



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรดัคส์
อินซูลิน รีซิสแตนท์ และการเกิดสภาวะกึ่งอ้วนในโคนมลายใต้
สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

โดย ผศ.ดร.ฤทธิชัย พิล้าไชย

มกราคม พ.ศ. 2561

สัญญาเลขที่ TRG5880018

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรดัคส์
อินซูลิน รีชีสแตนท์ และการเกิดสภาวะกิบอัสในโคนมลายใต้
สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

ผศ.ดร.ฤทธิชัย พิลายไชย
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและและ
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG5880018
(รหัสโครงการ)

Project Title : Study of the relationship between advanced glycation end-products, insulin resistance and the development of laminitis in dairy cows under feeding conditions in Thailand
(ชื่อโครงการ) : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรตีนส์ อินซูลิน รีซิสแตนซ์ และการเกิดสภาวะกีบอักเสบในโคนมภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

Investigator : Rittichai Pilachai Udon thani Rajabhat University
(ชื่อนักวิจัย) : ผศ.ดร.ฤทธิชัย พิลาชัย มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

E-mail Address : r.pilachai@gmail.com

Project Period : 2 years
(ระยะเวลาโครงการ): 2 ปี

Abstract

The objectives of this study were to investigate the effects of a high intake of rapidly fermentable carbohydrates on the response of plasma glucose and insulin resistance and the development of laminitis in dairy heifers. The secondary objective was to investigate the relationship between advanced glycation end-products (AGEs), insulin resistance, the development of laminitis and metabolic diseases in dairy cows under Thai feeding conditions. In the first experiment, ten Holstein-Friesian crossbred heifers were randomly fed to a ration that either contained a low (control) or a high proportion (48% DM) of cassava starch. The experimental period followed of a seven-day pre-experimental period followed by a six-day experimental period. Rumen fermentation and pH, as well as clinical signs of laminitis were evaluated. On the last day of the experimental period, insulin sensitivity was estimated using an intravenous glucose tolerance test. The mean postprandial rumen pH of heifers fed high a cassava starch ration was reduced to values below 6.0

at all times, indicating that the animals were suffering from rumen acidosis. The rumen total volatile fatty acid (VFA) and lactic acid concentrations were increased ($P < 0.01$) by feeding a high cassava starch ration. Likewise, the basal plasma glucose, insulin and AGE concentrations were higher ($P < 0.05$) for the high cassava starch ration compared to the control. The glucose clearance rate was higher ($P = 0.025$) and insulin sensitivity was decreased ($P = 0.022$) for the high cassava starch compared ration to the control. Three out of the five heifers fed a high cassava starch ration displayed clinical signs of acute laminitis. The concentration of glucose and insulin were correlated ($R^2 = 0.59$) with the clinical signs of laminitis.

In the second experiment, 30 dairy cows on five smallholder farms were enrolled using a cohort study design. During the seven day before their expected calving dates to 30 days after calving, the incidence rates of laminitis and metabolic diseases were calculated. The relationship between AGE, insulin resistance, blood metabolites, the development of laminitis and metabolic diseases in dairy cows was estimated using multiple regression analysis. The highest incidence of metabolic disease was ketosis, which was observed 14 days after calving. Cows with ketosis had a lower ($P < 0.01$) insulin resistance index than healthy cows. Blood metabolites, concentration of plasma non esterified fatty acid (NEFA) and beta hydroxy butyrate (BHBA) were significantly higher in cows with ketosis than those of controls ($P < 0.05$). Moreover, cows with ketosis had a tendency to have a higher plasma insulin ($P = 0.051$), while plasma glucose ($P = 0.051$) and triglyceride values ($P = 0.052$) tended to be lower compared with the control cows. In contrast, the concentration of plasma AGE showed no significant differences between the two groups. The results demonstrated that the values of NEFA and insulin were found to be associated with the insulin resistance index ($R^2 = 0.407$ and 0.300 , respectively). Finally, the concentration of AGE was not found to be associated with the occurrence of laminitis and metabolic diseases.

Key words: advanced glycation end-products, insulin resistance, metabolic diseases, dairy cow

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะหมักในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีน อินซูลิน รีซีสแตนท์ และการเกิดภาวะกีบอักเสบในโคนมสาว และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีน อินซูลิน รีซีสแตนท์ และการเกิดสภาวะกีบอักเสบและโรคทางเมแทบอลิซึมในโคนมสาว ภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาในโคนมสาวสายพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซียน สัตว์ทดลองถูกสุ่มให้ได้รับอาหาร กลุ่มควบคุม

และอาหารทดลองที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง (ร้อยละ 48) การทดลอง แบ่งเป็นระยะเตรียมและปรับ สัตว์ทดลอง 7 วัน และระยะทดลอง 6 วัน ทำการศึกษากระบวนการหมักย่อยอาหาร ค่าความเป็นกรดต่าง ของของเหลวในกระเพาะหมัก และแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนทั้งในกระเพาะหมักและในเลือด ในวันที่ 6 ของระยะทดลอง ทดสอบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด ผลการศึกษาพบว่า โคสาว ที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง มีความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด กรดโพร ไพโอนิก และกรดแลคติกในกระเพาะหมัก สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ค่าความเป็น กรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมักลดลงต่ำกว่า 6 ตลอดเวลา บ่งชี้การเกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะ หมักชนิดไม่เฉียบพลัน ความเข้มข้นของทั้งน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็น โปรตีนในพลาสมา สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โคทดลองที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วน ของแป้งมันสำปะหลังสูง มีอัตราการขจัดน้ำตาลกลูโคสเร็วขึ้น ระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงครึ่งหนึ่งจาก ระดับสูงสุด และระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงสู่ระดับเริ่มต้น สั้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง แสดงอาการก๊ีบอึกเสบ 3 ใน 5 ตัว ในขณะที่โคสาวกลุ่มควบคุมไม่พบอาการของภาวะก๊ีบอึกเสบ ผลการ ศึกษาชี้ให้เห็นว่าระดับน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรตีนในพลาสมา (ค่าสัมประสิทธิ์ของการทำนาย เท่ากับ 0.789) และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะหมัก มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอาการภาวะก๊ีบอึกเสบ (ค่า สัมประสิทธิ์ของการทำนาย เท่ากับ 0.646)

การทดลองที่ 2 ทำการศึกษาในโคนม จำนวน 30 ตัว ในฟาร์มโคนมขนาดกลาง จำนวน 5 ฟาร์ม วางแผนการศึกษาแบบไปข้างหน้าเชิงพรรณนา โดยเริ่มทำการศึกษาตั้งแต่ช่วงก่อนที่คาดว่าจะคลอด 7 วัน จนถึงหลังคลอด 30 วัน ศึกษาอุบัติการณ์การเกิดสภาวะก๊ีบอึกเสบและโรคทางเมแทบอลิก วิเคราะห์การ ถอดอวัยวะในการหาความสัมพันธ์ของภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ สารเมแทบอลิต์ในเลือด ต่อการเกิด ภาวะก๊ีบอึกเสบ และโรคทางเมแทบอลิก ผลการศึกษาพบว่า โคนมแสดงอาการของโรคคีโตซิส ในช่วง 14 วันหลังคลอด มากที่สุด โดยโคนมกลุ่มที่เกิดโรคคีโตซิส มีค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ต่ำกว่าอย่าง ระดับนัยสำคัญ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มที่ปกติ ความเข้มข้นของกรดไขมันไม่จำเป็น และสาร เบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรทในเลือด มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าอย่างระดับนัยสำคัญ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโค กลุ่มที่ปกติ ความเข้มข้นของอินซูลินมีแนวโน้ม ($P=0.051$) สูงกว่ากลุ่มโคปกติ แต่ความเข้มข้นของน้ำตาล กลูโคส และไตรกลีเซอไรด์มีแนวโน้มต่ำกว่า ($P=0.051$ และ $P=0.052$) โคกลุ่มปกติ ในขณะที่ความเข้มข้น ของสารแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรตีน ไม่มีความแตกต่างกัน ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของ กรดไขมันไม่จำเป็น และอินซูลินในเลือด มีความสัมพันธ์แบบพหุคูณต่อค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ โดยมี ค่าสัมประสิทธิ์ของการทำนาย เท่ากับ 0.407 และ 0.300 ตามลำดับ สุดท้ายแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีน ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดสภาวะก๊ีบอึกเสบ และโรคทางเมแทบอลิก

คำหลัก : แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีน อินซูลิน รีซิสแตนท์ โรคทางเมแทบอลิก โคนม

