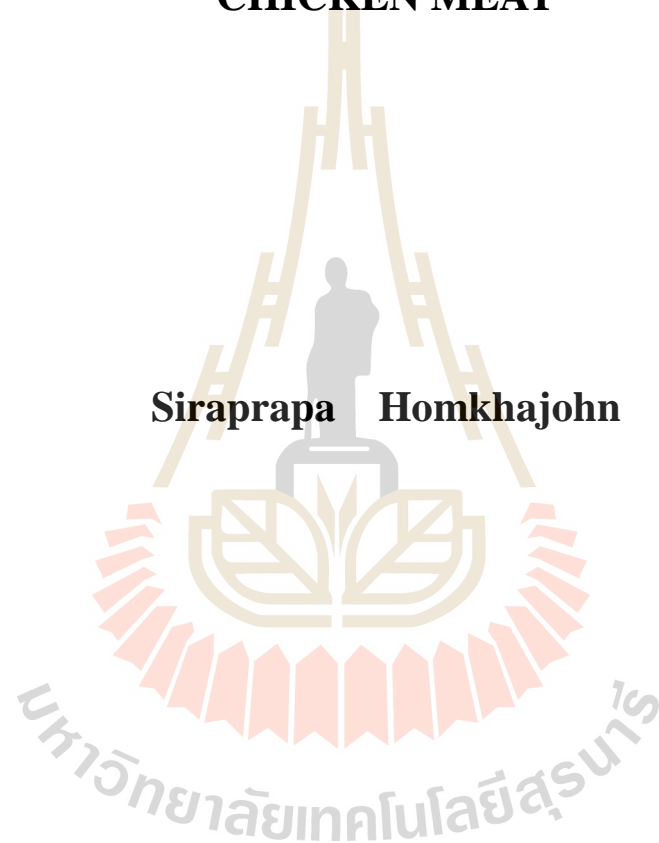


การแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและ
Antioxidant enzyme ต่อ การสะสมของ n-3PUFA ในเนื้อไก่



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2560

**THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN FATTY ACID
TRANSPORTATION AND ANTIOXIDANT ENZYME GENES
ON ACCUMULATION OF n-3 PUFA IN
CHICKEN MEAT**



**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

การแสดงผลของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและ Antioxidant enzyme ต่อ การสะสมของ n-3 PUFA ในเนื้อไก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)

ประธานกรรมการ



(รศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ฒ ลำปาง)

กรรมการ



(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)

กรรมการ

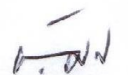
(รศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสาร)

กรรมการ



(ศ. ดร.สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล



(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ศิริประภา หอมขจร : การแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน และ Antioxidant enzyme ต่อ การสะสมของ n-3 PUFA ในเนื้อไก่ (THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN FATTY ACID TRANSPORTATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ON ACCUMULATION OF N-3 PUFA IN CHICKEN MEAT) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ โมฬี, 53 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ fatty acid transport protein 4 (*FATP4*), lipoprotein lipase (*LPL*) fatty acid transloase (*FAT/CD36*) and antioxidant enzyme genes (superoxide dismutase (*SOD*) และ catalase (*CAT*)) การสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA และค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBAR) ในเนื้อ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาร curcuminoid ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่า และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme โดยใช้ไก่โคราชจำนวน 480 ตัว แบบคละเพศ เมื่อไก่มีอายุ 21 วัน สุ่มไก่เข้าการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 6 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มการทดลอง มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว กลุ่มการทดลองที่ 1 ใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% เป็นกลุ่มควบคุมแบบ Negative control กลุ่มการทดลองที่ 2 ใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% และวิตามินอีที่ระดับ 200 ppm เป็นกลุ่มควบคุมแบบ Positive control กลุ่มที่ 3 4 5 และ 6 ใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 4% ร่วมกับสารเคอร์คูมินอยด์ที่ได้จากกากขมิ้นชันที่เหลือจากการสกัดสารเคอร์คูมิน (curcumin removes turmeric oleoresin) ที่ระดับ 20 40 60 และ 80 ppm ตามลำดับ เมื่อไก่อายุครบ 84 วัน จะทำการเชือดและเก็บอวัยวะ และเนื้ออก สกัด RNA เพื่อวัดการแสดงออกของยีน โดยใช้เทคนิค realtime PCR วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี TUKEY และหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน และยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme ด้วยวิธี correlation ระดับนัยสำคัญที่ $\alpha \leq 0.05$

ผลการศึกษาพบว่า พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของยีน Antioxidant enzyme กรดไขมัน n-3 PUFA และค่า TBAR และจากการหาความสัมพันธ์ พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีน antioxidant enzyme ในเนื้อ

จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า อาหารที่มีการเสริมสารเคอร์คูมินอยด์ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่ามีผลต่อการแสดงออกของยีน *LPL FATP4* และ *FAT/CD36* ที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ยีนดังกล่าวเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกไก่โคราชภายใต้การใช้อาหารที่มีการเสริมสารเคอร์คูมินอยด์ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่า เพื่อเพิ่มความสามารถในการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA ในไก่โคราช



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2560

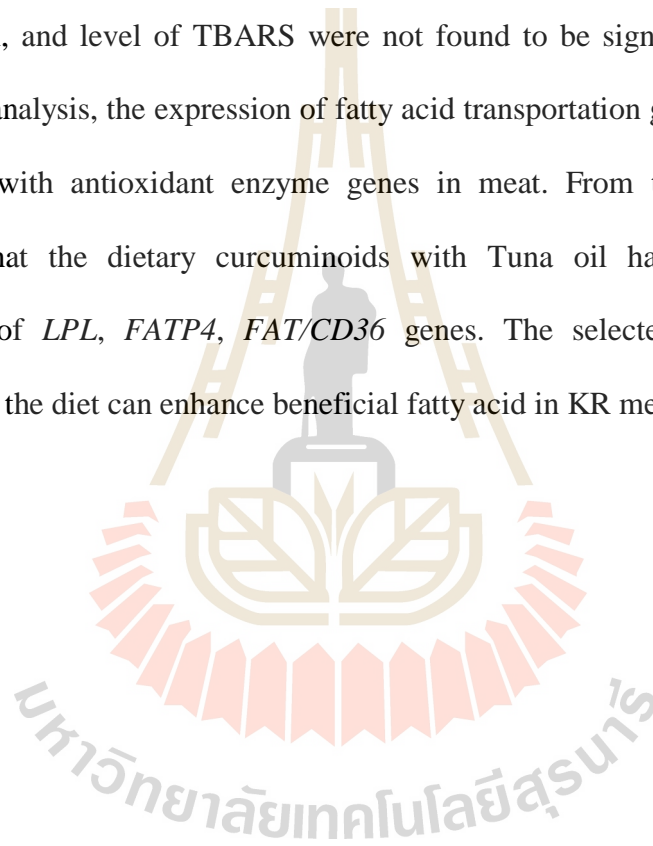
ลายมือชื่อนักศึกษา Sirapeepa
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [Signature]
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [Signature]
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [Signature]

SIRAPRAPA HOMKHAJOHN : THE EXPRESSION OF GENES
INVOLVED IN FATTY ACID TRANSPORTATION AND ANTIOXIDANT
ENZYME GENES ON ACCUMULATION OF N-3 PUFA IN CHICKEN
MEAT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMONRAT MOLEE,
Ph.D., 53 PP.

ANTIOXIDANT ENZYME/FATTY ACID TRANSPORT PROTEIN 4/N-3 PUFA/
LIPOPROTEIN LIPASE/FATTY ACID TRANSLOCASE

The objectives of this study were to study the expressions of the fatty acid transport protein 4 (*FATP4*), lipoprotein lipase (*LPL*), fatty acid translocase (*FAT/CD36*) and antioxidant enzyme genes (superoxide dismutase (*SOD*) and catalase (*CAT*)), n-3 PUFA accumulation, and lipid peroxidation (Thio barbituric acid reactive substance: TBARS), and the relationship between the expression of a gene involved in fatty acid transport and the expression of the antioxidant enzyme gene. A total of 480 21-day-old mixed-sex Korat chickens (KR) were assigned to a completely randomized design model (CRD) with 6 treatments and 4 replicates (pens) per treatment. Six experimental diets composed with negative control (4% Tuna oil; cont.), positive control diet supplemented with vitamin E at 200 ppm in basal diet, and the other experimental diets comprised of the basal diet supplemented with curcumin removed turmeric oleoresin to provide 20, 40, 60 and 80 ppm curcuminoids. At day 84, the chicken were slaughtered and the liver tissue and breast meat tissue were collected for RNA extraction. The expression of mRNA of each gene was measured by the effects of the dietary curcuminoids combination with tuna oil on the expression of the genes, fatty

acid composition in meat, and TBARS in meat. TURKEY was used for testing the significant difference between means. The relationship between the expression of fatty acid transportation genes and antioxidant genes were analyzed by correlation. The level of significance was $\alpha \leq 0.05$. The results found a significant effect on the dietary curcuminoids combination with tuna oil on the expression of fatty acid transportation genes, but the effects on the expressions of antioxidant enzyme genes, fatty acid accumulation, and level of TBARS were not found to be significant. Regarding the relationship analysis, the expression of fatty acid transportation genes had a significant relationship with antioxidant enzyme genes in meat. From the results, it can be concluded that the dietary curcuminoids with Tuna oil have an effect on the expressions of *LPL*, *FATP4*, *FAT/CD36* genes. The selected genes under these conditions of the diet can enhance beneficial fatty acid in KR meat.



School of Animal Production Technology

Academic Year 2017

Student's Signature Siwapa

Advisor's Signature A.

Co-advisor's Signature P. N. P.

Co-advisor's Signature W. M. U.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งขึ้น ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมฬี อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยี การผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการ ศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาช่วยแก้ปัญหาในทุกด้าน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้ง ช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง และ อ. ดร.วิทวัช โมฬี อาจารย์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการและให้คำแนะนำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ แพงคำ ท่านประธานในการสอบ วิทยานิพนธ์ และท่านคณะกรรมการที่ร่วมสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนัน ฒนสาร อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี ที่สละเวลาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเจ้าหน้าที่ศูนย์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ ในการดำเนินโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ศูนย์วิจัยไก่โคโรรา และสำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยในการดำเนินงานวิจัย ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน พี่และน้องนักศึกษابัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และ ถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิตการเรียนระดับ บัณฑิตศึกษา

ศิริประภา หอมขจร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย	4
1.7 เอกสารอ้างอิง.....	4
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กรดไขมันชนิด n-3 polyunsaturated fatty acid	5
2.2 อิทธิพลจากอาหารที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA และแหล่ง ของ n-3 PUFA ในอาหาร	6
2.2.1 อิทธิพลจากอาหารที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA.....	6
2.2.2 แหล่งของ n-3 PUFA ในอาหาร	7
2.3 กระบวนการย่อย คูดซิมและขนส่งกรดไขมันเข้าสู่ภายในเซลล์	8
2.3.1 กระบวนการย่อยกรดไขมัน.....	8
2.3.2 การคูดซิมกรดไขมัน.....	8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4	กระบวนการขนส่งกรดไขมันภายในร่างกาย.....	10
2.5	Lipoprotein lipase (LPL).....	11
2.6	กระบวนการขนส่งกรดไขมันผ่านเยื่อหุ้มเซลล์	12
2.7	ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันเพื่อนำไปสะสมในเซลล์.....	13
2.7.1	Fatty acid transport protein 4 (FATP4)	13
2.7.2	Fatty acid translocase of CD36 (FAT/CD36)	14
2.8	การเกิด lipid peroxidation.....	14
2.9	การต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย	15
2.9.1	บทบาทหน้าที่ของ Superoxide Dismutase: <i>SOD</i>	16
2.9.2	บทบาทหน้าที่ของ Catalase: <i>CAT</i>	17
2.9.3	Curcumin	18
2.10	เอกสารอ้างอิง.....	19
3	วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1	วิธีดำเนินการวิจัยและการเก็บข้อมูล	24
3.1.1	สัตว์ทดลองและการจัดการสัตว์ทดลอง.....	26
3.1.2	แผนการทดลอง.....	26
3.2	ค่าสังเกตที่ใช้ในการทดสอบสมมุติฐาน	29
3.3	การศึกษาระดับของ Gene expression.....	29
3.3.1	การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัด Total RNA.....	29
3.3.2	การสกัด Total RNA	29
3.3.3	การสังเคราะห์ first stand cDNA	30
3.3.4	ระดับปริมาณการแสดงออกของยีน <i>FATP4</i> , <i>LPL</i> , <i>FAT/CD36</i> ของยีน	30
3.4	การทำ Lipid Analysis โดยการใช้ Gas chromatography	31
3.5	การหาค่า TBAR (Thiobarbituric acid reactive substances) ในเนื้อ.....	31
3.6	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	32
3.7	เอกสารอ้างอิง.....	32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	
4.1 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อ fatty acids profile และ ค่า TBAR ในเนื้อ.....	34
4.1.1 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อ fatty acids profile ในเนื้อ	34
4.1.2 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBARS) ในเนื้อ.....	34
4.2 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีน Antioxidant enzyme	36
4.2.1 ผลของการเสริม curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีน <i>FATP4</i> , <i>LPL</i> และ <i>FAT/CD36</i> ในตับและเนื้อ	36
4.2.2 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme (SOD and CAT gene)	38
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme.....	39
4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในตับ.....	39
4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในเนื้อ	41
4.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ระหว่างเนื้อและตับ.....	42
4.6 เอกสารอ้างอิง.....	46
5 สรุปและข้อเสนอแนะ	49
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้เขียน	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แหล่งของ n-3 PUFA และ ระดับที่ต่างกันต่อปริมาณกรดไขมันที่สะสมในเนื้อไก่..... 6
2.2	fatty acid composition (%) in source of n-3 PUFA 7
3.1	Fatty acid profile of the meat..... 24
3.2	ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme (SOD and CAT gene) 26
3.3	สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่ในช่วงอายุ 0-21 วัน 27
3.4	สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่ในช่วงอายุ 22-84 วัน 28
3.5	สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่ในช่วงอายุ 22-84 วัน 31
4.1	ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน.....38
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในตับ 43
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในเนื้อ..... 44
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ระหว่างเนื้อและตับ 45

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	The biosynthesis of n-3 PUFA.....	5
2.2	ปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipase.....	8
2.3	องค์ประกอบของ mixed micelles.....	9
2.4	exogenous and endogenous pathway of lipid	11
2.5	Intestinal uptake of dietary fatty acids. Dietary fatty acids (FA) pass through the intestinal lumen whilst esterified to triacylglycerols (TAG) or incorporated into mixed micelles. chylomicrons (CM), free fatty acids (FFA)	12
2.6	Effects of fatty acid transporter overexpression in vivo in rat hindlimb muscle on fatty acid uptake and utilization, Panel A: Change in palmitate transport per unit change in fatty acid transporter Panel B: Change in palmitate oxidation per unit change in fatty acid transporter	13
2.7	Lipid peroxidation process	15
2.8	mechanism of Antioxidant enzyme	16
2.9	Common mechanism of scavenging O ₂ by SODs	17
2.10	mechanism of Catalase	17
2.11	Structure of curcuminoids contained in turmeric	18
2.12	Reaction pathway of curcumin with oxidizing radicals	19
3.1	ผลของค่าที่แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อ (Meat TBAR).....	25
ก.1	Amplification curve ของการแสดงออกของยีนที่ได้จากเครื่อง real time PCR รุ่น Roche480.....	52
ก.2	melting curve ของยีนที่ใช้ศึกษา (real time PCR รุ่น Roche480).....	52

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

<i>FATP4</i> gene	=	Fatty acid transport protein 4 gene
<i>FAT/CD36</i> gene	=	Fatty acid translocase gene
<i>LPL</i> gene	=	Lipoprotein lipase gene
n-3 PUFA	=	n-3 Polyunsaturated fatty acids
VLDL	=	Very low density lipoprotein
HDL	=	High density lipoprotein
LDL	=	Low density lipoprotein
<i>SOD</i> gene	=	Superoxide dismutase gene
<i>CAT</i> gene	=	Catalase gene
TBARS	=	Thio barbituric acid reactive substance
ALA	=	Alpha linolenic acid
ROS	=	Reactive oxygen species

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ไก่เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการประกอบอาชีพของเกษตรกร และเป็นการสร้างเอกลักษณ์ให้แก่สายพันธุ์ในด้านคุณภาพของเนื้อเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคเนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับเรื่องการรักษาสุขภาพและเลือกบริโภคอาหารที่มีประโยชน์มากขึ้นซึ่ง n-3 Polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) จัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายเนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ภายในร่างกายได้ (Teres, 2015) กรดไขมันในกลุ่ม n-3 PUFA มีบทบาทสำคัญต่อการช่วยลดการอักเสบ ลดการเกิดโรคหัวใจตีบ โรคมะเร็งและความดันสูง (Leitzmann, 2004) ดังนั้นการพัฒนาพันธุกรรมของไก่ให้สามารถสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA ในเนื้อสูงขึ้นจะเป็นการปรับปรุงพันธุ์ที่เน้นลักษณะที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ หากประสบความสำเร็จจะเป็นการสร้างเอกลักษณ์ให้แก่สายพันธุ์ในเชิงการค้าทำให้สามารถดำรงอยู่ในตลาดระดับบนได้อย่างเข้มแข็งอีกทั้งยังเป็นการสร้างทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคอีกด้วย

การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจให้มีลักษณะที่ต้องการดีขึ้นด้วยพันธุกรรม สัตว์จะสามารถแสดงลักษณะต่างๆ ได้ดีเท่าที่พันธุกรรมสามารถจะแสดงออกได้ แต่ในกรณีนี้ต้องการให้เนื้อไกมี n-3 PUFA ที่สูงขึ้นนั้นจะไม่สามารถทำได้โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากในร่างกายไก่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA ได้จึงต้องได้รับจากอาหารที่เป็นแหล่งของ n-3 PUFA เมื่อไก่ได้รับกรดไขมันเหล่านี้สามารถย่อยและดูดซึมเพื่อนำไปสะสมในร่างกายได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำความรู้ทางด้าน nutrigenomics มาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการพัฒนาอินทรีย์เครื่องมือเพื่อที่ช่วยแก้ไขข้อจำกัดที่กล่าวมาได้

เมื่อไก่ได้รับอาหารประเภทไขมันจะถูกส่งไปยังที่บริเวณลำไส้เล็กซึ่งในกระบวนการนี้จะมีโปรตีนและเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องกับหลายชนิดและจะเกิดกระบวนการดูดซึมกรดไขมันเข้าสู่ร่างกาย กรดไขมันจะดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กจะฟอร์มตัวในรูป chylomicron เพื่อดูดซึมเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองเพื่อส่งไปยังตับและเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน หลังจากนั้นจะเกิดการฟอร์มตัวของไขมันเป็น VLDL, HDL, LDL เพื่อส่งไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย เมื่อขนส่งมาสู่กล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อจะหลั่งเอนไซม์ lipoprotein lipase (*LPL*) ซึ่งมีหน้าที่ catalyzed VLDL และปลดปล่อยกรดไขมันและนำเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อโดยผ่านโปรตีนตัวพา จากการค้นคว้าพบว่ามียีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนตัวพาหลักอยู่ 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันสายยาว คือ Fatty acid transport protein 4 (*FATP4*) และ Fatty acid Translocase (*FAT/CD36*)

อย่างไรก็ตามกรดไขมันจะเกิดการเสียสภาพโดยการถูก oxidize และสูญเสียสภาพไป (Young, 2001) ทำให้ไม่สามารถนำกรดไขมันไปสะสมที่กล้ามเนื้อได้ทั้งหมดเนื่องจากในร่างกายของสัตว์จะมีกระบวนการที่เรียกว่า Antioxidant System ซึ่งมี 2 แบบคือแบบที่ใช้เอนไซม์ในระบบ (Enzymatic Antioxidant System) และแบบไม่ใช้เอนไซม์ในระบบ (Non-Enzymatic Antioxidant System) (Sies, 1993) โดยกระบวนการที่เป็น Enzymatic Antioxidant System เป็นกระบวนการที่เกิดจากตัวสัตว์เองโดยเอนไซม์หลักที่ทำงานในระบบนี้มี 2 ตัวคือ Superoxide dismutase (*SOD*), และ catalase (*CAT*) (Sies, 1997) และเอนไซม์ทั้ง 2 นี้เป็นผลผลิตของการทำงานของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*), และ gene catalase (*CAT*) และแบบไม่ใช้เอนไซม์คือ ขมิ้นเป็นพืชสมุนไพรที่พบมากในภูมิภาคเอเชีย มักจะนำมาใช้ในรูปของสารสกัดที่เรียกว่า Curcuminoids มีบทบาทในการกำจัด oxygen free radical ที่เป็นสาเหตุในการทำลายไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ซึ่งในการศึกษาวิจัยของ Chattopadhyay (2004); Pulla (1994); Yarru (2009) พบว่าสาร Curcuminoids มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ Antioxidant enzyme และลดการเกิด lipid peroxidation ที่ทำให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ จากบทบาทดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวจะมีบทบาทในการทำงานเกี่ยวกับการทำงานของ Superoxide dismutase (*SOD*) และ catalase (*CAT*) ด้วย

จากที่กล่าวมาเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการนำไปสู่เป้าหมายของการพัฒนาพันธุกรรม คือการพัฒนาให้ไก่สามารถสะสมกรดไขมันในกลุ่ม n-3 PUFA ได้ดียิ่งขึ้น โดยเพิ่มประสิทธิภาพการขนส่งกรดไขมันเพื่อนำไปสะสมและลดการเกิดกระบวนการ oxidation ของกรดไขมัน ดังนั้นการศึกษางานของ Fatty acid transport protein 4 (*FATP4*), Fatty acid Translocase (*FAT/CD36*), Lipoprotein lipase (*LPL*) และการทำงานของ Gene Superoxide dismutase (*SOD*) และ catalase (*CAT*) ร่วมกับการเสริมสารในกลุ่ม curcuminoid ในอาหารไก่ที่มีแหล่งของกรดไขมันกลุ่ม n-3 PUFA ต่อการเก็บสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ในครั้งนี้เพื่อนำความรู้นี้ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสินค้าหรือหมาร่วมกับการจัดการและพัฒนาทางด้านอาหาร

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันการเกิด oxidation ในเนื้อและตับของไก่โคราชที่ได้รับอาหารที่มี

แหล่งของกรดไขมันชนิด n-3 PUFA และมีการเสริมสาร Curcuminoids ในระดับที่ต่างกันต่อการสะสม n-3 PUFA และค่า TBAR ในเนื้อ

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันการเกิด oxidation

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

1.3.1 การแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและกระบวนการป้องกันการเกิด oxidation จะแตกต่างกันเมื่อไก่ได้รับการเสริมแหล่งกรดไขมันที่มี n-3 PUFA และการเสริม curcuminoids ในระดับที่แตกต่างกันและทำให้มีการสะสม n-3 PUFA และค่า TBAR ในเนื้อที่แตกต่างกันด้วย

1.3.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Antioxidant จะมีความสัมพันธ์กัน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเนื้อไก่โคราชที่อยู่ภายใต้งานวิจัยของ Mrs. Tran Thi Thuy Hang นักศึกษาปริญญาเอกสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเป็นผู้พัฒนาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่โคราช ซึ่งมี อ.ดร. วิทวัช โมพี เป็นที่ปรึกษาหลัก โดยที่สูตรอาหารที่ใช้ในครั้งนี้จะแสดงไว้ในส่วนของวิธีการวิจัยและการเก็บข้อมูล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 เพื่อให้ทราบว่า Fatty acid transport protein 4 (*FATP4*) ยีน และ Fatty acid translocase of CD36 (*FAT/CD36*), Lipoprotein lipase (*LPL*), Superoxide Dismutase (*SOD*) และ Catalase (*CAT*) และการเสริมอาหารที่กรดไขมัน n-3 PUFA มีอิทธิพลต่อการเก็บสะสมกรดไขมัน n-3 PUFA ในเนื้อไก่เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางในการปรับปรุงพันธุกรรมและการนำไปใช้เป็น gene maker

1.5.2 เพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและ Antioxidant enzyme ต่อการสะสม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจการทำงานของยีนในกลุ่มดังกล่าวว่ามีความสัมพันธ์กันในลักษณะใดและใช้กำหนดทิศทางการปรับปรุงพันธุกรรมโดยใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกที่จะใช้ร่วมกับอาหาร

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Superoxide Dismutase, Catalase, Fatty acid translocase, Fatty acid transport protein, Lipoprotein lipase, Curcuminoids, Gene Expression, Nutrigenomic

1.7 เอกสารอ้างอิง

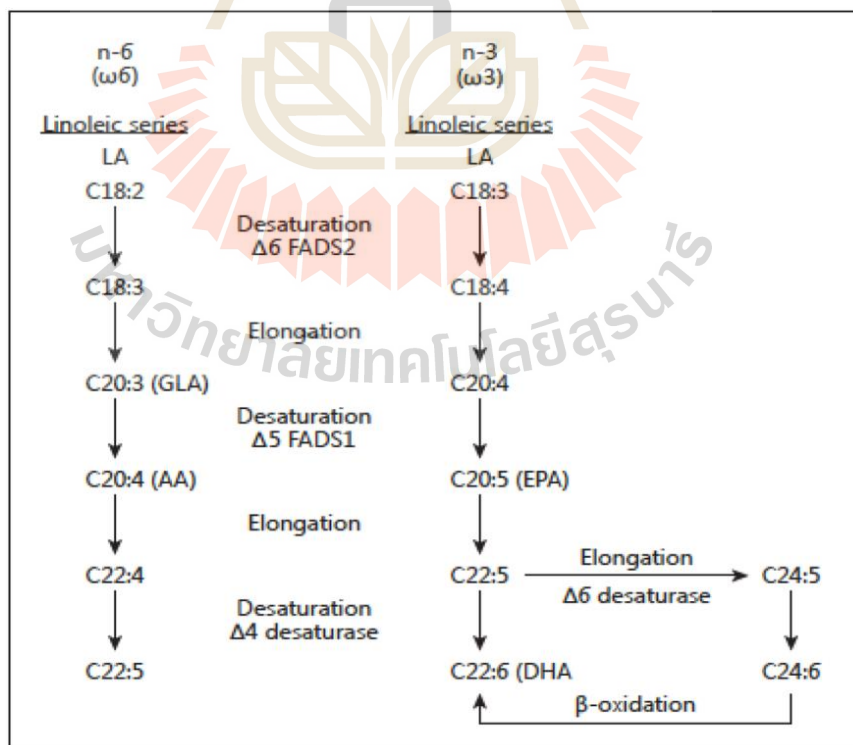
- Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay, and R. K. Banerjee. 2004. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **current science bangalore**: 44-53.
- Leitzmann, M., Stampfer, M., Michaud, D., Augustsson, K., Colditz, G., Willett, W., and, & Giovannucci, E. 2004. Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of prostate cancer. **American Journal of Clinical Nutrition** 80: 204-216.
- Pulla, R., A. C., and B. R. Lokesh. 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**: 181-188.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**: 213-219.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**: 291-295.
- Teres, G., Valencak, L. G., Sarah, Ohrnberger., Nicole J Culbert, and Thomas Ruf. 2015. Healthy n-6/n-3 fatty acid composition from five European game meat species remains after cooking. **biomed center**.
- Yarru, L. P., Settivari, R. S., Gowda, N. K. S., Antoniou, E., Ledoux, D. R., & Rottinghaus, 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 and Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease. **American Journal of Clinical Pathology** 54: 176-186.

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดไขมันชนิด n-3 polyunsaturated fatty acid

n-3 Polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) จัดเป็นกลุ่มของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสายยาว เป็นหนึ่งในกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายซึ่งในสูตรโครงสร้างมีพันธะคู่อยู่ไม่น้อยกว่า 3 คู่ โดยพันธะคู่แรกอยู่ที่บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 นับจากปลายด้านที่มีหมู่ methyl ซึ่งสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ n-3 PUFA คือ α -linolenic acid (ALA) แต่ในร่างกายสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์ ALA ได้ จึงต้องได้รับจากภายนอกร่างกายและในร่างกายจะมีการเปลี่ยนแปลง ALA ไปเป็นกรดไขมันที่มีสายยาวขึ้น เช่น EPA, DPA และ DHA แสดงดังรูป 2.1 โดยผ่านกระบวนการ desaturation เป็นกระบวนการเติมพันธะคู่และกระบวนการ elongation โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Δ_6 , Δ_5 -desaturase และ เอนไซม์ elongase



รูปที่ 2.1 The biosynthesis of n-3 PUFA. (Calder, 2012)

2.2 อิทธิพลจากอาหารที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA และแหล่งของ n-3 PUFA ในอาหาร

2.2.1 อิทธิพลจากอาหารที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA

ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันในเนื้อไก่แบ่งเป็น external (temperature, feeding) ซึ่งปัจจัยจากอาหารเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสม n-3 PUFA ในเนื้อ เนื่องจากกรดไขมันชนิด n-3 PUFA เป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เพราะไม่มีเอนไซม์ในการสังเคราะห์ จึงต้องได้รับจากแหล่งภายนอก คืออาหารซึ่งปริมาณกรดไขมันชนิด n-3 PUFA สามารถทำให้เพิ่มขึ้นโดยการใส่แหล่งที่มี n-3 PUFA เสริมในอาหารพบว่าปริมาณ EPA และ DHA ในเนื้อที่เพิ่มขึ้น (Koppenol, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mandal (2014) ที่พบว่าสัดส่วนของ n-6/n-3 ที่สูงมีผลทำให้การสะสมกรดไขมันชนิด n-6 และ n-3 PUFA ในเนื้อที่เพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นอาหารจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA ในเนื้อไก่ นอกจากนี้การใช้แหล่งของ n-3 PUFA ที่ต่างกัน ปริมาณที่ต่างกัน ส่งผลให้มีการสะสมกรดไขมันในเนื้อไก่ที่ต่างกันซึ่งแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แหล่งของ n-3 PUFA และ ระดับที่ต่างกันต่อปริมาณกรดไขมันที่สะสมในเนื้อไก่

Source of n-3 PUFA	Fatty acid				reference
	Total n-3 PUFA	Total SFA	Total PUFA	Total MUFA	
VO 2%	5.46 ± 0.31 ^b	39.55 ± 0.5 ^a	20.45 ± 0.57 ^b	41.73 ± 0.94 ^a	
LO 2%	16.53 ± 0.29 ^a	30.74 ± 0.31 ^b	36.26 ± 0.31 ^a	34.21 ± 0.25 ^c	
FO 2%	15.96 ± 0.35 ^a	30.57 ± 0.25 ^b	32.43 ± 0.25 ^a	38.69 ± 0.32 ^b	Ebeid
FO 2% + LO 2%	16.12 ± 0.22 ^a	31.48 ± 0.35 ^b	33.52 ± 0.35 ^a	36.99 ± 0.54 ^b	(2011)
FO 4%	14.68 ^a	45.18	29.76 ^b	24.47	
FO + LO	11.80 ^a	40.70	31.65 ^b	27.56	Ozpinar
FO+LO+SFO	8.56 ^b	40.27	34.18 ^b	24.85	(2002)
SO 6%	4.12 ^c	34.35	40.73 ^a	23.81	
LO 5%	12.91±0.73	27.40±2.27	36.87±1.99	35.73±2.39	Kristina
SFO 5%	2.06±0.13	27.13±1.49	36.90±1.78	35.97±1.10	(2014)

หมายเหตุ: VO = Vegetable oil LO = linseed oil FO = Fish oil SFO = sunflower oil SO = soy oil
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในตารางแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ (P<0.05)

จากตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าสารที่ใกล้เคียงกับกรดไขมันชนิด n-3 PUFA จากแหล่งที่ต่างกัน ส่งผลต่อการสะสมกรดไขมันชนิดต่างๆ ในเนื้อไก่แตกต่างกัน เนื่องจากแหล่งของ n-3 PUFA แต่ละแหล่งมีปริมาณของ n-3 PUFA ที่ไม่เท่ากันทำให้มีการสะสมในเนื้อต่างกัน

2.2.2 แหล่งของ n-3 PUFA ในอาหาร

ALA โดยทั่วไปเป็นองค์ประกอบของพืชใบเขียวมากกว่า 50% ของกรดไขมันทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามในพืชใบเขียวมีปริมาณไขมันที่ไม่สูงมากนักจึงไม่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ (Sarah, 2006) ซึ่งมักจะใช้แหล่งของ ALA ที่มาจากปลาทะเลและน้ำมันจากเมล็ดธัญพืช โดยแหล่งของกรดไขมันชนิด ALA แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 มีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงองค์ประกอบของกรดไขมันจากแหล่งของ n-3 PUFA ที่มักใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร

ตารางที่ 2.2 fatty acid composition (%) in source of n-3 PUFA.

Fatty acid (%)	SO ¹	TO ¹	SRDO ¹	SFL ¹	RB ¹	LO ²
C14:0	4.05	3.7	9.11	0.09	0.39	0.05
C15:0	0.31	0.33	0.85	nd	nd	-
C16:0	12.29	12.99	25.04	6.2	20.0	4.81
C17:0	0.17	0.32	0.71	0.02	nd	0.05
C18:0	2.94	3.24	4.53	2.8	2.1	3.03
C20:0	0	0	0.82	0.21	nd	0.20
C18:3(n-3)	2.55	3.67	0.69	0.16	0.45	54.24
C18:3(n-6)	0	0	0	nd	nd	-
SFAs	19.76	20.58	41.06	9.4	22.5	8.15
MUFAs	44.63	41.77	25.48	28.3	44.0	22.04
PUFAs	34.2	36.29	32.94	62.4	33.6	69.81

ND = not detected; ¹ Jana (2015) ² (Sugeng, 2014)

SFL- sunflower, RB- rice bran, salmon oil – SO, tuna oil –TO, sardine oil – SRDO, linseed –LO

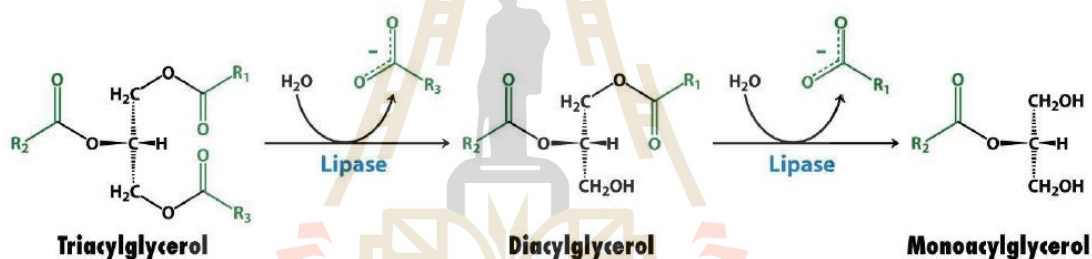
จากตารางที่ 2.2 พบว่า LO เป็นน้ำมันที่มีส่วนประกอบของ ALA ที่ดีเนื่องจากมีปริมาณ ALA มากกว่า 50% ของกรดไขมันทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีการผลิต

Tuna และ rice bran จำนวนมากทำให้มีปริมาณ Tuna oil และ rice bran oil มากเช่นกัน (Juturasitna et al., 2016) ดังนั้นจึงควรนำสิ่งที่มีภายในประเทศมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2.3 กระบวนการย่อย ดูดซึม และขนส่งกรดไขมันเข้าสู่ภายในเซลล์

2.3.1 กระบวนการย่อยกรดไขมัน

เมื่ออนุภาคของไขมันออกจาก gizzard และเข้าลำไส้เล็กจะเกิดการหลั่งน้ำดี ทำให้เกิดกระบวนการ emulsification ทำให้ไขมันมีอนุภาคเล็กเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับเอนไซม์ lipase ได้ดีขึ้น (Doreau, 1997) น้ำดีจะถูกควบคุมการหลั่งโดยฮอร์โมน secretin ที่สร้างจากลำไส้เล็ก ส่วนคูโอคินัมและฮอร์โมน Cholecystokinin ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ถูกกระตุ้นจากปริมาณไขมัน นอกจากนี้ปริมาณไขมันจะกระตุ้นให้ตับอ่อนมีการหลั่งเอนไซม์ lipase ทำหน้าที่ในการ hydrolyzed พันธะระหว่าง glycerol และ fatty acid ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ lipase แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipase

ที่มา: Doreau (1997)

จากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipase ทำให้ได้ monoglyceride, diglyceride, free fatty acid และ glycerol หลังจากนั้นกรดไขมันสายสั้นจะสามารถดูดซึมด้วยวิธี passive diffusion ไปยัง enterocyte และผ่านเข้าไปยัง plasma membrane

2.3.2 การดูดซึมกรดไขมัน

การดูดซึมกรดไขมันที่เซลล์เยื่อผนังลำไส้เล็กแบ่งออกเป็น 2 วิธีการดังนี้

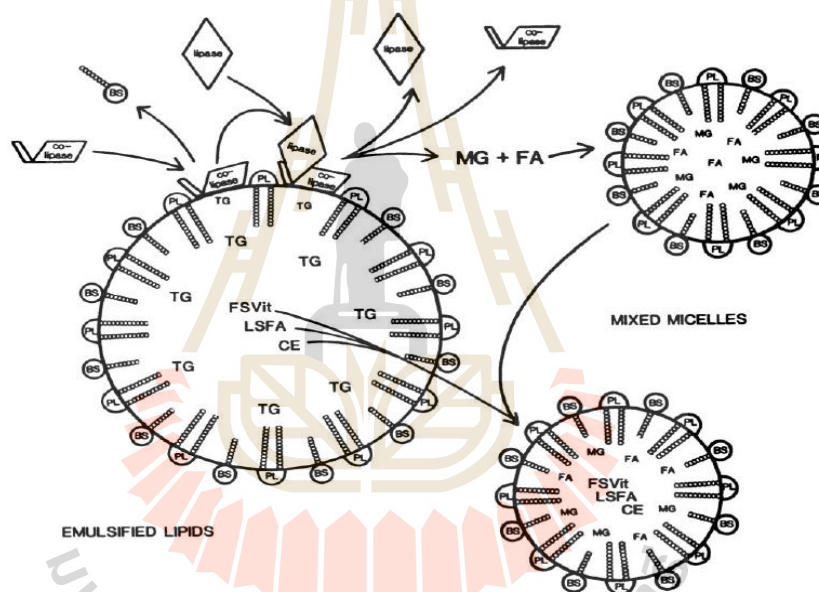
- การดูดซึมกรดไขมันผ่านหลอดเลือดดำ (Portal route)

ไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันขนาดสั้นปานกลางประกอบด้วยคาร์บอนประมาณ 8-10 อะตอมทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีกว่ากรดไขมันสายยาว ดังนั้นกรดไขมันกลุ่มนี้สามารถดูดซึม

เข้าสู่ลำไส้เล็กและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อส่งไปยังตับและส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Iqbal and Hussain, 2009)

- การดูดซึมกรดไขมันผ่านระบบน้ำเหลือง (lymphatic route)

กรดไขมันสายยาว diglycerides, fat soluble vitamin และ cholesteryl ester เป็นสารจำพวกที่ละลายน้ำได้ยากจึงไม่สามารถผ่านเข้าสู่ brush border membrane ได้ เนื่องจากบริเวณที่ชิดกับ brush border membrane เป็นบริเวณที่มีน้ำครอบคลุมอยู่ เรียกว่า unstirred water layer ดังนั้นจึงต้องรวมตัวกันเป็น mixed micelles (Fitzgerald, 2015) องค์ประกอบของ mixed micelles แสดงดังรูปที่ 2.3 ซึ่งจะจัดเรียงตัวโดยเอาด้านที่ไม่มีขั้วไว้ด้านในและผ่านเข้าสู่เซลล์ผนังลำไส้ น้ำดีจึงจะแยกออกจาก mixed micelles



รูปที่ 2.3 องค์ประกอบของ mixed micelles

ที่มา: (Lake and Organisciak, 1984)

(BS- bile salt; CE- cholesteryl ester; FA- free fatty acid; FSVit- Fat soluble vitamins; LSFA- long chain saturated fatty acid; MG- monoglyceride; PL- phospholipid; TG- triglycerides)

เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ของลำไส้เล็กแล้ว monoglycerides และกรดไขมันสายยาวจะเกิดการรวมตัวกันเป็น triglycerides อีกครั้งเรียกว่า re-esterification หลังจากนั้นจะฟอร์มตัวอยู่ในรูป chylomicrons โดยในไก่อจะเรียกว่า Portomicrons และเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองเพื่อขนส่งไปยังกระแสเลือด (Fraser, 1986) เพื่อขนส่งไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายต่อไป

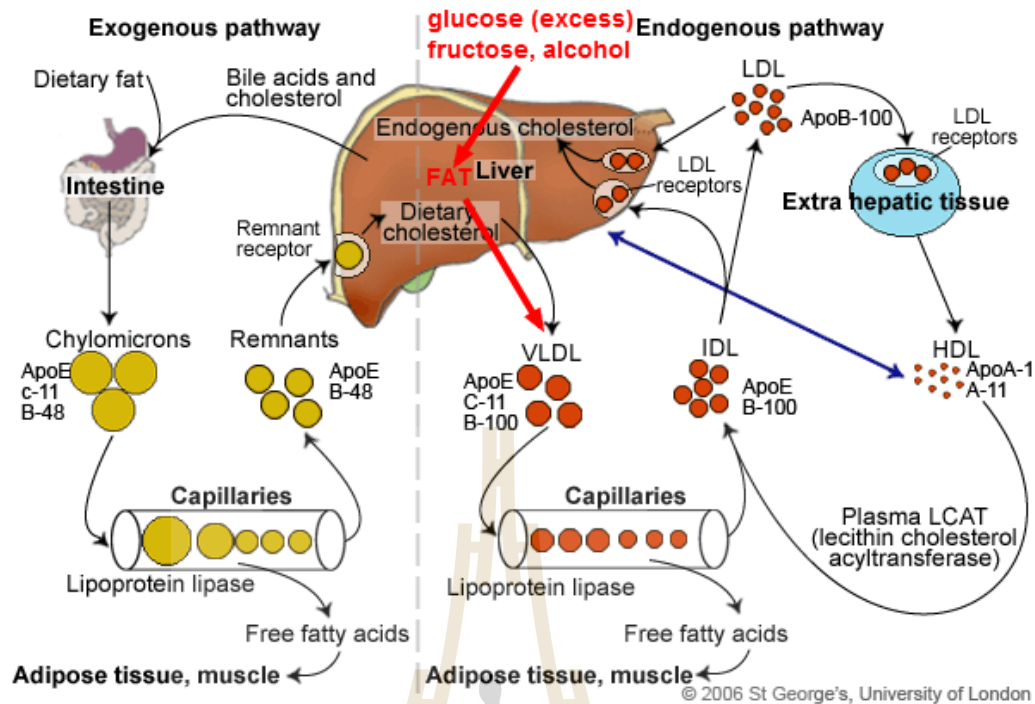
2.4 กระบวนการขนส่งกรดไขมันในร่างกาย

กระบวนการขนส่งกรดไขมันในร่างกายแบ่งออกเป็น 2 แบบหลักดังนี้

- Exogenous pathway (แสดงดังรูปที่ 2.4) เป็นการขนส่งไขมันที่ได้รับจากอาหารไปยังตับ เซลล์ไขมัน และกล้ามเนื้อ เพื่อเก็บสะสมหรือสลายเป็นพลังงาน การขนส่งไขมันด้วยวิธีนี้ เริ่มต้นที่ การดูดซึมไขมันในทางเดินอาหาร โดย triglyceride จะถูกย่อยโดย pancreatic lipase ได้เป็น monoglyceride, diglyceride, free fatty acid และ glycerol แล้วถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กใน รูป micelle (โดยอาศัย bile acid) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้แล้ว short-chain fatty acid จะผ่านเข้าสู่ กระแสเลือดได้โดยตรง และจะถูกขนส่งไปที่ตับโดย albumin ส่วน long-chain fatty acid จะถูกเซลล์ เยื่อบุลำไส้เล็กสังเคราะห์กลับไปเป็น triglyceride อีกครั้ง triglyceride ในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กจะ รวมกับ phospholipid, cholesteryl ester และ Apoprotein B48 (Apo B48) โดยการทำงานของ microsomal triglyceride transfer protein (MTP) และฟอร์มตัวเป็น chylomicron ถูกส่งออกจาก ลำไส้เล็กทางน้ำเหลือง และเข้าสู่กระแสเลือดที่ thoracic duct โดย chylomicron จะได้รับ apo C และ apo E จาก HDL ในกระแสเลือด ซึ่ง apo CII จะกระตุ้นการทำงานของ lipoprotein lipase (LPL) ที่ เกาะอยู่กับ proteoglycans บนผิวเซลล์ endothelium ของหลอดเลือดฝอยในอวัยวะต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อลาย หัวใจ และเนื้อเยื่อไขมัน ทั้งนี้ LPL จะสลาย triglyceride ที่ core ของอนุ chylomicron ได้เป็น free fatty acid ซึ่งจะถูกนำเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อและ adipocyte

- Endogenous pathway กรดไขมันที่สะสมในร่างกายส่วนมากจะอยู่ในรูป triglyceride ซึ่ง หลังจากที่มีการสังเคราะห์กรดไขมันแล้วจะถูกส่งไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน ด้วยกระบวนการ endogenous pathway (แสดงดังรูปที่ 2.4) ซึ่งเป็นกระบวนการในการขนส่ง triglyceride ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จากตับไปยังเซลล์ต่างๆในร่างกายโดยแหล่งที่มาของ triglyceride ในกระบวนการนี้จะมาจาก de novo lipogenesis และ free fatty acid ที่ถูกนำเข้าสู่ตับ ใน กระบวนการนี้ triglyceride ในเซลล์ตับจะถูกนำมารวมกับ Apolipoprotein B100 (Apo B100), phospholipid, cholesteryl ester และวิตามินอี โดยการทำงานของ MTP รวมตัวกันเป็น lipoprotein คือ Very low density lipoprotein (VLDL), High density lipoprotein (HDL) และถูกส่งเข้าสู่กระแส เลือดไปยังเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกายหลังจากนั้น triglyceride ที่ core ของอนุ VLDL จะถูกสลายโดย ฤทธิ์ของ LPL ซึ่งถูกกระตุ้นโดย apo CII ได้เป็น Free fatty acid

จากการศึกษากระบวนการขนส่งกรดไขมัน ไปสะสมที่เนื้อเยื่อพบว่ามีเอนไซม์ lipoprotein lipase เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการสะสมกรดไขมันในกล้ามเนื้อและ Adipose tissue ซึ่งจะแสดงโดย ละเอียดในหัวข้อถัดไป



รูปที่ 2.4 exogenous and endogenous pathway of lipid

ที่มา : Catherine (2014)

2.5 Lipoprotein lipase (LPL)

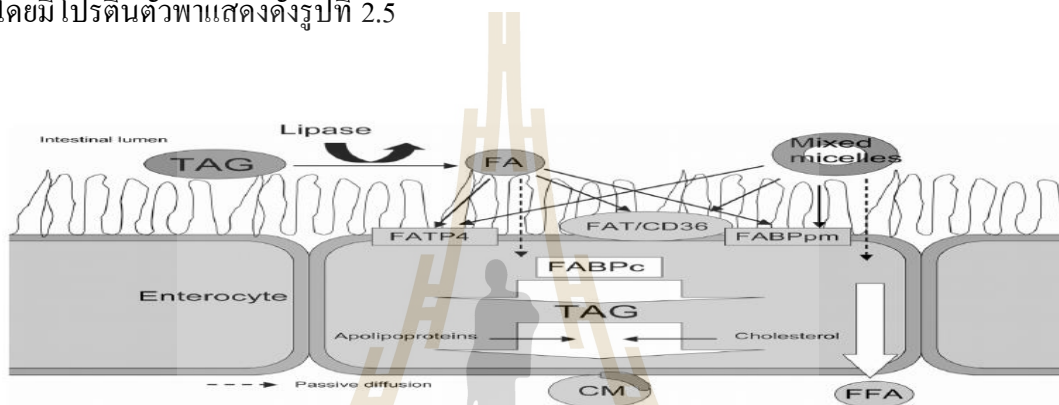
เอนไซม์ lipoprotein lipase (*LPL*) เป็น glycoprotein enzyme (Hoeing et al., 2006) จัดเป็น rate limiting step (Choi et al. (1995); Weinstock et al. (1997)) มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันในพลาสมา เอนไซม์ lipoprotein lipase ถูกสร้างจาก *LPL* gene จะแสดงออกที่บริเวณกล้ามเนื้อ คับและ Adipose tissue สร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในกระแสเลือดเพื่อปลดปล่อยกรดไขมันและนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อสะสมและสร้างพลังงาน จากการศึกษาการแสดงออก *LPL* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอย่างเช่น หมู มีความสัมพันธ์กับไขมันในกล้ามเนื้อ (Goldberg et al., 2009) และการศึกษาในไก่สายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการแสดงออกของ *LPL* ซึ่งไก่ที่มีการแสดงออกของ *LPL* mRNA ในปริมาณที่สูงจะมีปริมาณไขมันในกล้ามเนื้อที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย (Huang 2015) ดังนั้น *LPL* น่าจะมีผลต่อการสะสมกรดไขมัน n-3 PUFA ที่เพิ่มสูงขึ้นภายใต้การจัดการทางด้านอาหารที่มีแหล่งของกรดไขมัน n-3 PUFA

LPL อยู่บนโครโมโซม Z โดยใช้ Forward Primer 5'AGGAGAAGAGGCAGCAATA-3' และ Reverse Primer คือ 5'-AGCCAGCAGCAGATAAG-3' (Huang 2015)

นอกจากนี้เนื้อเยื่อแต่ละชนิดจะมีโปรตีนตัวพาที่ทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งกรดไขมันเข้าสู่ภายในเซลล์

2.6 กระบวนการขนส่งกรดไขมันผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

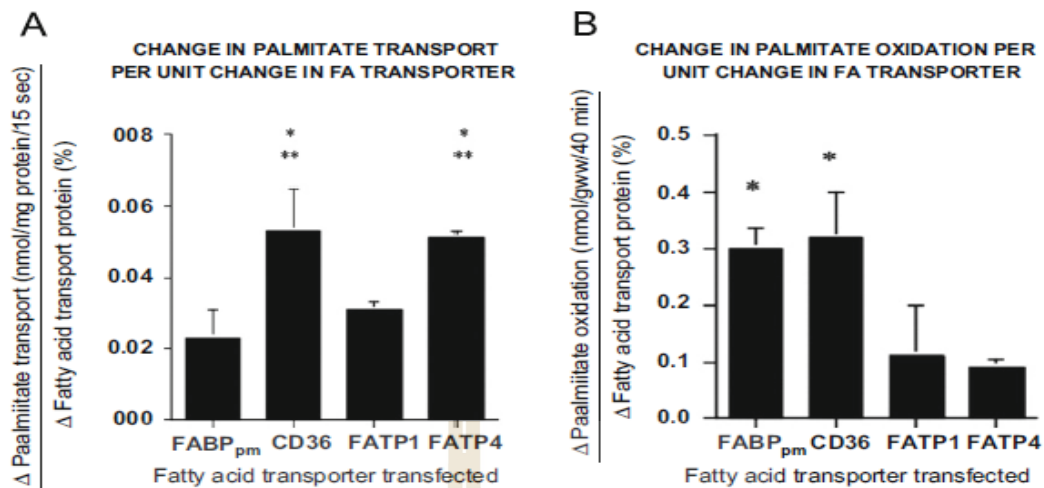
Long-chain fatty acid (LCFAs) มีความเป็น hydrophobicity ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว ไม่สามารถยึดจับกับน้ำได้ ทำให้ยากต่อการขนส่งกรดไขมันเข้าสู่ลำไส้เล็กเพื่อดูดซึมและขนส่งไปยังตับเพื่อสร้างพลังงานหรือขนส่งไปยังกล้ามเนื้อเพื่อเก็บสะสม จึงจำเป็นต้องมีการขนส่งที่จำเพาะ โดยมีโปรตีนตัวพาแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 Intestinal uptake of dietary fatty acids. Dietary fatty acids (FA) pass through the intestinal lumen whilst esterified to triacylglycerols (TAG) or incorporated into mixed micelles. chylomicrons (CM), free fatty acids (FFA).

ที่มา: Masson (2010)

จากรูปภาพที่ 2.5 จะพบว่า มีโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่ภายในร่างกายอยู่ 3 ชนิดหลักๆ คือ FATP4, FAT/CD36 และ FABP แต่จากการค้นคว้าพบว่า FATP4 มีการทำงานเกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันสายยาวและ FAT/CD36 มีหน้าที่ทั้งขนส่งกรดไขมันสายยาวและควบคุมกระบวนการ fatty acid oxidation ส่วน FABP จะควบคุมการเกิดกระบวนการ fatty acid oxidation (Nickerson, 2009) แสดงดังรูปภาพที่ 2.6 ซึ่งบทบาทหน้าที่ของ FATP4 และ FAT/CD36 จะแสดงรายละเอียดไว้ในส่วนถัดไป



รูปที่ 2.6 Effects of fatty acid transporter overexpression in vivo in rat hindlimb muscle on fatty acid uptake and utilization. Panel A: Change in palmitate transport per unit change in fatty acid transporter Panel B: Change in palmitate oxidation per unit change in fatty acid transporter.

