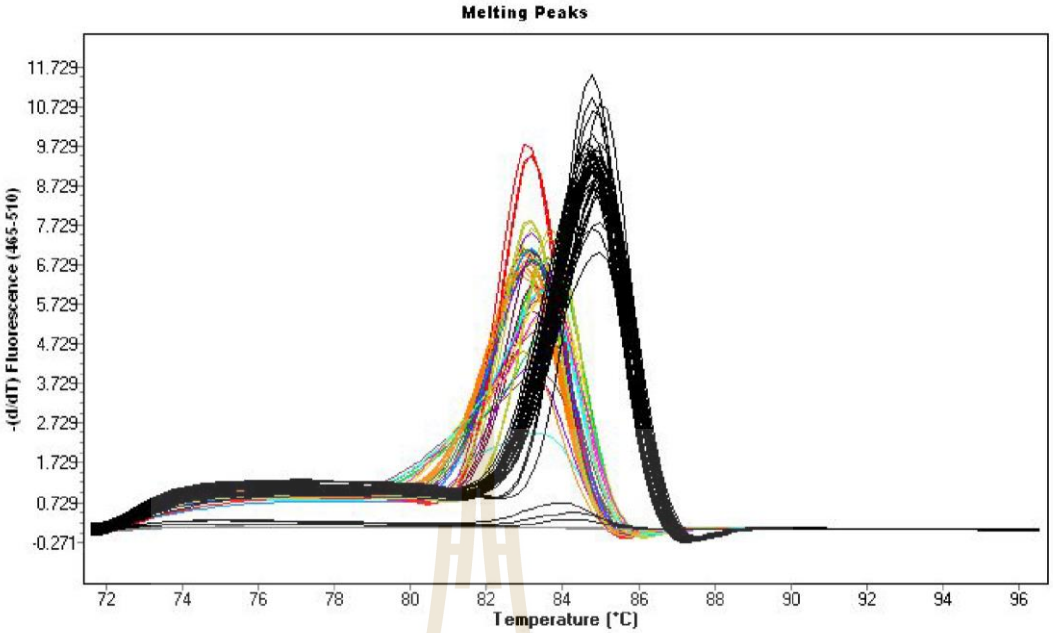
ภาพตัวอย่างประกอบการศึกษาเพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน Antioxidant enzyme gene



ภาพที่ ก.1 Amplification of antioxidant enzyme gene expression threshold of real-time PCR reaction



ภาพที่ ก.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) ด้วยเครื่อง Real-time PCR



ภาพที่ ก.3 Melting Curve ของ antioxidant enzyme ยีนและ *gadph* ยีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นายวิชพัฒน์ นามบัณฑิต เกิดเมื่อวันที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดนครราชสีมา เข้าศึกษาชั้นอนุบาลที่โรงเรียนเก้งเต็ก ศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนอนุบาลมณีราษฎร์คณาลัย และเข้าศึกษาชั้นมัธยมที่โรงเรียนห้วยแถลงพิทยาคม ต.ห้วยแถลง อ.ห้วยแถลง จ.นครราชสีมา เมื่อปี 2547 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี