

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์และกิจกรรมของกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมแพะ

Comparison of malondialdehyde concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and mammary epithelial cells isolated from goat milk

หนึ่งนุช สายปิ่น¹, มาริสา แก้วสุวรรณ², รัชดา สาดตระกูลวัฒนา^{3*}

Nungnuch Saipin¹, Marisa Keawsuwan², Rachada Sadtragoolwatana^{3*}

Received: 28 December 2020 ; Revised: 4 March 2021 ; Accepted: 30 March 2021

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) และกิจกรรมของ glutathione peroxidase (GPx) ในตัวสัตว์และเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมแพะ แม่แพะพันธุ์ซาเนนจำนวน 24 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามเดือนที่ 1, 2 และ 3 ของระยะการให้นม ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนม ผลการทดลองพบว่า แพะกลุ่มที่ 2 มีความเข้มข้นของพลาสมา MDA และกิจกรรมของ GPx สูงกว่ากลุ่มที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในทางกลับกันความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมของกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) สรุปได้ว่าความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx สามารถตรวจวัดได้ทั้งจากพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนม นอกจากนี้การทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทั้งความเข้มข้นของ MDA ($R^2 = 0.0648$) และกิจกรรมของ GPx ($R^2 = 0.0399$) ระหว่างพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของพลาสมา MDA และกิจกรรมของ GPx

คำสำคัญ: กิจกรรมของกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส น้ำนมแพะ ความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ เซลล์เยื่อบุเต้านม

Abstract

The purpose of this study was to measure malondialdehyde (MDA) concentration and glutathione peroxidase (GPx) activity in the animals and the mammary epithelial cells (MECs) isolated from goat milk. Twenty-four Saanen goats were allocated into three groups according to the first, second, and third months of their lactation periods. Plasma samples and MECs isolated from milk were collected. The results showed that plasma MDA concentration and GPx activity from the second group were significantly higher ($P < 0.05$) than that of the first and the third group. On the other hand, MDA concentration and GPx activity of MECs isolated from milk showed no significant difference ($P > 0.05$) in the experimental groups. In conclusion, MDA concentration and GPx activity occurred in both plasma and MECs isolated from milk. In addition, the correlation coefficient of both MDA concentration ($R^2 = 0.0648$) and GPx activity ($R^2 = 0.0399$) of plasma and MECs isolated from milk showed no correlation. This suggested that MECs isolated from milk cannot be used to replace plasma as the sample for measuring MDA concentration and GPx activity.

Keywords: Glutathione peroxidase (GPx) activity, Goat milk, Malondialdehyde (MDA) concentration, Mammary epithelial cells

¹ อาจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร 10240

² อาจารย์, ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร 10240

³ อาจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร 10240

¹ Lecturer, Division of Agricultural Technology, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

² Lecturer, Department of Statistic, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

³ Lecturer, Department of Food Technology, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

* Corresponding author: Rachada Sadtragoolwatana, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Ramkhamhaeng Road, Hua Mark, Bangkok, 10240, Thailand, e-mail: srachada@hotmail.com

บทนำ

การเลี้ยงแพะนมในประเทศไทยที่มีสภาพอากาศแบบร้อนชื้น ส่งผลกระทบต่อการให้ผลผลิตน้ำนม ผนวกกับระยะแรกของการให้นม แม่แพะนมพันธุ์ซาเนนมีอัตราการให้นมสูงร่วมกับอัตราการเผาผลาญพลังงานและการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุเต้านม (Mammary epithelial cells ; MECs) สูงขึ้น ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเสียและความเครียดออกซิเดชันมาก และรวดเร็วส่งผลเสียต่อการคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ความมีชีวิต และการทำหน้าที่สังเคราะห์น้ำนมของเซลล์เยื่อบุเต้านม (Bernabucci *et al.*, 2002 ; Hall *et al.*, 1994) นอกจากนี้ระดับความเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นไม่เพียงแต่เกิดผลเสียในระดับตัวสัตว์ ยังก่อความเสียหายต่อเซลล์ต่างๆ ในอวัยวะและหากความรุนแรงของความเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดความเสียหายของร่างกาย และมีผลกระทบโดยตรงในระดับเซลล์ เซลล์เยื่อบุเต้านมทำหน้าที่ในการสังเคราะห์น้ำนมลดลง (Bernabucci *et al.*, 2002) ทั้งนี้ระดับการเกิดความเครียดออกซิเดชันสามารถตรวจวัดจากตัวชี้วัดที่สำคัญ เช่น สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde ; MDA) ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญไขมันในระดับเซลล์ (Castillo *et al.*, 2006) และกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase ; GPx) ที่ตอบสนองต่อระดับ Reactive Oxygen Species (ROS) ที่เพิ่มขึ้น (Chance *et al.*, 1979)

การศึกษาลักษณะและการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุเต้านมส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างเซลล์เต้านมที่มีมาจากการกระบวนการตัดชิ้นเนื้อ (Biopsy) (Knight, *et al.*, 1992) แต่วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญที่มีความชำนาญในการตัดชิ้นเนื้อ รวมถึงมีกรรมวิธีการเตรียมตัวสัตว์ การรักษาความสะอาดระหว่างขั้นตอนและการดูแลรักษาผลหลังการตัดชิ้นเนื้อที่เข้มงวด ซึ่งทุกขั้นตอนมีความยุ่งยาก ทั้งยังทำให้เกิดความเจ็บปวดแก่ตัวสัตว์ รวมถึงต้องงดการจำหน่ายผลผลิตน้ำนมอันเนื่องมาจากกระบวนการหายของแผล นอกจากนี้ยังต้องมีมาตรการควบคุมความปลอดภัยทั้งแก่ผู้ปฏิบัติงานและต่อตัวสัตว์ เพื่อให้การศึกษามีความปลอดภัยตามหลักเกณฑ์ภายใต้บทบัญญัติของพระราชบัญญัติป้องกันการทารุณกรรมและการจัดสวัสดิภาพสัตว์ พ.ศ. 2557 และพระราชบัญญัติสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 ทำให้มีงานวิจัยที่มีแนวคิดการใช้เซลล์เยื่อบุเต้านมที่ได้จากน้ำนม เพื่อใช้เป็นตัวแทนเซลล์เยื่อบุเต้านม โดยมีการศึกษาและวิจัยมาระยะหนึ่ง จากการเก็บตัวอย่างน้ำนมคน (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1977) โคเนม (Sigl, *et al.*, 2012) และแพะ (Boutinaud *et al.*, 2002) ผลการศึกษสามารถแยกเซลล์ได้และเมื่อนำมาจำแนกชนิดและคุณลักษณะจำเพาะของเซลล์พบว่าเซลล์เยื่อบุเต้านม ทั้งยังนำมาใช้ศึกษาการทำหน้าที่ของเซลล์เยื่อบุ

เต้านมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Hu *et al.*, 2016 ; Peng *et al.*, 2011 ; Tao *et al.*, 2011)

อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในระดับตัวสัตว์และเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมแพะระหว่างการให้นมนั้นยังไม่กว้างขวาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx และหาความสัมพันธ์ในระดับตัวสัตว์และเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมแพะ

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง และวิธีเก็บรวบรวมข้อมูล

การทดลองได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย สาขาการดำเนินการต่อสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยรามคำแหง เลขที่ RU-LARESC-62/001

แม่แพะนมพันธุ์ซาเนนอายุระหว่าง 3-6 ปี น้ำหนักเฉลี่ยก่อนคลอด 38-46 กิโลกรัม เลี้ยงในคอกรวม แบ่งกลุ่มแยกตามระยะการให้นมช่วงเดือนที่หนึ่ง (0-30 วันหลังคลอด) จำนวน 8 ตัว เดือนที่สอง (31-60 วันหลังคลอด) จำนวน 10 ตัว และเดือนที่สาม (61-90 วันหลังคลอด) จำนวน 6 ตัว ตามลำดับอาหารที่ให้แม่แพะระหว่างการทดลองเป็นอาหารชั้นสำเร็จรูปชนิดเม็ดสูตรสำหรับแพะระยะให้นม โปรตีน 16% โดยให้กินเต็มที่ วันละ 2 ครั้ง เวลา 05.00 น. และ 15.00 น. หญ้าแพงโกล่าแห้งจัดไว้ให้แพะสามารถกินได้ตลอดเวลา น้ำดื่มสะอาดตั้งไว้ให้กินอย่างอิสระ และเกลือแร่ก้อนจัดไว้ภายในคอกเพื่อให้แพะสามารถเลียกินได้ตามความต้องการ

การเก็บตัวอย่างเลือดจากแพะกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ทำเวลา 07.00 น. ในวันที่ 30, 60 และ 90 ตามลำดับ โดยเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำใหญ่ที่คอ (Jugular vein) ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อตัว เก็บในหลอดเก็บเลือดที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) นำเลือดที่ได้ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนเม็ดเลือดแดงและพลาสมาด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน (Beckman CS-15R Centrifuge, Indianapolis, USA) ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างพลาสมาเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของพลาสมา MDA และกิจกรรมของ GPx การเก็บข้อมูลผลผลิตน้ำนมแพะทุกวันโดยวิธีวัดด้วยมือ 2 ครั้งต่อวัน ในเวลาเช้า (06.00 น.) และเย็น (16.00 น.) ซึ่งน้ำหนักน้ำนมและบันทึกผลเป็นหน่วยกิโลกรัม (Kg) ตัวอย่างน้ำนมจากแพะกลุ่มทดลองที่วัดในเวลาเช้าของวันที่ 30, 60 และ 90 แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบน้ำนม (Milk compositions) ด้วยเครื่อง Milkoscan (FT2 ; Foss, Hilleroed, Denmark) ส่วนที่ 2 ปริมาณ 250 มิลลิลิตร เก็บใน

ขวดพลาสติกปราศจากเชื้อเพื่อนำมาแยกเซลล์เยื่อบุเต้านมทันทีภายในห้องปฏิบัติการ โดยการปั่นเหวี่ยงน้ำมันดิบความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตะกอนเซลล์ (Cell pellets) ที่ได้ล้างทำความสะอาดไขมันและเศษตะกอนโปรตีนด้วย Phosphate buffer saline solution (PBS) 5 ครั้ง จนเซลล์ที่ได้สะอาดและไม่พบลักษณะของไขมันเกาะที่ตะกอนเซลล์ ตะกอนเซลล์เยื่อบุเต้านมที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx โดยการทดสอบที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย การวิเคราะห์สาร MDA จากปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมัน ด้วยชุดทดสอบ Lipid Peroxidation (MDA) Assay (Colorimetric) (ab118970, Abcam, USA) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (SpectraMax M3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GPx ในพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมัน ด้วยชุดทดสอบ Glutathione Peroxidase Assay (Colorimetric) (ab102530, Abcam, USA) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบผลผลิตน้ำมัน ส่วนประกอบน้ำมัน ความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมันของแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Duncan's Multiple Range test กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ระหว่างพลาสมา กับเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมันใช้การทดสอบแบบ Pearson Correlation ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาน้ำหนักตัวและการให้ผลผลิตน้ำมันของแพะแสดงใน Table 1 พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวแพะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยแพะกลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักตัวคิดเป็น 31.05 ± 5.39 กิโลกรัม น้อยกว่าแพะกลุ่มที่ 2 (45.18 ± 4.00 กิโลกรัม) และกลุ่มที่ 3 (55.80 ± 9.02 กิโลกรัม) ตามลำดับ ผลผลิตน้ำมันของแพะกลุ่มที่ 2 มีค่าเฉลี่ยคิดเป็น 3.03 ± 0.82 กิโลกรัม/วัน สูงกว่าแพะกลุ่มที่ 1 (1.60 ± 0.29 กิโลกรัม/วัน) และกลุ่มที่ 3 (1.22 ± 0.19 กิโลกรัม/วัน) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบน้ำมันของแพะทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ผลการศึกษาความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx แสดงใน Table 2 โดยแพะกลุ่มที่ 2 มีความเข้มข้นของพลาสมา MDA (1.70 ± 0.36 nmol/ml) สูงกว่าแพะกลุ่มที่ 1 (1.00 ± 0.30 nmol/ml) และกลุ่มที่ 3 (0.80 ± 0.50 nmol/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) รวมถึงกิจกรรมของ GPx แสดงผลในลักษณะเดียวกับความเข้มข้นของพลาสมา MDA โดยพบว่ากิจกรรมของ GPx ในพลาสมาของแพะกลุ่มที่ 2 (435.22 ± 88.22 nmol/ml) มีค่าสูงกว่าแพะกลุ่มที่ 1 (199.41 ± 87.28 nmol/ml) และกลุ่มที่ 3 (175.65 ± 83.42 nmol/ml) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยแพะกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีความเข้มข้นของ MDA คิดเป็น 0.11 ± 0.04 , 0.08 ± 0.02 และ 0.12 ± 0.03 nmol/ml และกิจกรรมของ GPx คิดเป็น 0.46 ± 0.41 , 1.66 ± 1.46 และ 1.20 ± 1.15 nmol/ml ตามลำดับ

ผลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่าความเข้มข้นของพลาสมา MDA และเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมันมีค่า $R^2 = 0.0648$ (Figure 1) และกิจกรรมของ GPx มีค่า $R^2 = 0.0399$ (Figure 2) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์กันของทั้งความเข้มข้นของ MDA ($P = 0.263$) และกิจกรรมของ GPx ($P = 0.442$) ระหว่างพลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำมัน

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวแพะกลุ่มที่อยู่ในช่วงเดือนที่หนึ่งของการให้นม มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าแพะที่อยู่ในช่วงเดือนที่สองและสาม ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแม่แพะในช่วงก่อนคลอดและหลังคลอดที่แพะเริ่มให้ผลผลิตน้ำมันส่งผลให้น้ำหนักตัวน้อย (Abuelo *et al.*, 2019; Kenyon *et al.*, 2014; Putman *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตามเมื่อแพะเริ่มปรับตัวและมีการให้อาหารช่อกินเต็มที่ ในระหว่างการทดลอง ร่วมกับการจัดการด้านการเลี้ยงดูที่เหมาะสม ทำให้สภาพร่างกายและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ผ่นวกกับการให้ผลผลิตน้ำมันในช่วงเดือนที่สองและสามเริ่มลดลง ขณะที่แพะยังคงมีการกินได้ปกติแต่ให้ผลผลิตต่ำจึงส่งผลต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในช่วงเดือนที่สองและสามของการให้นม

ความเครียดออกซิเดชันของแพะในการทดลองนี้วิเคราะห์ได้จากความเข้มข้นของ MDA ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญไขมัน (Castillo *et al.*, 2006; Kapusta *et al.*, 2018) และกิจกรรมของ GPx ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระโดยกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน เพื่อลดความเป็นพิษของสารอนุมูลอิสระที่อาจทำอันตรายต่อเซลล์

(Bernabucci *et al.*, 2002 ; Hall *et al.*, 1994 ; Miyamoto *et al.*, 2003) ทั้งนี้แพะให้นมในช่วงเดือนที่สองมีการให้ผลผลิตน้ำนมสูงขึ้น มีผลให้ความเข้มข้นของพลาสมา MDA และกิจกรรมของ GPx สูงกว่ากลุ่มอื่น (Celi, 2010 ; Chaiyabutr *et al.*, 2011)

Kapusta *et al.*, 2018 ; Mohebbi-Fani *et al.*, 2016) ในทางกลับกันความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมของแพะทุกกลุ่ม

ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) รวมถึงผลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx พบว่าระหว่าง พลาสมาและเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมไม่มีความสัมพันธ์กัน จากการทดลองสรุปได้ว่าแม่แพะพันธุ์ชานะระหว่างการให้ผลผลิตน้ำนมสูง ความเข้มข้นของพลาสมา MDA และกิจกรรมของ GPx สามารถบ่งชี้ความเครียดออกซิเดชันในภาพรวมระดับตัวสัตว์ได้

Table 1 Body weight (Kg), milk production (Kg/day) and milk compositions (g%) of the goats from the 1st, 2nd, and 3rd month of lactation periods

Item	Lactation periods			P-value
	1 st month	2 nd month	3 rd month	
Body weight (Kg)	31.05±5.39 ^c	45.18±4.00 ^b	55.80±9.02 ^a	<0.05
Milk production (Kg/day)	1.60±0.29 ^b	3.03±0.82 ^a	1.22±0.19 ^b	<0.05
Milk compositions				
Fat (g%)	3.42±0.41	3.66±0.74	3.87±0.38	0.434
Protein (g%)	3.27±0.45	2.99±0.21	3.26±0.18	0.220
Lactose (g%)	4.73±0.16	4.57±0.12	4.69±0.11	0.129
Total solid (g%)	12.48±0.52	11.96±1.07	12.81±0.37	0.179
Solid not fat (g%)	9.04±0.53	8.59±0.18	9.02±0.17	0.067

Values are presented as mean±SD.

Statistical significance of interaction effects among periods of lactations by ANOVA

^{a,b,c} Mean values within a row indicated with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

Table 2 Plasma and MECs MDA concentration (nmol/ml), Plasma and MECs GPx activity (nmol/ml) of the goats from the 1st, 2nd, and 3rd month of lactation periods

Item	Lactation periods			P-value
	1 st month	2 nd month	3 rd month	
Plasma MDA concentration (nmol/ml)	1.00±0.30 ^b	1.70±0.36 ^a	0.80±0.50 ^b	<0.05
Plasma GPx activity (nmol/ml)	199.41±87.28 ^b	435.22±88.22 ^a	175.65±83.42 ^b	<0.05
MDA concentration of MECs (nmol/ml)	0.11±0.04	0.08±0.02	0.12±0.03	0.109
GPx activity of MECs (nmol/ml)	0.46±0.41	1.66±1.46	1.20±1.15	0.184

Values are presented as mean±SD.

Statistical significance of interaction effects among periods of lactations by ANOVA

^{a,b,c} Mean values within a row indicated with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

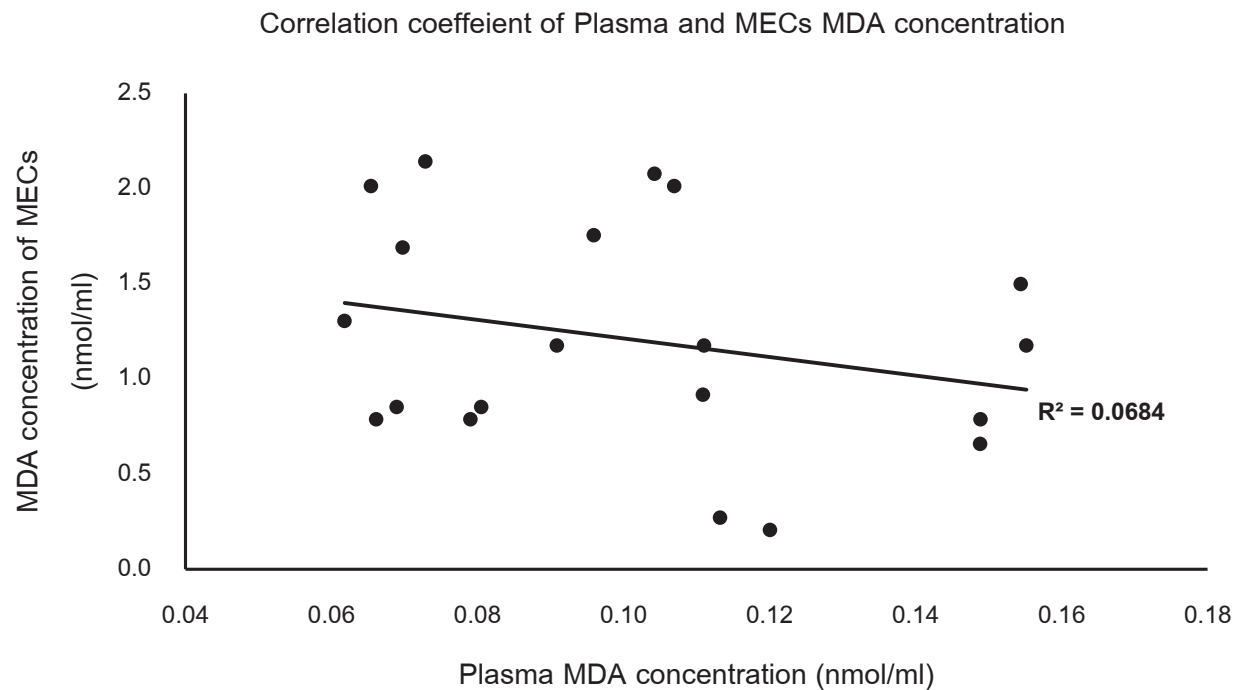


Figure 1 The Pearson correlation between plasma MDA concentration and MDA concentration of MECs of the goats in the experiment ($R^2=0.0684$)

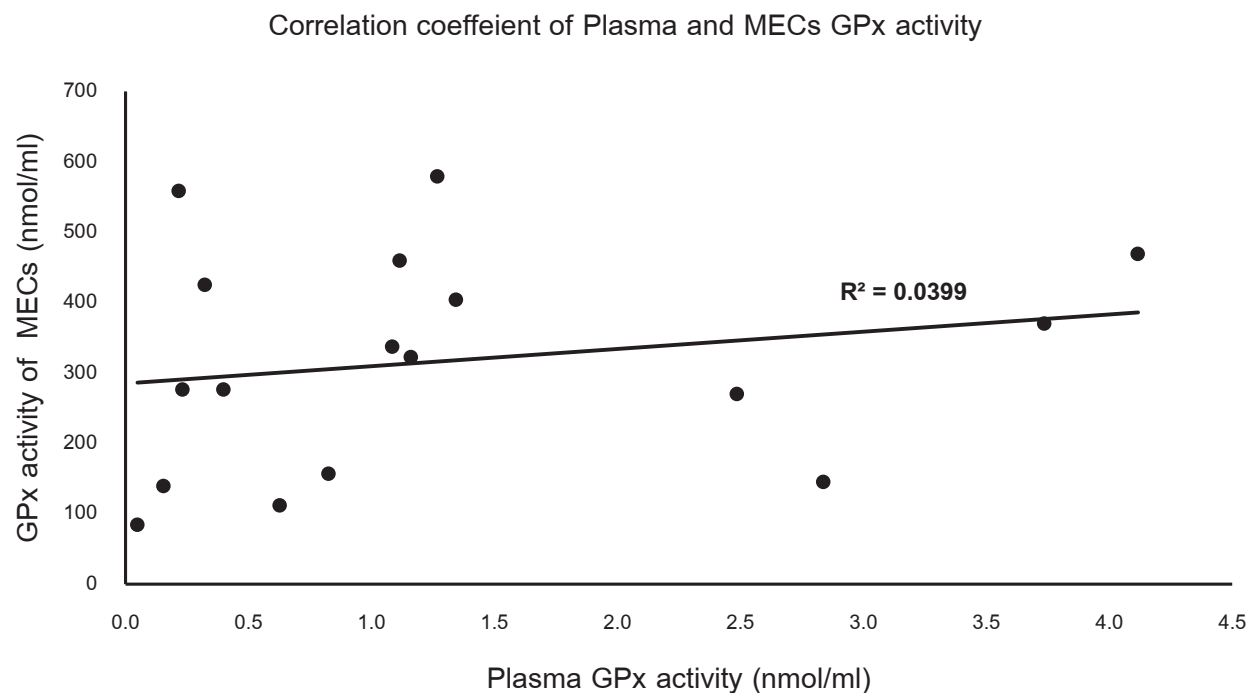


Figure 2 The Pearson correlation between plasma GPx activity and GPx activity of MECs of the goats in the experiment ($R^2=0.0399$)