ที่มา: Nickerson (2009)

2.7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันเพื่อนำไปสะสมในเซลล์

2.7.1 Fatty acid transport protein 4 (FATP4)

FATP4 Gene หรือ *solute carrier family 27A4 (SLC 27A4)* เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ membrane มีหน้าที่หลักคือขนส่ง long chain fatty acid (LCFAs) เข้าสู่เนื้อเยื่อ

ในมนุษย์พบว่า มีการแสดงออกบริเวณตับและลำไส้เล็ก แต่ในไก่พบว่า *FATP4* มีการแสดงออกในหลาย tissue และมีการแสดงออกสูงที่สุดในบริเวณลำไส้เล็ก รองลงมาคือกล้ามเนื้อ abdominal fat และตับ (Yan, 2012)

ในหนูพบว่าเมื่อทำการ knockdown *FATP4 gene* ส่งผลให้ปริมาณการนำกรดไขมันสายยาวเข้าสู่เซลล์ลดลงและเมื่อ *FATP4 gene* มีการแสดงออกในปริมาณที่สูงจะทำให้ LCFA เข้าสู่เซลล์ในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย (Stahl et al., 1999) และในไก่การศึกษา polymorphism ของ *FATP4 gene* ต่อลักษณะซากพบว่า polymorphism ที่ต่างกันส่งผลต่อลักษณะซากในบางลักษณะที่ต่างกัน (Yan, 2012)

ดังนั้น *FATP4 gene* มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็น gene marker อีกทั้งหาก *FATP4 gene* ทำงานได้ดี จะส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันสายยาวในเซลล์เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ เนื่องจาก *FATP4* มี

ความสำคัญในการขนส่ง Long chain Fatty acid ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งการแสดงออกของ *FATP4* เกี่ยวข้องกับปริมาณไขมันที่ได้รับเข้าไป

FATP4 gene ในไก่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 โดยใช้ Forward Primer คือ 5'-CATCACCATTCTCCAACCTCCAG-3' และ reverse primer คือ 5'-GACTCAGGGCTTCTCCT-3' มีขนาด product length เท่ากับ 126 bp ประกอบด้วย 15 exon (Yan, 2012)

2.7.2 Fatty acid translocase of CD36 (FAT/CD36)

FAT/CD36 gene สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณกรดไขมันที่ขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในหัวใจและกล้ามเนื้อ การ mutation ให้หนูไม่มี *FAT/CD36* ส่งผลทำให้ปริมาณการนำกรดไขมันสายยาวเข้าสู่ภายในเซลล์ลดลงแต่เมื่อ *FAT/CD36* มีการแสดงออกมากเกินไปทำให้ปริมาณการขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้น (Arend, 2004) ในไก่พบว่า *FAT/CD36* มีผลต่อปริมาณ long chain fatty acid ในเนื้อ จากการศึกษากการแสดงออกของ *FAT/CD 36* ในเซลล์กล้ามเนื้อของไก่สายพันธุ์ทางการค้าเปรียบเทียบกับไก่สายพันธุ์ Chinese local silky พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และการแสดงออกของ *FAT/CD 36* ยังส่งผลในด้านบวกต่อ linoleic acid แต่ส่งผลในด้านลบต่อ palmitic acid (Guo, 2013) ดังนั้น *FAT/CD36* น่าจะสามารถใช้เป็น gene marker เพื่อใช้เป็นแนวทางและข้อมูลในการปรับปรุงพันธุกรรมให้ไก่มีการสะสมกรดไขมันในกลุ่ม n-3 PUFA ในเนื้อไก่ได้เพิ่มสูงขึ้น

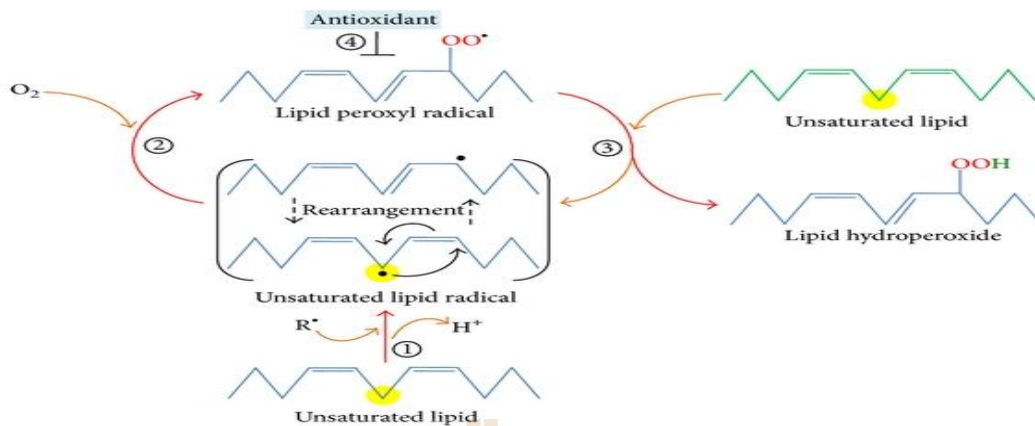
FAT/CD36 ในไก่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 โดยใช้ Forward Primer คือ 5' TGCAAAGCAG GGAGGGTGAAA-3' และ Reverse Primer คือ 5' -GGTGCAAAGGCCACAAAGAG-3' มีขนาด Product length เท่ากับ 94 bp (DQ323177.1)

จากที่กล่าวมาในหัวข้อข้างต้นนั้นเป็นแนวทางที่จะใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์เพื่อเพิ่มการสะสมกรดไขมันชนิด n-3 PUFA ในเนื้อไก่เพิ่มสูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อในร่างกายของไก่มีการปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า lipid peroxidation กระบวนการนี้มีผลกระทบต่อคุณภาพของเนื้อจะแสดงในหัวข้อถัดไป

2.8 การเกิด lipid peroxidation

โดยทั่วไปกระบวนการ lipid peroxidation เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ free radicals หรือ reactive oxygen species และ กรดไขมันที่มีพันธะคู่ของคาร์บอนอะตอม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรดไขมันสายยาวที่ไม่อิ่มตัว กระบวนการดังกล่าวมี 3 ขั้นตอนซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.7 กระบวนการนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ โดยส่งผลต่อกลิ่น สี รสชาติ และคุณค่าทางอาหารที่ต่ำลง



รูปที่ 2.7 Lipid peroxidation process

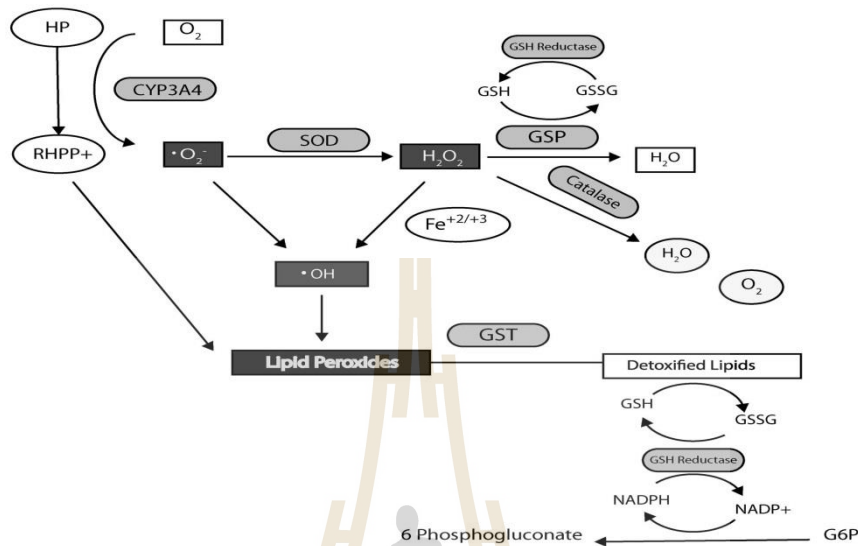
ที่มา: Antonio (2014)

2.9 การต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย

Antioxidants เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือระงับการเกิด Free radical และยับยั้งให้เกิดการทำลายเซลล์ข้าง (Young, 2001) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นภายในร่างกายเป็นผลทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) จะเกิดในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในการดำรงชีวิตจึงมีการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล (superoxide radical; O_2^\bullet) ไฮโดรซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; HO^\bullet) อัลคอกซิล เรดิคัล (alkoxyl radical; RO^\bullet) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้เกิดผลพลอยได้เป็นอิเล็กตรอนที่มีสถานะไม่คงที่ วัตถุประสงค์ปฏิกิริยาและสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกายได้ง่ายส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงการทำงานส่งผลให้มีการทำงานที่ผิดปกติซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการทำงานต่างๆ ในร่างกายรวมทั้งการทำงานที่ผิดพลาดในระดับพันธุกรรม

Antioxidants สามารถจำแนกได้หลายกลุ่มแต่กลุ่มที่มีการทำงานพื้นฐานในร่างกายคือแบบ non-enzymatic จะทำงาน โดยยับยั้งการเกิด Free radical อย่างเช่น vitamin c, vitamin E, glutathione และสารสกัดจากพืชเช่น ขมิ้น เป็นต้น (Panahi et al., 2015) และแบบ enzymatic antioxidants จะทำงานโดยการตัดพันธะและเคลื่อนย้าย Free radical เพื่อเปลี่ยนแปลงเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และน้ำ เอนไซม์เหล่านี้มักมี co-factor เป็น copper, Zinc, manganese และ iron ซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดที่มีหน้าที่เป็น antioxidants อย่างเช่น เพอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: SOD) คะทะเลส (Catalase: CAT), กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase: GPX),

กลูตาไธโอนรีดักเตส (Glutathione Reductase: GR) เป็นต้นโดยกลไกการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะแสดงในรูปที่ 2.8



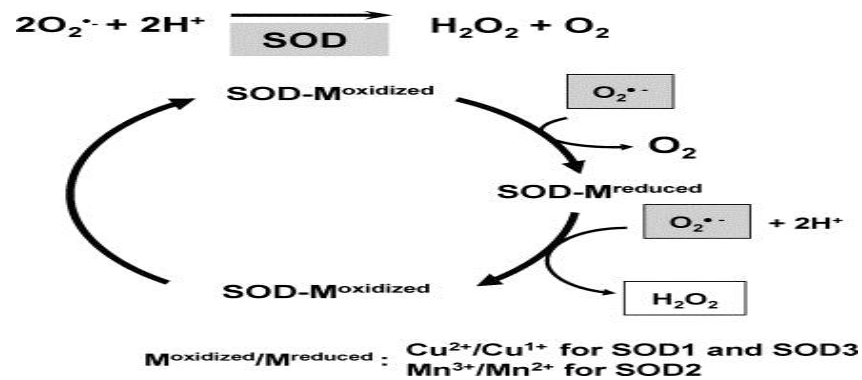
รูปที่ 2.8 mechanism of Antioxidant enzyme

ที่มา: Lü et al. (2010)

จากรูปที่ 2.7 พบว่ามีเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิดซึ่งจากการค้นคว้าพบว่า ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase: SOD) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มาช่วยยับยั้งหรือป้องกันการทำลายเซลล์นอกจากนี้ยังพบว่ายังสามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation ในไตด้วย (Peter, 2016) และ คอะทะเลส (Catalase: CAT) จะทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็นน้ำเพื่อลดความเป็นอันตรายที่จะทำให้เกิดการทำลายเซลล์ในร่างกาย (Akinloye, 2017) อีกทั้ง ทั้ง 2 เอนไซม์นี้เป็นกระบวนการที่สั้นและใกล้ที่สุดในการป้องกันการเกิด lipid peroxide ซึ่งบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์จะแสดงในหัวข้อถัดไป

2.9.1 บทบาทหน้าที่ของ Superoxide Dismutase: SOD

Superoxide Dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิด ROS ในร่างกาย ซึ่ง isomer ของ SOD จะขึ้นกับสารจำพวกโลหะที่มาทำงานร่วมกับเอนไซม์นี้ อย่างเช่น copper, Zinc และ manganese โดยจะทำหน้าที่ catalyzes ออกซิเจน (O_2) จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) (Fernandez et al., 2009) การทำงานของ SOD แสดงดังรูปที่ 2.9

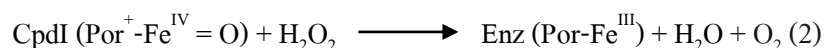


รูปที่ 2.9 Common mechanism of scavenging $\text{O}_2^{\bullet -}$ by SODs
 ที่มา : Fukai (2011)

จากที่กล่าวไปแล้วว่าเอนไซม์ SOD มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับสารจำพวกโลหะที่มาเป็น co-factor จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าเอนไซม์ *SOD1* ในไตนั้นมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และมีการศึกษาการแสดงออกที่อวัยวะตับ และลำไส้เล็ก (Wang, 2013) และมีสารจำพวก Cu และ Zn ทำงานร่วมด้วย (Fukai, 2011) โดยในงานนี้จะใช้ Primer ตามงานของ Yarru et al. (2009) ซึ่งมี Forward Primer คือ 5'-AGGGGGTCATCCACTTCC-3' และ Reverse Primer คือ 5'-CCCATTTGTGTTGTCTCCAA-3' ซึ่งมีขนาด Product size เท่ากับ 122 bp ยีนมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 15,598 Da

2.9.2 บทบาทหน้าที่ของ Catalase: *CAT*

Catalase: *CAT* เป็นเอนไซม์ที่ป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายโดยการเกิดกระบวนการ oxidative โดยเกิดการ degrading H_2O_2 ให้ได้ผลผลิตออกมาเป็นน้ำและออกซิเจนซึ่งจะทำงานร่วมกับ Fe (Mercedes, 2009) โดยในขั้นแรกจะรีดิวซ์ H_2O_2 ได้เป็นสารประกอบโลหะ หลังจากนั้นสารประกอบโลหะจะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 อีกตัว แสดงดังสมการ



รูปที่ 2.10 mechanism of Catalase
 ที่มา : Mercedes (2009)

จากการศึกษาอื่น CAT ในไก่พบว่ามีการแสดงออกที่ตับอยู่บน โครโมโซมคู่ที่ 5 (Yarru et al., 2009) โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ primers คือ forward primer 5'-TAC GGT TCT CCACTG TTG CTG-3' reverse primer 5'-TGG ATG AAG GAT GGA AAC AAC-3'

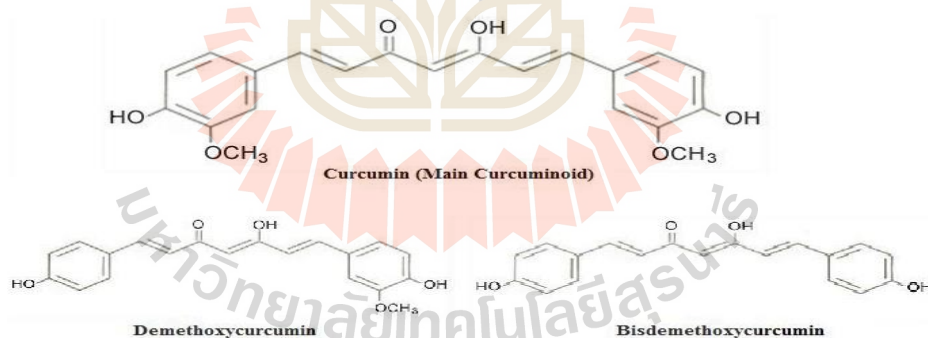
ดังนั้นการศึกษายีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านอนุมูลอิสระจะช่วยป้องกันการทำลายกรดไขมันสายยาวที่ไก่ได้รับ และสามารถนำไปสะสมในเนื้อได้เพิ่มสูงขึ้น

จากที่กล่าวไปแล้วนั้นว่า Antioxidant มีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ซึ่งมักจะเสริมลงในอาหาร โดยจะกล่าวในหัวข้อต่อไป

2.9.3 Curcumin

ขมิ้น (*Curcuma longa*) เป็นพืชที่นำมาผลิตเป็นยารักษาโรคอยู่ในตระกูลเดียวกับขิงและเป็นแหล่งของ phenolic (curcuminoids)

Curcuminoids มี 4 ชนิดที่อยู่ในรากของขมิ้นชัน คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin แสดงดังรูปที่ 2.11 สารเหล่านี้เป็นสารที่มีสีเหลืองมีความสามารถในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย และสามารถยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation โดยการกำจัด superoxide anion และ hydroxyls free radicals (Ahmadi, 2010b) ซึ่งกระบวนการกำจัดสารอนุมูลอิสระต่างๆ จะแสดงดังรูปที่ 2.12

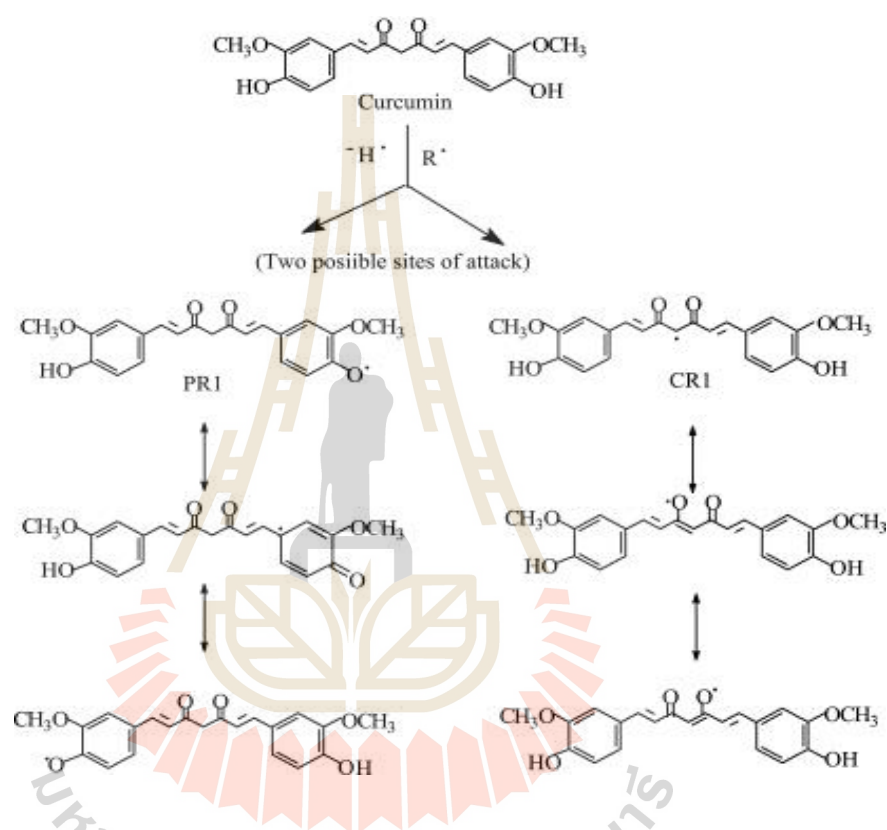


รูปที่ 2.11 Structure of curcuminoids contained in turmeric

ที่มา: Kocaadam (2017)

นอกจากนี้พบว่า curcuminoid สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPX แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CAT อย่างมีนัยสำคัญแต่ในการศึกษาของ (Ahmadi, 2010a) พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ SOD และ CAT เพิ่มขึ้นเมื่อไก่ได้รับผงขมิ้นที่มีปริมาณ 0.3 และ 0.6 กรัมต่อกิโลกรัมซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณการเสริมสาร curcumin นั้นส่งผลต่อ

การทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็น Antioxidant ซึ่งการเสริมสาร curcumin ในอาหารและการทำงานของ Antioxidant enzyme ที่สร้างขึ้นภายในร่างกายมีการทำงานร่วมกัน แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาการเสริม curcumin ในอาหารต่อการแสดงออกหรือการทำงานของ Antioxidant enzyme ที่พบมีการศึกษาในไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ายังไม่พบว่ามีการศึกษาในไก่พื้นเมืองหรือไก่ลูกผสม จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



รูปที่ 2.12 Reaction pathway of curcumin with oxidizing radicals
ที่มา: Schneider et al. (2015)

2.10 เอกสารอ้างอิง

- Ahmadi, F. 2010a. Effect of Turmeric (*Curcumin longa*) powder on performance, oxidative stress state and some of blood parameters in broilers fed on diets containing aflatoxin **Global Veterinaria** 5: 312-317.
- Ahmadi, F. 2010b. Effect of Turmeric (*Curcumin longa*) powder on performance, oxidative stress state and some of blood parameters in broilers fed on diets containing aflatoxin. **Global Veterinaria** 5: 312-317.

- Akinloye, O. M. I. a. O. A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**.
- Antonio, A., Mario F.Munoz, and Sandro Argüelles. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.
- Arend, B., S. E. C., Carley R. Benton., Adrian Chabowski., Susan L. M., & Coort., X.-X. H., Debby P. Y. Koonen., Jan F. C. Glatz and Joost J. F. P. Luiken. . 2004. Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. **Proceedings of the Nutrition Society** 63: 245-249.
- Calder, P. C. 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. . **Journal Nutrition** 142: 592-599.
- Catherine, M. a. 2014. Development of novel therapeutic approaches for the reduction of apolipoprotein B expression.
- Choi, S. Y., P. Sivaram, D. E. Walker, L. K. Curtiss, D. G. Gretch, S. L. Sturley, A. D. Attie, R. J. Deckelbaum, and I. J. Goldberg. 1995. Lipoprotein Lipase Association with Lipoproteins Involves Protein-Protein Interaction with Apolipoprotein B. **Journal of Biological Chemistry** 270(14): 8081-8086. doi: 10.1074/jbc.270.14.8081.
- Doreau, M. a. C., Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **The British journal of nutrition** 78 Suppl 1: S15-35.
- Ebeid, T., Abou el-soud., y, eid. and m. el-habbak. . 2011. The effect of omega-3 enriched meat production on lipid peroxidation, antioxidative status, immune response and tibia bone characteristics in Japanese quail. **Czech Journal of Animal Science** 56(7): 314-324.
- Fernandez, C., E. San Miguel, and A. Fernandez-Briera. 2009. Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived species *Margaritifera margaritifera*. **Biological research** 42(1): 57-68. doi: /S0716-97602009000100006.
- Fitzgerald, P., A., Chatjaroenporn, K, W., and Gregory G. 2015. Structure and composition of mixed micelles of polymerized and monomeric surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science** 449: 377-382. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.093>.
- Fraser, R., V. R. H., F.E.M. Murray and W.A. Day. 1986. Ultrastructural studies of the portal transport of fat in chickens. **Br. J. exp.** 67: 779-783.

- Fukai, T. a. U.-F., Masuko. 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling** 15(6): 1583-1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.
- Goldberg, I. J., R. H. Eckel, and N. A. Abumrad. 2009. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. **Journal of lipid research** 50(Supplement): S86-S90. doi: 10.1194/jlr.R800085-JLR200.
- Guo, J., L. Zhou., X. Zhu., W. Liao., S. Wang., J. Yang., G. Zhou., Q. Xi., P. Gao., Y. Zhang., S. Z., L. Yuan and Q. Jiang. 2013. Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. **Journal Animal** 7(3): 422-429.
- Huang , Y., N., Chen, Q.Y. Jiang, Y.F. Guo, G.Q. Lan and, & Jiang, H. S. 2015. Gene expression and enzyme activity of lipoprotein lipase correlate with intramuscular fat content in Guangxi san-huang and Arbor Acres chickens. **Genetics and Molecular Research**: 15(2).
- Iqbal, J., and M. M. Hussain. 2009. Intestinal lipid absorption. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism** 296(6): E1183-E1194. doi: 10.1152/ajpendo.90899.2008
- Jana, O., Ladislava M, Jarmila, V, A., Robert, V, and Jiri, M. 2015. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids **International Journal of Molecular Sciences** 16 doi: 10.3390/ijms160612871.
- Kocaadam, B. a. S., N. 2017. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 57(13): 2889-2895. doi: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- Koppenol, A., E. D., J. Aerts., E. Willems., Y. Wang., L. Franssens., N. Everaert and J. Buyse. 2014. Effect of the ratio of dietary n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on broiler breeder performance, egg quality, and yolk fatty acid composition at different breeder ages. **Poultry Science**: 93(3).
- Kristina, S., T. M., Diana Brozic., Natalija Filipovic., and Stojvic, a. Z. 2014. Growth performance, serum lipids and fatty acid profile of different tissues in chicken broilers fed a diet supplemented with linseed oil during a prolonged fattening period **Veterinarski Arhiv** 84(1): 75-84.
- Lake, M., and D. T. Organisciak. 1984. Determination of the composition of mixed micelles of bile salts by kinetic dialysis. **Lipids** 19(7): 553-557.

- Lü, J.-M., P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** 14(4): 840-860. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- Mandal, G., P. and A. K. Patra. . 2014. Effect of Different Dietary n-6 to n-3 Fatty Acid Ratios on the Performance and Fatty Acid Composition in Muscles of Broiler Chickens. **Asian Australas journal Animal Science** 27: 1608-1614.
- Masson, C., J., J. P., Ronald P. M., Andrzej, N., Wojciech, K., Zbigniew N., Robert E., Jan, F, C., and Maurice, M, A, L, P. 2010. Fatty Acid- and Cholesterol Transporter Protein Expression along the Human Intestinal Tract. **PLOS ONE** 5(4).
- Mercedes, A., P., X. B., Pietro V and, and Rovira, C. . 2009. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. **Journal of the American Chemical Society**: 131.
- Nickerson, J. G., H. A., C.R.Benton. 2009. Greatertransportefficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36and FATP4 compared with FABPpm andFATP1and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. **Journal BioChemecal** 284(2)
- Ozpinar, H., R. K., I. Abos., H. C. Kut a y., H. Eseceli and M. A. G rash orn. . 2002. Effect of dietamy fat source on n-3 fatty acid enrichment of broiler meat. . **Arch. Geflugelk.** 67(2): 57-64.
- Panahi, Y., M. S. Hosseini, N. Khalili, E. Naimi, M. Majeed, and A. Sahebkar. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: A randomized controlled trial and an updated meta-analysis. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)** 34(6): 1101-1108. doi: 10.1016/j.clnu.2014.12.019.
- sarah, K., Gebauer., William S Harris, and Penny M Kris-Etherton. 2006. n[−]3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. . **American Society for Clinical Nutrition.**
- Schneider, C., O. N. Gordon, R. L. Edwards, and P. B. Luis. 2015. Degradation of curcumin: From mechanism to biological implications. **Journal of agricultural and food chemistry** 63(35): 7606-7614. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00244.

- Stahl, A., D. J. Hirsch, R. E. Gimeno, S. Punreddy, P. Ge, N. Watson, S. Patel, M. Kotler, A. Raimondi, L. A. Tartaglia, and H. F. Lodish. 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. **Molecular cell** 4(3): 299-308.
- Sugeng, H., S., Saraswati, S, H., and Ayu, F, I. 2014. Fatty Acid Composition of Some Potential Fish Oil from Production Centers in Indonesia. **Orient Journal Chemical** 30(3):975-980.
- Wang, H.-T. e. a. 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: 284-292.
- Weinstock, P. H., S. Levak-Frank, L. C. Hudgins, H. Radner, J. M. Friedman, R. Zechner, and J. L. Breslow. 1997. Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94(19): 10261-10266.
- Yan, W., Q. Z., Ling Yang and Yi-Ping Liu. 2012. Ontogenic Expression Pattern and Genetic Polymorphisms of the Fatty Acid Transport Protein 4 (FATP4) Gene in Chinese Chicken Populations. **International Journal of Molecular Sciences** 13: 6820-6835.
- Yarru, L. P., R. S. Settivari, N. K. S. Gowda, E. Antoniou, D. R. Ledoux, and G. E. Rottinghaus. 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. doi: 10.3382/ps.2009-00204.
- Young, I, S and Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease. **American Journal of Clinical Pathology** 54: 176-186.

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีดำเนินการวิจัยและการเก็บข้อมูล

ในการดำเนินงานทดลองครั้งนี้ดำเนินงานต่อเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์ของ Mrs. Tran Thi Thuy Hang นักศึกษาปริญญาเอกของสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ โดยมี อ.ดร.วิทวัส โมพี เป็นที่ปรึกษาหลัก

ในส่วนของการจัดการเลี้ยง จัดการในด้านทั่วไป ออกแบบสูตรอาหาร และข้อมูลที่ได้จากห้องปฏิบัติการเพื่อหาระดับของกรดไขมัน (แสดงดังตารางที่ 3.1) และระดับของค่า TBAR (แสดงดังรูปที่ 3.1) ในเนื้อไก่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Mrs. Tran Thi Thuy Hang (Hang et al., 2018)

ในส่วนของคุณสมบัติของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme (แสดงดังตาราง 3.2) ได้รับความอนุเคราะห์จากนายวิษพัฒน์ นามบัณฑิต โดยมีรายละเอียดการดำเนินงานดังนี้

ตารางที่ 3.1 Fatty acid profile of the meat

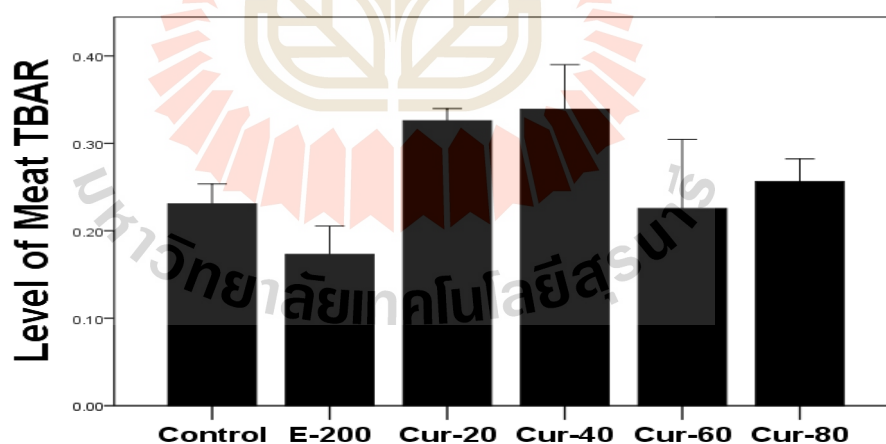
item	treatment						SEM	P-value
	Control ¹	E-200 ²	Cur-20 ³	Cur-40 ⁴	Cur-60 ⁵	Cur-80 ⁶		
C14:0	1.06	1.00	1.25	1.07	1.16	1.27	0.05	0.460
C16:0	25.08	25.61	24.82	25.81	25.64	23.76	0.30	0.403
C18:0	10.03	10.82	10.32	11.52	10.35	8.72	0.31	0.190
C20:0	0.70	0.51	0.27	0.34	1.12	0.34	0.11	0.176
C22:0	0.26	0.36	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

1 = Control : basal diet + 4% Tuna oil; 2 = basal diet + vitamin E 200 mg/kg; 3 = basal diet + Curcuminoids 20 ppm; 4 = basal diet + Curcuminoids 40 ppm; 5 = basal diet + Curcuminoids 60 ppm; 6 = basal diet + Curcuminoids 80 ppm; *P-value* < 0.05

ตารางที่ 3.1 Fatty acid profile of the meat (ต่อ)

item	treatment						SEM	P-value
	Control ¹	E-200 ²	Cur-20 ³	Cur-40 ⁴	Cur-60 ⁵	Cur-80 ⁶		
C18:2n-6	16.20 ^{cd}	15.94 ^d	19.54 ^a	16.98 ^{abc}	17.28 ^{bcd}	19.39 ^{ab}	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	1.058	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	1.652	.763

1 = Control : basal diet + 4% Tuna oil; 2 = basal diet + vitamin E 200 mg/kg; 3 = basal diet + Curcuminoids 20 ppm; 4 = basal diet + Curcuminoids 40 ppm; 5 = basal diet + Curcuminoids 60 ppm; 6 = basal diet + Curcuminoids 80 ppm; *P-value* < 0.05



ภาพที่ 3.1 ผลของค่าที่แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยา Oxidation ในเนื้อ (Meat TBAR); 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

ตารางที่ 3.2 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme (SOD and CAT gene)

Treatment	Relative expression ratio (mean)			
	SOD		CAT	
	liver	meat	liver	meat
Control ¹	1.08	1.02	1.22	1.06
E-200 ²	0.72	0.72	0.76	0.80
CUR-20 ³	0.83	0.88	0.88	1.47
CUR-40 ⁴	0.61	1.08	1.14	1.22
CUR-60 ⁵	0.66	1.42	1.31	2.02
CUR-80 ⁶	0.85	1.01	1.60	1.05
SEM	±0.08	±0.08	±0.13	±0.13
P-value	0.37	0.169	0.53	0.061

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 80 ppm; SOD = superoxide dismutase and CAT = catalase

3.1.1 สัตว์ทดลองและการจัดการสัตว์ทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้ไก่โคราชคณะเกษตรจำนวน 480 ตัว ลูกไก่จะได้รับวัคซีนป้องกันโรคมารีก วัคซีนป้องกันโรคหลอดลมอักเสบ นิวคลิโอซิส และกัมโบโร เมื่ออายุ 7, 21 และ 14 วัน ตามลำดับ

ที่อายุ 1 วัน ลูกไก่ได้รับการกกและให้กินอาหารและน้ำอย่างอิสระ อาหารที่เลี้ยงใช้อาหารสูตรพื้นฐานแสดงดังตารางที่ 3.3 จนถึงอายุ 20 วัน เมื่อไก่อายุครบ 21 วัน ทำการสุ่มเข้ากลุ่มการทดลองในแต่ละกรง ความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงต่อกรงคือ 8 ตัวต่อตารางเมตร โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่อายุ 22-84 วัน แสดงดังตารางที่ 3.3

3.1.2 แผนการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely Randomized Design; CRD) โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลองๆ จะมี 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว โดยให้การเลี้ยงแบบคณะเกษตร โดยกลุ่มการทดลองที่ 1 เป็น Negative control โดยใช้อาหารพื้นฐาน(ตารางที่ 3.4) ที่มีการเสริมน้ำมันปลาทูน่าที่ 4% กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็น Positive control โดยใช้อาหารพื้นฐานที่มีการเสริม

น้ำมันปลา 4% ร่วมกับการเสริม vitamin E ในปริมาณ 200 mg/kg และในกลุ่มการทดลองที่ 3 ถึงกลุ่มการทดลองที่ 6 จะใช้สูตรอาหารพื้นฐานที่มีการเสริมน้ำมันปลาร่วมกับการเสริมสาร Curcumin Removed Turmeric Oleoresin (curcuminoids) ที่ 20 40 60 และ 80 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงไก่ในช่วงอายุ 0-21 วัน

วัตถุดิบอาหาร	%
Soybean meal 44%	30
Full-fat soybean	12.24
Corn	48.88
Rice bran oil	4.43
DL-Methionine	0.26
L- Lysine	0.07
L- Threonine	0.09
Salt	0.47
CaCO ₃	1.64
P ₂₁	1.42
Premix	0.50
Total	100
คำนวณสารอาหาร	%
Protein	21.00
Energy, kcal/kg	3100
Ether extract	8.53
Crude fiber	3.67
Digestible Lysine	1.10
Digestible Methionine	0.55
Dig.(Meth+Cysteine)	0.82
Digestible Threonine	0.77
Calcium	1.00
Available Phosphorus	0.45
Sodium	0.20
Potassium	0.94