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบ ข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและกระบวนการเกิดโรค	4
2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก	5
2.3 สาเหตุและปัจจัยเสี่ยง	7
2.4 อาการที่เกิดจากภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก	8
2.5 ผลกระทบด้านอุตสาหกรรมและด้านเศรษฐกิจ	11
2.6 แนวทางการป้องกันภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก	11
2.7 ความผิดปกติของการเผาผลาญอาหารในโคนม	12
2.8 ฮอร์โมนอินซูลิน	14
2.9 ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance)	15
2.10 การประเมินภาวะดื้อต่ออินซูลิน	16
2.11 ความผิดปกติของการเผาผลาญอาหาร ปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ และภาวะดื้อต่ออินซูลิน	17
2.12 ภาวะดื้อต่ออินซูลินและการเกิดภาวะกีบอักเสบ (Insulin resistance and Laminitis)	21
2.13 แอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นโปรดัคส์ (Advanced Glycation End-products, AGEs)	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	28
3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็ว ในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นโปรดัคส์ อินซูลิน รีซีสแทนท์ และการเกิดสภาวะกีบอักเสบในโคนมสาว	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1.1 สัตว์ทดลอง	28
3.1.2 การวางแผนการทดลอง	28
3.1.3 วิธีดำเนินการทดลอง	28
3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ อินซูลิน รีซิสแตนท์ การเกิดสภาวะกิบอัสและโรคทางเมแทบอลิก ในโครีดนมภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย	31
3.2.1 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง	31
3.2.2 อาหารและการให้อาหาร	32
3.2.3 การเก็บตัวอย่าง	32
3.2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	33
3.2.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	33
บทที่ 4 ผลการศึกษาและวิจารณ์	34
4.1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูง ต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ อินซูลิน รีซิสแตนท์ และการเกิดสภาวะ กิบอัสในโคนมสาว	34
4.1.1 ผลการทดลองที่ 1	34
4.1.2 วิจารณ์ผลการทดลอง	42
4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ ภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ การเกิดสภาวะกิบอัสและโรคทางเมแทบอลิก ในโครีดนมภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย	46
4.2.1 ผลการทดลองที่ 1	46
4.2.2 วิจารณ์ผลการทดลอง	50
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	55
5.1 สรุปการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็ว ในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ อินซูลิน รีซิสแตนท์ และการเกิดสภาวะกิบอัสในโคนมสาว	55
5.2 สรุปและข้อเสนอแนะการทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ ดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ การเกิดสภาวะ กิบอัสและโรคทางเมแทบอลิกในโครีดนม ภายใต้สภาพการให้อาหาร ในประเทศไทย	56
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก	62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ก	63
ภาคผนวก ข	76
ประวัติผู้วิจัย	86

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ชนิดและสัดส่วนของอาหารข้นและอาหารหยาบ ค่า pH ในกระเพาะหมักของโคเนื้อ-นม	6
ตารางที่ 2.2 การแบ่ง ลักษณะของอาการโรค Rumen acidosis โดยใช้ระดับของ pH เป็นเกณฑ์	9
ตารางที่ 2.3 แสดงถึงความแตกต่างทางคลินิกของภาวะกรดในกระเพาะหมักทั้ง 2 ลักษณะ	10
ตารางที่ 2.4 ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมในโคนมที่เลี้ยงระหว่างโคกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เกิดภาวะกรดเกินในกระเพาะหมักแบบไม่แสดงอาการ	11
ตารางที่ 2.5 การตรวจหาพารามิเตอร์ในเลือด การประเมินสถานะสมดุลพลังงานการตรวจสอบสถานะความเครียดออกซิเดชัน และการตรวจสอบของกาฬทดสอบความไวของอินซูลิน	19
ตารางที่ 2.6 ความแตกต่างการตอบสนองต่ออินซูลินและการนำกลูโคสไปใช้ ระหว่างโคที่พบรังไข่บวม น้ำ และโคตัวควบคุม	20
ตารางที่ 2.7 ดัชนีวัดการตรวจสอบการตอบสนองต่ออินซูลิน (RQUICKI) ของโคนมที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน (MAN; n = 4) อาหารที่เกินความต้องการโดยไม่ต้องเสริมโครเมียม (HIGH ; n = 4) อาหารที่มีพลังงานสูงโดยได้เสริมโครเมียม (HIGH Cr; n = 4) อาหารที่มีพลังงานสูงโดยเสริมโครเมียมการผลิตนมในโคนมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิดที่ต่างกันของโค	21
ตารางที่ 2.8 ชนิดและสัดส่วนของอาหารข้นและอาหารหยาบ ค่า pH ความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ในกระเพาะหมักของโคเนื้อ-นม	25
ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบและสัดส่วนในอาหารข้น	29
ตารางที่ 4.1 วัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีอาหารทดลอง	34
ตารางที่ 4.2 ปริมาณการกินได้ ค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมัก และความเข้มข้นของ Total VFA และ Lactic acid และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ ชนิด Methylglyoxal ในกระเพาะหมักโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารทดลองที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ 48	36
ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน และ แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ ชนิด Methylglyoxal ในพลาสมาโคสาว ก่อนและหลังการได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารกลุ่มทดลอง ที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ	37
	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.4	38
เปรียบเทียบการตอบสนองค่าสรีรวิทยา การบีบตัวของกระเพาะหมัก คะแนน ลักษณะอุจจาระ และการแสดงอาการก๊ออักเสบ ในโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่ม ควบคุมและอาหารกลุ่มทดลองที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายได้เร็วใน กระเพาะหมักในสัดส่วน ร้อยละ 48	
ตารางที่ 4.5	41
เปรียบเทียบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด (Intravenous Glucose Tolerance Test) ในโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่ม ควบคุมและอาหารทดลอง ที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ 48	
ตารางที่ 4.6	41
Spearman rank-order correlation coefficients ของข้อมูล คะแนนภาวะก๊อ อักเสบ ระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และ Methyglyoxal ในพลาสมา และ ระดับความเข้มข้นของ VFA และ lactic acid ในของเหลวในกระเพาะหมักในวันที่ 5 ของโคที่ได้รับอาหาร กลุ่มควบคุม (n=5) และกลุ่มทดลอง (n=5)	
ตารางที่ 4.7	46
ค่าเฉลี่ยคะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย และค่าช่วงแห่งความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โคทดลอง จำนวน 30 ตัว	
ตารางที่ 4.8	46
ร้อยละคะแนนความสมบูรณ์ร่างกายจำแนกตามระดับคะแนน 1-5 ของโคทดลอง จำนวน 30 ตัว	
ตารางที่ 4.9	47
ลักษณะอาหาร วัตถุดิบอาหารสัตว์และคุณค่าทางโภชนา	
ตารางที่ 4.10	48
การเปรียบเทียบค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ (RQUICK) ความเข้มข้น ของสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ (CML) และสารเมแทบอลิต์ใน เลือดของโคนมที่เกิดภาวะคีโตซีส	
ตารางที่ 4.11	50
ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ stepwise ในการพยากรณ์ดัชนี ภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ (RQUICK)	