แต่ในทางกลับกันเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมใช้บ่งชี้ความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในภาพรวมระดับตัวสัตว์ได้ต่ำ และไม่มีความสัมพันธ์กับพลาสมา จึงไม่สามารถใช้ทดแทนตัวอย่างพลาสมาเพื่อบ่งชี้ความเครียดออกซิเดชันในระดับตัวสัตว์ได้ ทำให้การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ที่เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาความเครียดออกซิเดชันในระดับตัวสัตว์ยังคงต้องเลือกวิธีการเก็บตัวอย่างเลือดและพลาสมาจากสัตว์ทดลอง ทั้งนี้ในสภาวะการเกิดความเครียดออกซิเดชันมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกายในช่วงคลอดลูก และการให้ผลผลิตของสัตว์ มีผลให้สารอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นแต่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระลดลง ย่อมส่งผลให้เกิดภาวะความเครียดออกซิเดชันตามมา นอกจากนี้อนุมูลอิสระในร่างกายที่สูงขึ้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันได้ในหลายรูปแบบ ทั้งแบบที่อาศัยสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (CAT) ที่พบได้ทั้งในเซลล์ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดแดง และในพลาสมา (Abeni *et al.*, 2007) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) ที่พบได้ทั้งในเซลล์และในพลาสมา (McCord & Fridovich, 1969) รวมถึงเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ที่พบมากในพลาสมา (Moolchandani, 2018) นอกจากนี้ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้น หรือได้รับจากอาหาร เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไธโอน กรดยูริก ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนิก (Beutler *et al.*, 1963 ; McDowell & Arthington, 2005) จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้ความสามารถต้านออกซิเดชันรวม (Total antioxidant capacity) ในตัวสัตว์และพลาสมามีประสิทธิภาพสูงและมากกว่าในเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนม ซึ่งอาศัยการทำหน้าที่ต้านออกซิเดชันหลักจากสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส (Spitz *et al.*, 1988) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Stralin & Marklund, 1994) และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Gille & Joenje, 1992 ; Miyamoto *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาบ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างจากเซลล์เยื่อบุเต้านมที่แยกได้จากน้ำนมสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของ MDA และกิจกรรมของ GPx ในเซลล์เยื่อบุเต้านมและในเต้านมแพะได้ ซึ่งช่วยให้เกิดประโยชน์ในการใช้เป็นตัวเลือกสำหรับวิเคราะห์ความเครียดออกซิเดชันแบบเฉพาะที่ที่เกิดขึ้นในเซลล์และในเต้านม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยรามคำแหง และความอนุเคราะห์แพะใช้เป็นสัตว์ทดลองและสถานที่ในการทดลองจากคุณปรีชา นุสและ เขตคลองสามวา กรุงเทพมหานคร

เอกสารอ้างอิง

- Abeni, F., Calamari, L., & Stefanini, L. (2007). Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. 1. Blood indicators of heat stress. *International Journal Biometeorology*, 52(2), 87-96. doi:10.1007/s00484-007-0098-3.
- Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J. L., & Castillo, C. (2019). Redox Biology in Transition Periods of Dairy Cattle: Role in the Health of Periparturient and Neonatal Animals. *Antioxidants (Basel)*, 8(1), doi: 10.3390/antiox8010020.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., & Nardone, A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2173-2179. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)742 96-3.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Boutinaud, M., Rulquin, H., Keisler, D. H., Djiane, J., & Jammes, H. (2002). Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *Journal of Animal Science*, 80(5), 1258-1269.
- Castillo, C., Hernández, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso, M. L., & Benedito, J. L. (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 80(2), 133-139. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005. 06.003.
- Celi, P. (2010). The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 348-363.

- Chaiyabutr, N., Chanchai, W., Boonsanit, D., Sitprija, S., & Chanpongsang, S. (2011). Different Responses of Oxidative Stress Index in the Plasma of Crossbred Holstein Cattle During Cooling and Supplemental Recombinant Bovine Somatotropin. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(8), 1045-1053. doi:10.3923/javaa.2011.1045.1053.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.527.
- Gille, J.J., & Joenje, H. (1992). Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutation Research*, 275(3-6), 405-414.
- Hall, D.M., Buettner, G.R., Matthes, R.D., & Gisolfi, C.V. (1994). Hyperthermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of NO-heme in blood. *Journal of Applied Physiology*, 77(2), 548-553.
- Hu, H., Zhang, Y., Zheng, N., Cheng, J., & Wang, J. (2016). The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. *Animal Science Journal*, 87(1), 84-91. doi:10.1111/asj.12375.
- Kapusta, A., Kuczyńska, B., & Puppel, K. (2018). Relationship between the degree of antioxidant protection and the level of malondialdehyde in high-performance Polish Holstein-Friesian cows in peak of lactation. *PLoS ONE*, 13(3), e0193512. doi:10.1371/journal.pone.0193512.
- Kenyon, P.R., Maloney, S.K., & Blache, D. (2014). Review of sheep body condition score in relation to production characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 57(1), 38-64. doi:10.1080/00288233.2013.857698.
- Knight, C.H., Hillerton, J.E., Teverson, R.M., & Winter, A. (1992). Biopsy of the bovine mammary gland. *British Veterinary Journal*, 148(2), 129-132. doi:10.1016/0007-1935(92)90104-9.
- McCord, J.M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McDowell, L.R., & Arthington, J.D. (2005). *Minerals for grazing ruminants in tropical regions*. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y.,... Taniguchi, N. (2003). Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 567-574. doi:10.1074/jbc.M211515BC2003.064.
- Mohebbi-Fani, M., Ansari-Lari, M., Nazifi, S., Abbasi, F., & Shabbooei, Z. (2016). Oxidative Status and Acute Phase Response in Post-transition Early- and Mid-lactation Holstein Cows and Their Correlations with Some Performance Records. *Istanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42, doi:10.16988/iuvfd.2016.55237.
- Moolchandani, A. (2018). A Review: Oxidative Stress during Lactation in Dairy Cattle. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 5, doi:10.19080/JDVS.2018.05.555669.
- Peng, X., Lu, L., Li, Y., & Yan, P. (2011). Mammary Cell Turnover under High Temperature during the Dry Period in Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), 485-492. doi:10.5713/ajas.2011.10297.
- Putman, A.K., Brown, J.L., Gandy, J.C., Wisnieski, L., & Sordillo, L.M. (2018). Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9350-9359. doi:10.3168/jds.2018-14591.
- Sigl, T., Meyer, H., & Wiedemann, S. (2012). Gene expression of six major milk proteins in primary bovine mammary epithelial cells isolated from milk during the first twenty weeks of lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 57(10), 469-480.
- Spitz, D.R., Li, G.C., McCormick, M.L., Sun, Y., & Oberley, L.W. (1988). Stable H₂O₂-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts demonstrate increases in catalase activity. *Radiation Research*, 114(1), 114-124.

- Stralin, P., & Marklund, S.L. (1994). Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal*, 298 (Pt 2)(Pt 2), 347-352. doi:10.1042/bj2980347.
- Tao, S., Bubolz, J.W., do Amaral, B.C., Thompson, I.M., Hayen, M.J., Johnson, S.E., & Dahl, G.E. (2011). Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5976-5986. doi:10.3168/jds.2011-4329.
- Taylor-Papadimitriou, J., Shearer, M., & Tilly, R. (1977). Some properties of cells cultured from early-lactation human milk. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(6), 1563-1571.