ตารางที่ 3.4 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)	50.36	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
CaCO ₃	1.57	1.42
Monocalcium phosphate (21% P)	1.08	0.92
¹ Premix	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

¹Premix (0.5%) คัดตามกิโลกรัมของอาหาร : 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 ค่าสังเกตที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน

1. ระดับการ Expression ของยีน คือ Fatty acid transport protein 4 (FATP4), Fatty acid translocase of CD36 (FAT/CD36) และ Lipoprotein lipase ที่อวัยวะตับและกล้ามเนื้อ
2. ระดับการ Expression ของยีน คือ Superoxide Dismutase: *SOD* และ Catalase: *CAT* ที่อวัยวะตับและกล้ามเนื้อ
3. ระดับของ n-3 Poly unsaturated fatty acid (n-3 PUFA) ในเนื้อ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับผลของระดับการ Expression ของ Antioxidant enzyme gene
4. ค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBAR) ในเนื้อ เพื่อให้เห็นถึงระดับการเกิด Oxidation

3.3 การศึกษาระดับของ Gene expression

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัด Total RNA

เมื่อไก่อายุครบ 12 สัปดาห์จะทำการเก็บตัวอย่าง โดยสุ่มไก่ออกมา treatment ละ 8 ตัว (ทรงละ 2 ตัวมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย) ทำการชำแหละและเก็บอวัยวะตัวอย่างคือ ตับและกล้ามเนื้อ เนื่องจากการศึกษายานของ (Wang et al., 2012) และ (Guo et al., 2013) พบว่ายีนที่ต้องการศึกษามีการแสดงออกที่บริเวณอวัยวะเหล่านี้ที่มีหน้าที่ในการขนส่งกรดไขมัน โดยเก็บอวัยวะดังกล่าวไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -80°C เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของ RNA ในเนื้อเยื่อ

3.3.2 การสกัด Total RNA

การสกัด Total RNA จากตับและกล้ามเนื้อเพื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ (*FATP4*, *LPL* and *FAT/CD36*) ตามขั้นตอนดังนี้ (หมายเหตุ: ทำในตู้ดูดควันสารเคมี เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการสกัดส่งผลต่อระบบทางเดินหายใจ)

1. ชั่งตัวอย่างตับหรือเนื้อ ประมาณ 0.05 g ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml จากนั้นค่อยๆ ใส่ไตรซอล ครั้งละ 300 µl บดตัวอย่างให้ละเอียดจนเห็นเป็นลักษณะใสไม่มีตะกอน จากนั้นเติมไตรซอลจนครบ 1000 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา (25°C) 5-10 นาที

2. เติมกลอโรฟอร์ม 200 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ในหลอดตัวอย่างออกมาประมาณ 500 μ l ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเติมไอโซโพรพานอล 500 μ l และ Inverse ตัวอย่างให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที

3. ดูดสารละลายในหลอดออกให้หมด เหลือไว้เพียงตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอด หลังจากนั้นเติมเอทานอล 1000 μ l Inverse ตัวอย่างให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 4°C ความเร็ว 12,500 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที

4. ดูดเอทานอลในหลอดออก เหลือไว้เพียงตะกอนสีขาวขุ่นที่ติดข้างหลอดและ air dry เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อให้ตะกอนสีขาวแห้งและมีลักษณะใส

5. เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) 30 μ l จะได้ Total RNA ของตับ และเนื้อไก่ และนำไปวัดความเข้มข้นของ Total RNA โดยดูด Total RNA ออกมา 2 μ l เพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A)

3.3.3 การสังเคราะห์ first stand cDNA

การสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA ด้วยชุดสังเคราะห์ First Strand cDNA สำเร็จรูป (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit; Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ first strand cDNA ดังนี้ Transcriptor RT Reaction Buffer (10x) 2 μ l, 25x dNTP mix 0.8 μ l, 10x RT Random Primers 2 μ l, Multiscribe[™] Reverse Transcriptase 1 μ l และ Nuclease-free water 4.2 μ l กับ Total RNA ที่เตรียม 10 μ l โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25°C 10 นาที จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C 120 นาที และทำลายเอนไซม์โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 85°C 5 นาที และเก็บตัวอย่าง First Strand cDNA ไว้ที่ -20°C จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้น cDNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A)

3.3.4 ระดับปริมาณการแสดงออกของยีน *FATP4*, *LPL*, *FAT/CD36* gene

จะใช้ First Strand cDNA 2 μ l ที่ได้ ผสมเข้ากับน้ำ Deionized 6 μ l และ SYBR Green I Master 10 μ l (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง Real time PCR รุ่น Roche480 ของประเทศเยอรมัน (Germany) เพื่อวัดระดับปริมาณการแสดงออกของยีน ดังนี้ โดยจะใส่ primer forward และ primer reverse ของยีนที่ต้องการศึกษา อย่างละ 1 μ l ซึ่งไพรเมอร์ของยีนทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 3.5 แล้วนำมาวัดปริมาณการแสดงออกของทั้งสองยีน โดยเทียบกับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม negative control เพื่อดูระดับปริมาณการแสดงออกของยีนเหล่านี้

ตารางที่ 3.5 โพรเมอร์ ที่ใช้สำหรับเทคนิค Real time-PCR

primer	5' sequence 3' forward primer 5' sequence 3' reverse primer	Product length	Annealing temperatures (°C)	Reference
<i>FATP4</i>	F:5'-CATCACCATTCTCCA ACTCCAG-3' R: 5'-GACTCAGGGCTTCTCCT-3'	274	60	Wang et al. (2012)
<i>LPL</i>	F:5'-AGGAGAAGAGGCAGCAATA-3' R:5'-AGCCAGCAGCAGATAAG-3'	127	59	Guo et al. (2013)
<i>FAT/CD36</i>	F:5'-TGCAAAGCAGGGAGGGTGAAA-3' R:5'-GGTGCAAAGGCCACAAAGAG-3'	112	60	Huang et al. (2016)

หมายเหตุ : *FATP4*= Fatty acid transport protein4; *LPL*= Lipoprotein lipase; *FAT/CD36*: Fatty acid = translocase of CD36

3.4 การทำ Lipid Analysis โดยการใช้ Gas chromatography

เพื่อหาค่าองค์ประกอบกรดไขมันในเนื้อ โดยจะใช้เทียบกับผลของ Gene Expression เพื่อที่จะทราบได้ว่ามีแนวโน้มที่จะเป็นไปในทิศทางเดียวกันหรือไม่ ซึ่งวิธีการ Lipid Analysis โดยการใช้ Gas chromatography มีดังนี้ จะใช้เนื้อประมาณ 5 g เติม chloroform: methanol (2:1 v/v) 90 ml (Folch et al., 1957) จากนั้นทำการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างประมาณ 20-25 mg โดยการ methylated (Metcalf, 1966) นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้วิธีการ Gas chromatography (Hewlett-Packard 7890A; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ด้วยหลอด Capillary column (SP 2560, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA, 100 m x 0.25 mm i.d., 0.20- μ m film thickness) และ เครื่อง Flame ionization โดยใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาสาร และอัตราการไหลอยู่ที่ 0.95 ml/min อุณหภูมิที่ใช้ฉีดสารและวิเคราะห์อยู่ที่ 260°C อุณหภูมิแรกเริ่มของหลอดอยู่ที่ 70°C จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 175°C โดยมีอัตราเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอยู่ที่ 13°C/min และสุดท้ายเพิ่มขึ้นเป็น 240°C ด้วยอัตรา 4 °C/min

3.5 การหาค่า TBAR (Thiobarbituric acid reactive substances) ในเนื้อ

วิเคราะห์หาค่า TBAR เพื่อดูปริมาณการเกิด oxidation ในเนื้อและใช้เทียบกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant ซึ่งมีวิธีการดังนี้

แบ่งเนื้อออกเป็นชิ้น ชิ้นละ 5 g ตามวิธีการทดลองแบบของ (Leick et al., 2010) ซึ่ง ตัวอย่าง, blank และ Standards ถูกอ่านด้วย Bio-Rad Benchmark Plus® Microplate Spectrophotometer ที่ความเข้มแสง 530 นาโนเมตร

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การตรวจสอบข้อมูลที่ทำการศึกษา ตรวจสอบด้วยวิธี Descriptive statistics โดยพิจารณา ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) สัมประสิทธิ์ความผันแปร (Coefficient of Variation; CV) ค่าต่ำสุด (minimum; min) ค่าสูงสุด (maximum; max) เพื่อตรวจสอบค่า outlier และใช้วิธี Normality plot with test เพื่อตรวจสอบข้อมูลที่ทำการศึกษาว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่โดยพิจารณาจากค่า 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 (Joanes and Gill, 1998) ถ้าค่าดังกล่าวเกินจากช่วงดังกล่าว จะทำการแปลงข้อมูล (Data transformation) เพื่อให้ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ

การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของอิทธิพลเนื่องจากการที่ไก่ได้รับอาหารที่มีการเสริม n-3 PUFA และ curcuminoids ในระดับที่แตกต่างกันต่อระดับของการ Expression ของ ยีน *FATP4*, *FAT/CD36*, *SOD*, *CAT* ระดับ n-3 PUFA และ ระดับ TBAR ในเนื้อไก่ ด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ในการทดสอบสมมุติฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลอง ด้วยวิธี TUKEY กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $\alpha \leq 0.05$ เพื่อเปรียบเทียบระดับของการ Expression ของ ยีน *FATP*, *FAT/CD36*, *SOD*, และ *CAT* ในเนื้อไก่และเนื้อเยื่อจากตับ ระดับ n-3 PUFA และ ระดับ TBAR ในเนื้อไก่ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน 6 กลุ่ม

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและการเกิด Antioxidant ด้วยวิธี Correlation และกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P\text{-value} \leq 0.05$

3.7 เอกสารอ้างอิง

- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem.** 226(1): 497-509.
- Guo, J., G. Shu, L. Zhou, X. Zhu, W. Liao, S. Wang, J. Yang, G. Zhou, Q. Xi, P. Gao, Y. Zhang, S. Zhang, L. Yuan, and Q. Jiang. 2013. Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. **Animal** 7(3):422-429. doi: 10.1017/ s175173111

2001619.

- Hang, T. T. T., W. Molee, S. Khempaka, and N. Paraksa. 2018. Supplementation with curcuminoids and tuna oil influenced skin yellowness, carcass composition, oxidation status, and meat fatty acids of slow-growing chickens. **Poult Sci** 97(3): 901-909. doi: 10.3382/ps/pex385.
- Huang, Y. N., J. Wang, B. J. Chen, Q. Y. Jiang, Y. F. Guo, G. Q. Lan, and H. S. Jiang. 2016. Gene expression and enzyme activity of lipoprotein lipase correlate with intramuscular fat content in Guangxi san-huang and Arbor Acres chickens. **Genet Mol Res.** 15(2)doi: 10.4238/gmr.15027414.
- Leick, C. M., C. L. Puls, M. Ellis, J. Killefer, T. R. Carr, S. M. Scramlin, M. B. England, A. M. Gaines, B. F. Wolter, S. N. Carr, and F. K. McKeith. 2010. Effect of distillers dried grains with solubles and ractopamine (Paylean) on quality and shelf-life of fresh pork and bacon. **J Anim Sci.** 88(8): 2751-2766. doi: 10.2527/jas.2009-2472.
- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., and Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Anal. Chem** 38(3): 514-515.
- Wang, Y., Q. Zhu, L. Yang, and Y.-P. Liu. 2012. Ontogenic Expression Pattern and Genetic Polymorphisms of the Fatty Acid Transport Protein 4 (FATP4) Gene in Chinese Chicken Populations. **Int. J. Mol. Sci.** 13(6): 6820-6835. doi: 10.3390/ijms13066820.

บทที่ 4

ผลทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อ fatty acids profile และค่า TBAR ในเนื้อ

4.1.1 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อ fatty acids profile ในเนื้อ

จากผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (short chain fatty acid; SFA) (C14:0 C16:0 C18:0 C20:0 C22:0) ในทุกกลุ่มการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากการค้นคว้า reactive oxygen species (ROS) จะเกิดในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ ออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในการดำรงชีวิต ซึ่ง ROS จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่มีพันธะคู่อย่าง กรดไขมันชนิด MUFA และ PUFA (Ayala et al., 2014) ซึ่งกรดไขมันอิ่มตัวสายสั้นเป็นกรดไขมันที่ไม่มีพันธะคู่ (Drevon, 2005) ดังนั้นกรดไขมันจะถูก oxidized หรือถูกทำลายจาก ROS ได้ยาก และการเสริมสาร curcuminoids หรือ Vitamin E เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ของไขมันที่ประกอบไปด้วยพันธะคู่ ซึ่งสาร curcuminoids และ Vitamin E เป็น antioxidant และมีหน้าที่ในการกำจัด ROS ให้กลายเป็นน้ำ (Akinloye, 2017) ดังนั้นจึงไม่พบความแตกต่างของ SFA ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร Curcuminoids และ Vitamin E เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

ในส่วนของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid, MUFA) (C16:1 C17:1 C18:1n-9 C20:1) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง เพราะอัตราการ oxidized ของ MUFA จะต่ำกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เนื่องจากมีจำนวนพันธะคู่เพียง 1 พันธะ (Leyton, 1987) นอกจากนี้ในน้ำมันปลาทูน่ามีส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดนี้อยู่น้อย (Sugeng, 2014) ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยา oxidation จะเกิดขึ้นไม่มากพอที่จะทำให้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่ในส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) (C18:2n-6 C20:4n-6 C18:3n-3 C20:5n-3 C22:6n-3) พบความแตกต่างกันของ Linoleic acid (C18:2n-6) (P-Value < 0.05) ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoids ที่ระดับ 20 40 และ 80 ppm มีการสะสมของกรดไขมันดังกล่าวสูงที่สุด และในส่วน of total n-6 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่เสริมสาร antioxidant เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ดังแสดงในตารางที่ 3.1

จากการค้นคว้าเอกสารพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันปลาทูน่ามีปริมาณกรดไขมันชนิด C18:2n-6 ในปริมาณที่สูง (Sugeng, 2014) และจากรายงานของ Hang et al. (2018) กล่าวไว้ว่า ในอาหารมีแหล่งของกรดไขมันชนิด C18:2n-6 (linolenic acid) ประมาณ 25% ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะพบว่าการสะสมมากกว่า PUFA ชนิดอื่นๆ ซึ่งจากผลการทดลองกรดไขมันดังกล่าวมีการสะสมมากขึ้นในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoids และด้วยเหตุนี้ จึงทำให้ปริมาณ total n-6 ในเนื้อมีส่วนที่มากขึ้น ทำให้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของกรดไขมันประเภท n-3 PUFA ในทุกกลุ่มการทดลอง เนื่องจากปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณการสะสมกรดไขมันในเนื้อคือ ปัจจัยจากอาหาร เพราะไก่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันชนิด alpha-linolenic acids (ALA; C18:3n-3) จึงมีความจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร (Teres, 2015) ซึ่งในน้ำมันปลาทูน่ามีปริมาณของ ALA ประมาณ 0.32% (%w/w) (Sugeng, 2014) นอกจากนี้กรดไขมันชนิดนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน Eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n-3) และ Docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3) ดังนั้นเมื่อมีปริมาณ ALA ไม่มากพอเป็นสาเหตุให้ไม่พบความแตกต่างในกลุ่ม n-3 PUFA และเหนี่ยวนำให้เกิด oxidation ที่ไม่มากพอที่จะทำให้พบความแตกต่างเมื่อมีการเสริมสาร antioxidants อย่าง Vitamin E และ curcuminoid ในระดับที่ต่างกัน

ปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิด ROS คือ การเมตาบอลิซึมในร่างกาย และความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม (Wood et al., 2003) ดังนั้นหากในร่างกายไก่มีปริมาณ ROS ที่น้อย ทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระทำงานได้เพียงพอ เมื่อเสริมสาร Curcuminoids ในระดับที่ต่างกันลงในอาหาร จึงไม่มีผลต่อปริมาณกรดไขมันที่สะสมในเนื้อ และทำให้ไม่พบความแตกต่างของกรดไขมันชนิด n-3 PUFA

4.1.2 ผลของการเสริม Tuna oil และสาร curcuminoids ต่อค่า Thio barbituric acid reactive substance (TBARS) ในเนื้อ

จากผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า TBARS (P-value > 0.05) ในทุกกลุ่มการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.1

ค่า TBARS เป็นค่าที่แสดงปริมาณการเกิด lipid peroxides และ aldehydes (Grotto et al., 2009) ซึ่งค่าของ TBARS จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเกิดกระบวนการ oxidation ในเนื้อที่สูงขึ้น และการเสริมสาร Antioxidant อย่าง Vitamin E และ curcuminoids เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของไขมัน ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นว่ามีการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของไขมัน แต่การเสริมสาร antioxidant ไม่ส่งผลต่อการเกิด oxidation ในเนื้อที่ต่างกันซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Hosseini et al. (2012) พบว่า curcumin มีผลทำให้ค่า TBARS ลดลง ซึ่งสาเหตุดังกล่าวมีความ

เป็นไปได้ที่ทำให้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า TBAR ในเนื้อไก่ เมื่อไก่ได้รับอาหารที่มีการเสริมสาร curcuminoids

จากการค้นคว้าเอกสารพบว่าอัตราการเกิด lipid peroxidation ในเนื้อเกิดจากปัจจัยภายในคือ ปริมาณทั้งหมดของกรดไขมัน, ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อ, natural antioxidant (Vitamin E และ curcuminoids) และ antioxidant enzyme (catalase และ superoxide) ปัจจัยภายนอกคือ ออกซิเจน, ความร้อนสัตว์ที่ได้รับในระหว่างการเลี้ยง และ อุณหภูมิในขณะที่เก็บรักษาเนื้อ (Min, 2008) แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีปัจจัยที่ทำให้อัตราการเกิด lipid peroxidation มีเพียงกรดไขมันในอาหารที่ไก่ได้รับ และ ความร้อนที่ได้รับจากการเลี้ยงเท่านั้น และในร่างกายสัตว์มี เอนไซม์ที่ช่วยกำจัด ROS ได้ จึงเป็นผลทำให้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองที่มีการเสริมสาร antioxidant และกลุ่ม control

4.2 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีน Antioxidant enzyme

4.2.1 ผลของการเสริม curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีน *FATP4*, *LPL* และ *FAT/CD36* ในตับและเนื้อ

ผลของการเสริม curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีน *FATP4*, *LPL* และ *FAT/CD36* ในตับและเนื้อ (ตารางที่ 4.1) พบว่าการแสดงออกของยีน *LPL* และ *FAT/CD36* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-Value} < 0.05$) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานข้อที่ 1 ที่ว่าการเสริม Tuna oil ร่วมกับสาร curcuminoids ที่ต่างกันมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน

โดยจากการศึกษาการทำหน้าที่และการแสดงออกของยีน *LPL* พบว่ามีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการ hydrolyzed lipoprotein เพื่อปลดปล่อยกรดไขมันและขนส่งเข้าสู่กล้ามเนื้อเพื่อสะสมและสร้างพลังงาน และจากการทบทวนเอกสารพบว่าสาร Curcuminoid มีผลต่อระดับของ AMPK (adenosine monophosphate kinase) ซึ่ง AMPK เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อสร้างพลังงาน โดย AMPK เป็น transcription factor ของยีน *PPAR* ซึ่งระดับของ AMPK ที่สูงขึ้นจะทำให้มีการ transcription ของยีน *PPARs* ลดลง (Kim and He, 2013b) และ ยีน *PPARs* มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ *LPL* เนื่องจากยีน *PPAR* จะยับยั้งการสร้าง Apo C II ซึ่งเป็น cofactor ที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ *LPL* (Gbaguidi et al., 2002) ดังนั้นเมื่อเสริม curcuminoid ในระดับที่สูงจะทำให้การทำงานของยีน *LPL* เพิ่มขึ้น ซึ่งจากสาเหตุดังกล่าวสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *LPL* ในเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *LPL* ในตับไม่

สอดคล้องกับสาเหตุที่กล่าวมา เนื่องจากมีการรายงานของ Whitehead and Crawford (2005) กล่าวว่า การแสดงออกของยีนในสัตว์ประชากรเดียวกันแต่ต่าง tissue จะมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน ประมาณ 76% เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการทำงานในแต่ละอวัยวะจะแตกต่างกันอย่าง ในตัวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism ของสารต่างๆ ทั้ง ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จึงมีอัตราการเกิด respiration ที่ต่ำ ดังนั้นจากสาเหตุดังกล่าวมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้การแสดงออกของยีน *LPL* ในเนื้อและตับแตกต่างกัน

ในส่วนของยีน *FAT/CD36* และยีน *FATP4* มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่มีการเสริมสาร antioxidant แตกต่างจากกลุ่ม control ซึ่งจากการทบทวนเอกสารพบว่า curcuminoid จะลดการ transcription ของ PPARs โดยการเหนี่ยวนำของ AMPK (Kim and He, 2013b) และยีน *PPARs* จะลดการทำงานของ uncoupling protein (UCP) เป็นโปรตีนที่ช่วยควบคุมการ uptake กรดไขมันเข้าสู่เซลล์เพื่อเข้าสู่กระบวนการสร้างพลังงาน (Ricquier and Bouillaud, 2000) และ UCP จะลดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ (Gutgesell et al., 2009) จากที่กล่าวมานั้นมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าว และเมื่อมีการเสริมสาร curcuminoid ในปริมาณที่สูงขึ้นจะส่งผลทำให้การทำงานของยีน *FAT/CD36* และยีน *FATP4* ลดลง

การแสดงออกของยีน *FAT/CD36* ในตัวสอดคล้องกับสาเหตุที่กล่าวมา แต่ในเนื้อไม่สอดคล้องกับเหตุผลดังกล่าว เนื่องจากในกล้ามเนื้อจะมีการสะสมกรดไขมันทั้งใน Adipose tissue และในรูปแบบที่เป็นไขมันแทรก (Frayn et al., 2006) และเมื่อร่างกายก่อกอยู่ในสภาวะที่ได้รับพลังงานจากอาหารอย่างเพียงพอ จึงไม่มีความจำเป็นที่จะสร้างพลังงานในเนื้อ ดังนั้นจากสาเหตุนี้มีความเป็นไปได้ว่าการทำงานของโปรตีน *UCP* ลดลงและมีผลทำให้การทำงานของยีน *FAT/CD36* สูงขึ้น

ในส่วนของยีนแสดงออกของยีน *FATP4* ในเนื้อพบว่าสอดคล้องกับสาเหตุข้างต้น แต่ในตัวไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีการเสริมสาร antioxidant และกลุ่ม control แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่จะพบความแตกต่างเมื่อเสริมสาร antioxidant (P-value =0.070) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในตัวจะมีการแสดงออกของยีน *FATP4* น้อยกว่าในเนื้อ (Fanli et al., 2018) จึงเป็นผลทำให้ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *FATP4* ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

ตารางที่ 4.1 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน

Treatment*	Relative expression ratio (mean)					
	FATP4		LPL		FAT/CD36	
	liver	meat	liver	meat	liver	meat
Control ¹	1.075	1.1014 ^d	1.006 ^d	1.001 ^c	1.026 ^d	1.006 ^c
E-200 ²	1.130	1.538 ^{b,c}	3.071 ^{a,b}	0.955 ^c	2.029 ^{b,c}	0.460 ^d
CUR-20 ³	1.411	1.920 ^a	4.843 ^a	1.246 ^b	3.774 ^a	1.195 ^c
CUR-40 ⁴	0.855	1.977 ^a	4.495 ^{a,b}	0.938 ^c	2.844 ^b	1.667 ^b
CUR-60 ⁵	1.453	1.417 ^{b,d}	2.645 ^{c,d}	1.653 ^a	1.045 ^d	0.646 ^d
CUR-80 ⁶	1.367	1.860 ^{b,c}	3.028 ^{b,c}	1.349 ^b	1.278 ^c	2.134 ^a
P-value	0.070	0.020	0.037	0.00	0.00	0.00

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; FATP4 = Fatty acid transport Protein 4; LPL = Lipoprotein Lipase; FAT/CD36 = Fatty acid translocase

4.2.2 ผลของการเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme (SOD and CAT gene)

จากการผลศึกษาพบว่า การเสริม Curcuminoids ร่วมกับ Tuna oil ไม่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme (SOD and CAT gene) (P-Value < 0.05) (แสดงดังตารางที่ 3.2) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐาน

จากการทบทวนเอกสาร กระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีอยู่ 2 วิธีคืออาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่มีหน้าที่เป็น antioxidant และการเสริมสาร Curcuminoids ที่เป็น antioxidant โดยมีความสามารถในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย และสามารถยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation โดยการจำกัด superoxide anion และ hydroxyls free radicals (Ruby et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ SOD และ CAT เพิ่มสูงขึ้นเมื่อไก่ได้รับผงขมิ้นที่มีปริมาณ 0.3 และ 0.6 กรัมต่อกิโลกรัม (Ahmadi, 2010) แต่จากการทดลองพบว่าระดับของ Curcuminoids ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน SOD และ CAT ทั้งนี้การที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่สังเกตได้จากสาเหตุดังนี้

ประเด็นที่หนึ่ง ในการทดลองในครั้งนี้ใช้ไก่โคราชซึ่งเป็นไก่ลูกผสมระหว่างไก่พันธุ์พื้นเมืองและไก่ มทส ซึ่งเป็นไก่ที่มีการเจริญเติบโตช้า โดยไก่ดังกล่าวมีความสามารถทนต่อ oxidative stress ได้มากกว่าไก่ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Nain et al., 2008) จากสาเหตุดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อไก่สามารถทนต่อความเครียดต่างๆ ได้ดี จะส่งผลให้ระดับของ ROS ที่ผลิตในร่างกายมีปริมาณต่ำ ดังนั้นการเสริมสาร curcuminoids จึงไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme

ประเด็นที่สอง สาเหตุที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกตัวสัตว์ที่เหนี่ยวนำให้เกิด ROS อย่างอาหารที่มีปริมาณกรดไขมันที่มีพันธะคู่ มักจะเกิดการ oxidation และเสถียรภาพของกรดไขมัน (Min, 2008) นอกจากนี้ ความร้อน ความเครียด ยังส่งผลต่อการเกิด ROS (Mujahid et al., 2007) ซึ่งในการศึกษานี้มีสาเหตุที่เหนี่ยวนำให้เกิด ROS คืออาหารที่มีในน้ำมันปลาทูน่าและอูณหภูมิ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าระดับของ ROS ในที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณที่น้อยมากและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็น antioxidant ในร่างกายทำได้อย่างเพียงพอหรือมีการเกิด ROS ในปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อมีการเสริมสาร curcuminoids ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่า

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme

4.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในตับ

เพื่อทดสอบสมมุติฐานข้อที่ 2 ที่ว่าการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันการเกิด oxidation ในตับจะมีความสัมพันธ์กันเมื่อไก่ได้รับการเสริมแหล่งกรดไขมันที่มี n-3 PUFA และการเสริม curcuminoids ในระดับที่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *SOD* มีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับการแสดงออกของยีน *FATP4* ในกลุ่ม control ($R^2 = 0.986$, P-Value = 0.032) (แสดงดังตารางที่ 4.2)

จากที่กล่าวไปแล้วว่าปริมาณของกรดไขมันจะกระตุ้นให้ยีน *FATP4* ทำงานและขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ (Gimeno, 2007) ส่วนยีน *SOD* จะทำงานเมื่อถูกกระตุ้นจาก ROS ในร่างกาย (Apel and Hirt, 2004) ซึ่งการที่พบความสัมพันธ์ในกลุ่มที่ไม่ได้มีการเสริมสาร antioxidant ลงในอาหารที่ไก่ได้รับเกิดจากสาเหตุดังนี้

ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เหนียวน่าให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำให้มีผลต่อการฟอร์มตัวของ lipoprotein และทำให้ปริมาณกรดไขมันที่มีพันธะคู่ลดลงหรือเสียหายไป (Halliwell and Gutteridge, 1990) ดังนั้นหากในร่างกายมีปริมาณของ ROS ไม่มากหรือมีในปริมาณที่ยีน *SOD* สามารถกำจัดสารดังกล่าวได้ ปริมาณกรดไขมันจะไม่ถูกทำลายและขนส่งเข้าเซลล์ตับได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวคือหากเอนไซม์ *SOD* ทำงานได้ดี ยีน *FATP4* จะทำงานได้ดีเช่นกันเนื่องจากกรดไขมันที่มีพันธะคู่จะไม่ถูกทำลายน้อยลง

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *SOD* ในทิศทางตรงกันข้ามกับการแสดงออกของยีน *FAT/CD36* ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoids ที่ 40 ppm ($R^2 = -0.985$, P-Value = 0.015) (แสดงดังตารางที่ 4.2)

จากตารางที่ 4.1 ผลของการเสริม curcuminoids ที่ระดับ 40 ppm มีการแสดงออกของยีน *FAT/CD36* ในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่ม control ซึ่งยีนดังกล่าวมีหน้าที่ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ โดย curcuminoid จะลดการ transcription ของ PPARs โดยการเหนียวน่าของ AMPK (Kim and He, 2013a) และยีน *PPARs* จะลดการทำงานของ UCP ซึ่ง UCP จะลดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ (Gutgesell et al., 2009)

จากการทบทวนเอกสารพบว่า การแสดงออกของยีน และเอนไซม์หรือโปรตีนมีความสัมพันธ์กันเพียง 40% ซึ่งระดับของความสัมพันธ์จะขึ้นอยู่กับสภาวะการทดลอง (Vogel and Marcotte, 2012) จากสาเหตุนี้มีความเป็นไปได้ว่ายีน *SOD* จะทำงานสูงหรือต่ำ แต่เอนไซม์ *SOD* มีการทำงานในทิศทางที่ไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนได้ จากที่กล่าวไปนั้นมีทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพบความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกันระหว่างการแสดงออกของยีน *SOD* และยีน *FAT/CD36*

กรณีความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *LPL* และยีน *FAT/CD36* ($R^2 = -0.982$, P-Value = 0.02) ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoid ซึ่งพบแนวโน้มความสัมพันธ์ไปในทิศทางตรงกันข้าม เนื่องจากเอนไซม์ *LPL* จะทำงานนอกเซลล์เพื่อ hydrolyze chylomicron เพื่อปลดปล่อยกรดไขมัน ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นก่อนที่โปรตีน *FAT/CD36* จะขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ แต่จากการรายงานของ Camps et al. (1991) กล่าวว่ายีน *LPL* มีการทำงานต่ำในตับ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าจะพบความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวในทิศทางตรงกันข้ามกัน

4.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในเนื้อ

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ antioxidant enzyme (แสดงดังตารางที่ 4.3) พบแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน

และยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ antioxidant enzyme เมื่อได้รับสารมีการเสริมสาร antioxidant นั้นแสดงว่าการทำงานของยีนทั้งสองกลุ่มมีความเกี่ยวเนื่องกันหรือมีการทำงานร่วมกันในเนื้อ

จากการทบทวนเอกสารพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อยีน Antioxidant enzyme คือระดับ ROS และที่ส่งผลต่อยีน fatty acid transportation คือระดับของ Fatty acid โดยสิ่งที่ทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่าง Antioxidant enzyme ยีน และยีนที่เกี่ยวข้องกับ fatty acid transportation คือ การที่ fatty acid transportation ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ต่างๆ จะมีวัตถุประสงค์ที่ต่างกัน โดยในเนื้อจะสร้างพลังงานโดยกระบวนการ beta oxidation (Frayn et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าระดับของกรดไขมันในแต่ละอวัยวะจะแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้การทำงานของ fatty acid transportation มีความแตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ ROS มีอิทธิพลต่อการทำงานของ antioxidant enzyme gene และมีงานวิจัยที่พบว่าระดับของ ROS ในแต่ละอวัยวะมีความแตกต่างกัน และการทำงานของ Curcumin ส่งผลต่อระดับของ ROS ในแต่ละอวัยวะที่แตกต่างกัน ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีน antioxidant enzyme

4.3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ระหว่างเนื้อและตับ

จากผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน SOD และ CAT ระหว่างเนื้อและตับ แต่พบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน FATP4 ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร antioxidant ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่า และพบความสัมพันธ์ของยีน LPL และ FAT/CD36 ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoids ที่ 40 ppm (P-value ≤ 0.05) แสดงดังตารางที่ 4.4

กรณีที่ไม่พบความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme เนื่องจากยีนทั้งสองเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่เป็น antioxidant enzyme และในทางทฤษฎียีนทั้งสองมีกระบวนการทำงานที่สืบเนื่องกัน คือ เอนไซม์ SOD เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่ catalyze ROS และเปลี่ยน ROS ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ก่อน หลังจากนั้น จะมีการทำปฏิกิริยาต่อด้วยเอนไซม์ CAT ทำให้ได้น้ำ (H_2O) และก๊าซออกซิเจน (O_2) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (El-Beltagi and I. Mohamed, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ (Whitehead and Crawford, 2005) กล่าวว่า การแสดงออกของยีนในสัตว์ประชากรเดียวกันแต่ต่าง tissue จะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันประมาณ 76% ในตัวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism ของสารต่างๆ ทั้ง ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต จึงมีอัตราการเกิด respiration ที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative phosphorylation มีการแสดงออกน้อยในตับ ดังนั้นจากสาเหตุนี้ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าจะไม่พบความสัมพันธ์ของยีนที่มีการแสดงออกใน tissue ที่ต่างกัน

กรณีที่พบความสัมพันธ์ของยีน *FATP4* ในที่มีการเสริมสาร antioxidant โดยมีแนวโน้มความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจาก curcuminoid จะลดการ transcription ของ PPARs โดยการเหนี่ยวนำของ AMPK (Kim and He, 2013a) และยีน *PPARs* จะลดการทำงานของโปรตีน UCP ซึ่งโปรตีน UCP จะลดการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ (Gutgesell et al., 2009) ดังนั้นเมื่อ curcuminoid สูง จะลดการทำงานของการทำงานของยีน *FATP4* และมีกลไกการทำงานที่เหมือนกันทั้งเนื้อและตับ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบความสัมพันธ์ของยีนในอวัยวะที่แตกต่างกัน

ส่วนความสัมพันธ์ของยีน *LPL* ในเนื้อและตับมีแนวโน้มความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกันมีสาเหตุเนื่องจากรายงานของ Camps et al. (1991) พบว่าการแสดงออกของยีน *LPL* จะสูงในเนื้อแต่ในตับมีการแสดงออกน้อย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบความสัมพันธ์ในเชิงลบ

ความสัมพันธ์ของยีน *FAT/CD36* ในเนื้อและตับมีความสัมพันธ์กันในทิศทางบวก เนื่องจากยีน *FAT/CD36* ในกลุ่มที่มีการเสริมสาร curcuminoid เนื่องจาก curcuminoid มีผลต่อการแสดงออกของยีน *FAT/CD36* โดยกระตุ้นการทำงานผ่านทาง cAMP (Zingg et al., 2013) จากเหตุผลที่กล่าวมานั้น แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทำงานของสาร curcuminoid ต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวทั้งในเนื้อและตับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในอวัยวะที่ต่างกัน



ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในตับ

gene		Expression of Antioxidant Enzyme and fatty acid transport gene											
		Treatment											
		¹ Control		² E-200		³ Cur-20		⁴ Cur-40		⁵ Cur-60		⁶ Cur-80	
		R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value
<i>SOD</i>	<i>CAT</i>	0.360	0.640	0.310	0.690	-0.406	0.594	0.335	0.665	0.497	0.503	0.545	0.455
	<i>FATP4</i>	0.968*	0.032	0.374	0.629	-0.859	0.141	0.790	0.210	-0.108	0.892	-0.913	0.087
	<i>LPL</i>	-0.573	0.427	0.134	0.866	-0.292	0.708	-0.746	0.254	0.402	0.598	0.274	0.735
	<i>FAT/CD36</i>	-0.950	0.05	0.174	0.826	0.433	0.557	0.985*	0.015	0.732	0.268	0.375	0.625
<i>CAT</i>	<i>FATP4</i>	0.346	0.654	-0.188	0.812	-0.155	0.885	0.832	0.168	-0.882	0.118	-0.599	0.401
	<i>LPL</i>	-0.970	0.030	0.328	0.672	0.525	0.475	0.377	0.623	0.136	0.864	0.909	0.091
	<i>FAT/CD36</i>	-0.193	0.807	-0.787	0.213	-0.646	0.354	-0.264	0.128	0.582	0.418	0.044	0.956
<i>FATP4</i>	<i>LPL</i>	-0.565	0.435	0.776	0.224	-0.033	0.967	-0.191	0.809	0.28	0.72	-0.222	0.778
	<i>FAT/CD36</i>	-0.852	0.148	-0.03	0.97	-0.071	0.929	-0.755	0.245	-0.144	0.856	0.034	0.966
<i>LPL</i>	<i>FAT/CD36</i>	0.4	0.6	-0.652	0.348	-0.980*	0.02	0.783	0.217	0.853	0.147	0.183	0.817

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; CAT = catalase; FATP4 = Fatty acid transport Protein 4; LPL = Lipoprotein Lipase; FAT/CD36 = Fatty acid translocase * correlation (P<0.05)

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ในเนื้อ

item	Expression of Antioxidant Enzyme and fatty acid transport gene											
	Treatment											
	¹ Control		² E-200		³ Cur-20		⁴ Cur-40		⁵ Cur-60		⁶ Cur-80	
	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value
<i>SOD CAT</i>	0.901	0.099	0.007	0.993	0.334	0.666	-0.061	0.939	-0.473	0.527	-0.413	0.587
<i>FATP4</i>	-0.431	0.569	-0.831	0.169	0.749	0.251	0.062	0.983	-0.567	0.433	-0.913	0.087
<i>LPL</i>	0.075	0.925	-0.793	0.207	-0.447	0.553	0.022	0.972	0.693	0.307	0.274	0.735
<i>FAT/CD36</i>	0.179	0.821	0.381	0.691	0.528	0.472	-0.512	0.488	0.375	0.625	-0.189	0.811
<i>CAT FATP4</i>	0.00	1.00	0.075	0.925	-0.346	0.636	0.951*	0.049	0.437	0.563	-0.877	0.123
<i>LPL</i>	-0.109	0.891	-0.614	0.386	-0.679	0.321	0.959*	0.041	-0.882	0.118	0.136	0.864
<i>FAT/CD36</i>	-0.189	0.811	-0.054	0.946	0.977*	0.023	-0.911	0.089	0.221	0.779	-0.020	0.980
<i>FATP4 LPL</i>	-0.288	0.712	0.598	0.402	-0.052	0.948	0.932	0.068	-0.461	0.539	0.571	0.429
<i>FAT/CD36</i>	-0.866	0.134	0.187	0.813	-0.156	0.844	-0.747	0.253	0.974*	0.026	-0.053	0.947
<i>LPL FAT/CD36</i>	-0.169	0.831	-0.287	0.713	-0.727	0.273	-0.51	0.49	-0.263	0.737	-0.125	0.875

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; CAT = catalase; FATP4 = Fatty acid transport Protein 4; LPL = Lipoprotein Lipase; FAT/CD36 = Fatty acid translocase * correlation (P < 0.05)

ตารางที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและยีนที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme ระหว่างเนื้อและตับ

item	Expression of Antioxidant Enzyme and fatty acid transport gene											
	Treatment											
	¹ Control		² E-200		³ Cur-20		⁴ Cur-40		⁵ Cur-60		⁶ Cur-80	
	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value	R ²	P-value
Liver x Meat												
<i>SOD</i>	0.899	0.101	-0.50	0.50	-0.738	0.262	-0.237	0.763	0.535	0.465	0.049	0.951
<i>CAT</i>	0.791	0.209	-0.191	0.809	0.018	0.982	0.174	0.826	-0.666	0.334	0.735	0.265
<i>FATP4</i>	-0.121	0.879	1.000**	0.00	1.000**	0.00	1.000**	0.00	1.000**	0.00	1.000**	0.00
<i>LPL</i>	0.444	0.556	0.505	0.495	-0.265	0.735	-0.984*	0.016	0.267	0.733	-0.652	0.348
<i>FAT/CD36</i>	-0.172	0.828	0.906	0.094	-0.717	0.283	0.966*	0.034	-0.049	0.951	0.712	0.288

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; CAT = catalase; FATP4 = Fatty acid transport Protein 4; LPL = Lipoprotein Lipase; FAT/CD36 = Fatty acid translocase * correlation (P < 0.05)



4.4 เอกสารอ้างอิง

- Ahmadi, F. 2010. Effect of Turmeric (*Curcumin longa*) powder on performance, oxidative stress state and some of blood parameters in broilers fed on diets containing aflatoxin **Global Veterinaria** 5: 312-317.
- Akinloye, O. M. I. a. O. A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**
- Apel, K., and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol** 55: 373-399. doi: 10.1146/annurev. arplant.55.031903. 141701.
- Ayala, A., M. Muñoz, and S. Argüelles. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**: 360438. doi: 10.1155/2014/360438.
- Camps, L., M. Reina, M. Llobera, G. Bengtsson-Olivecrona, T. Olivecrona, and S. Vilaro. 1991. Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. **Journal of lipid research** 32(12): 1877-1888.
- Drevon, A. C. R. a. N. C. A. 2005. Fatty Acids: Structures and Properties. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**.
- El-Beltagi, H., and H. I. Mohamed. 2013. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism.
- Fanli, K., J. Luo, J. Sun, D. He, Z. Yang, Q. Zhu, and Y. Liu. 2018. Tissue and ontogenic expression profiles of FATP1 and FATP4 genes in goose. **Afr. J. Biotechnol.** 11.
- Frayn, K. N., P. Arner, and H. Yki-Jarvinen. 2006. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. **Essays Biochem** 42:89-103. doi: 10.1042/bse0420089.
- Gbaguidi, F. G., G. Chinetti, D. Milosavljevic, E. Teissier, J. Chapman, G. Olivecrona, J. C. Fruchart, S. Griglio, J. Fruchart-Najib, and B. Staels. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. **FEBS Lett** 512(1-3): 85-90.

- Jimeno, R. E. 2007. Fatty acid transport proteins. **Curr Opin Lipidol** 18(3):271-276. doi: 10.1097/MOL.0b013e3281338558.
- Grotto, D., L. Santa Maria, J. Valentini, C. Paniz, G. Schmitt, S. Garcia, V. Juarez Pomblum, J. B. Rocha, and M. Farina. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification.
- Gutgesell, A., R. Ringseis, E. Schmidt, C. Brandsch, G. I. Stangl, and K. Eder. 2009. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. **J Mol Endocrinol** 43(6): 241-250. doi: 10.1677/jme-09-0064.
- Halliwell, B., and J. M. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 186: 1-85.
- Hang, T. T. T., W. Molee, S. Khempaka, and N. Paraksa. 2018. Supplementation with curcuminoids and tuna oil influenced skin yellowness, carcass composition, oxidation status, and meat fatty acids of slow-growing chickens. **Poult Sci.** 97(3): 901-909. doi: 10.3382/ps/pex385.
- Hosseini, J., A. Golian, A. Yaghobfar, A. Zarban, N. Afzali, and P. Esmailinasab. 2012. Antioxidant status, immune system, blood metabolites and carcass characteristic of broiler chickens fed turmeric rhizome powder under heat stress.
- Kim, I., and Y.-Y. He. 2013a. Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. **Front Oncol** 3: 175. doi: 10.3389/fonc.2013.00175.
- Kim, I., and Y. Y. He, 2013b. Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. **Frontiers in oncology** 3: 175. doi: 10.3389/fonc.2013.00175.
- Leyton, J., P. J. Drury, and M. A. Crawford. 1987. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. **British Journal of Nutrition** 57(3): 383-393.
- Min, B., K. C. Nam, J. Cordray, and D. U. Ahn. . 2008. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. **J. Food Sci.** 73: 439-446.
- Mujahid, A., N. Pumford, W. Bottje, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Y. Akiba, and M. Toyomizu. 2007. Mitochondrial Oxidative Damage in Chicken Skeletal Muscle Induced by Acute Heat Stress.

- Nain, S., B. Ling, B. Bandy, J. Alcorn, C. Wojnarowicz, B. Laarveld, and A. A. Olkowski. 2008. The role of oxidative stress in the development of congestive heart failure in a chicken genotype selected for rapid growth. **Avian Pathol** 37(4): 367-373. doi: 10.1080/03079450802179850.
- Ricquier, D., and F. Bouillaud. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochem J** 345 Pt 2: 161-179.
- Sugeng, H., S., Saraswati, S, H., and Ayu, F, I. 2014. Fatty Acid Composition of Some Potential Fish Oil from Production Centers in Indonesia. **Orient Journal Chemical** 30(3): 975-980.
- Teres, G., Valencak., L. G., Sarah, Ohrnberger., Nicole J Culbert, and Thomas Ruf. 2015. Healthy n-6/n-3 fatty acid composition from five European game meat species remains after cooking. **biomed center**.
- Vogel, C., and E. M. Marcotte. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet** 13(4): 227-232. doi: 10.1038/nrg3185.
- Whitehead, A., and D. L. Crawford. 2005. Variation in tissue-specific gene expression among natural populations. **Genome Biology** 6(2): R13-R13. doi: 10.1186/gb-2005-6-2-r13.
- Wood, Z. A., L. B. Poole, and P. A. Karplus. 2003. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science (New York, N.Y.)** 300(5619): 650-653. doi: 10.1126/science.1080405.
- Zingg, J. M., S. T. Hasan, and M. Meydani. 2013. Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. **Biofactors** 39(1): 101-121. doi: 10.1002/biof.1072.

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเรื่องการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันและ Antioxidant enzyme ต่อ การสะสมของ n-3 PUFA ในเนื้อไก่ สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมัน เมื่อไก่ได้รับอาหารที่เสริม curcuminoids ร่วมกับน้ำมันปลาพบว่า การแสดงออกของยีน *FAT/CD36*, *FATP4* และยีน *LPL* มีการแสดงออกในเนื้อที่แตกต่างกัน แต่ในด้านการแสดงออกของยีน *FATP4* ไม่แตกต่างกันในตับ เมื่อได้รับอาหารที่มีสาร curcuminoid ดังนั้นจึงสามารถนำยีนเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้เป็น marker gene ได้ แต่อย่างไรก็ตามหากจะนำผลการศึกษาลงไปประยุกต์ใช้เป็น marker gene จำเป็นต้องใช้ร่วมกับอาหารที่มีการเสริมสาร curcuminoid และน้ำมันปลา และควรจะต้องให้ความสนใจและศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ความถี่ของยีนเหล่านี้ในประชากร
- polymorphism ของยีนในประชากรที่ศึกษา
- ศึกษาการแสดงออกของยีนเหล่านี้ร่วมกับการเสริมสาร curcuminoid และน้ำมันปลา ในระดับที่ต่างกัน

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme เมื่อไก่ได้รับอาหารที่เสริม curcuminoids ร่วมกับน้ำมันปลาพบว่า การแสดงออกของยีน *SOD* และยีน *CAT* เมื่อได้รับอาหารที่มีการเสริมสาร curcuminoid ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถนำผลการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้เป็น marker gene ได้ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องดังต่อไปนี้

- ศึกษาการแสดงออกของยีน *SOD* และยีน *CAT* ร่วมกับการเสริมสาร curcuminoid ร่วมกับน้ำมันปลา ในระดับที่ต่างกัน

- ศึกษาการอัตราการเกิด lipid peroxidation และปริมาณการสะสมกรดไขมันในตับ

3. ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งกรดไขมันและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Antioxidant enzyme จากการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ของยีนทั้งสองกลุ่มในเนื้อ เมื่อได้รับอาหารที่เสริมสาร curcuminoid และพบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *FATP4* ในเนื้อและตับ ซึ่งจากการพบความสัมพันธ์ในการศึกษาลงครั้งนี้

สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุกรรมในประชากรที่ศึกษาร่วมกับการใช้อาหารที่เสริมสาร curcuminoid ร่วมกับน้ำมันปลาทูน่า

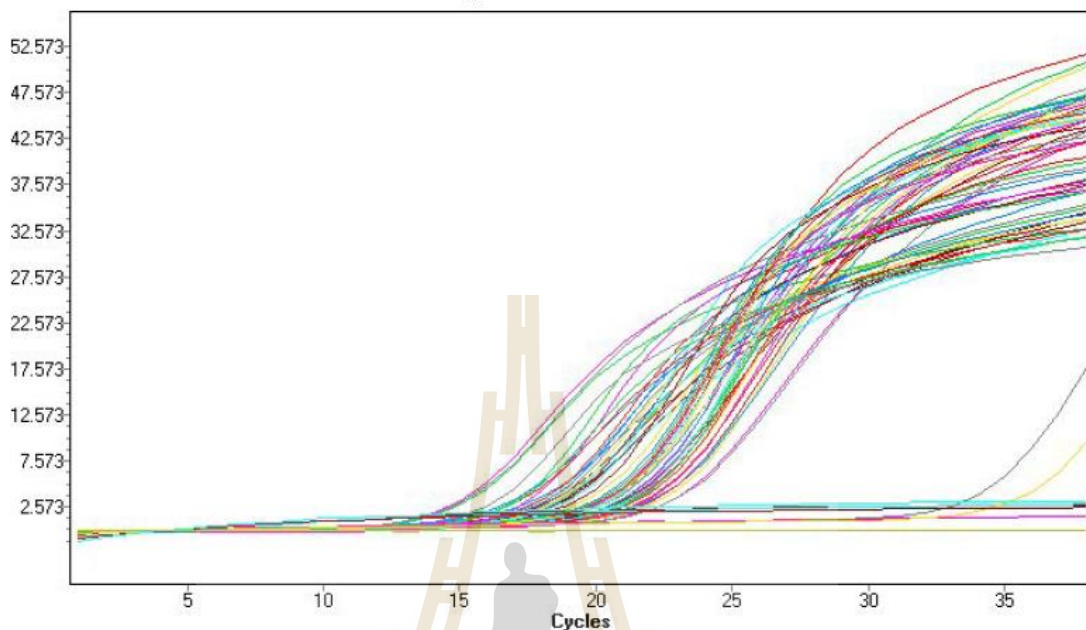




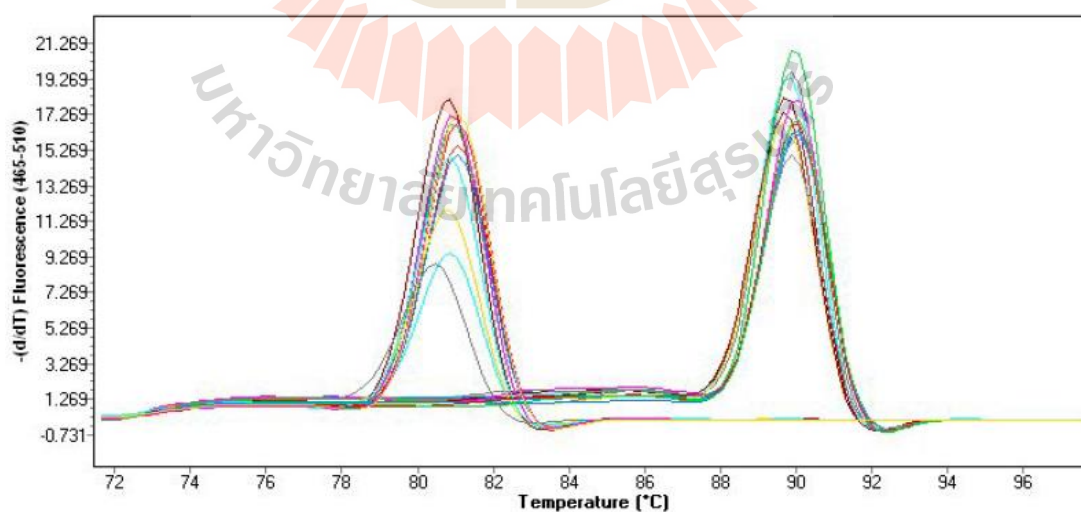
ภาคนว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพประกอบการแสดงออกของยีน



ภาพที่ ก.1 Amplification curve ของการแสดงออกของยีนที่ได้จากเครื่อง real time PCR รุ่น Roche480



ภาพที่ ก.2 melting curve ของยีนที่ใช้ศึกษา (real time PCR รุ่น Roche480)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศิริประภา หอมขจร เกิดเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดบุรีรัมย์ เข้าศึกษาชั้นอนุบาล ชั้นประถม ที่โรงเรียนอนุบาลบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ และเข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม จังหวัดบุรีรัมย์ ในปี พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา พ.ศ. 2559