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	พยาธิวิทยาตับปกติ (ก) และตับอักเสบ (ข, ค)	23
ภาพที่ 2.2	ความสัมพันธ์ของอาหารและการเกิดภาวะตับอักเสบในโค	26
ภาพที่ 2.3	ปฏิกิริยาการเกิด Advanced Glycation End Products	27
ภาพที่ 4.1	การเปลี่ยนแปลงของ pH ของของเหลวในกระเพาะหมักของโคที่ได้รับ อาหารกลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) *, ** แสดงถึงความ แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ), Error bar หมายถึง standard error of the means	35
ภาพที่ 4.2	การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของโคที่ได้รับ อาหารกลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) หลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้า เส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค, P-value time < 0.01 , P-value treatment = 0.116, P-value Time*treatment = 0.055, Error bar หมายถึง standard error of the means	39
ภาพที่ 4.3	การตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินของโคที่ได้รับอาหาร กลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) หลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อ กิโลกรัมน้ำหนักโค, P-value time < 0.01 , P-value treatment = 0.141, P-value Time*treatment = 0.330, Error bar หมายถึง standard error of the means	39
ภาพที่ 4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมน อินซูลินของโคสาวที่เกิดภาวะตับอักเสบ (●) และโคทดลองที่ไม่เกิด ภาวะตับอักเสบ (○) $Y = 479.46X - 1681.6$, $R^2 = 0.59$, $P\text{-value} < 0.01$	42
ภาพที่ 4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ระดับความเข้มข้น ของ NEFA ($P = 0.006$, $R^2 = 0.407$) และอินซูลินในเลือด ($P = 0.023$, $R^2 = 0.300$) ของโคที่กลุ่มภาวะโรคคีโตซิส (■) และกลุ่มโคปกติ (●)	50
ภาพภาคผนวกที่ 1	สัตว์ทดลอง	64
ภาพภาคผนวกที่ 2	การเตรียมส่วนผสมอาหารหยาบ	65
ภาพภาคผนวกที่ 3	การเตรียมส่วนผสมอาหารข้น	66
ภาพภาคผนวกที่ 4	การเตรียมฟีนคอก	67
ภาพภาคผนวกที่ 5	การตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้น	68
ภาพภาคผนวกที่ 6	การเตรียมการดูดของเหลวในกระเพาะหมัก (Rumen fluid)	69
ภาพภาคผนวกที่ 7	ขั้นตอนการดูดของเหลวในกระเพาะหมัก (Rumen fluid)	70
ภาพภาคผนวกที่ 8	การปรับตั้งค่าเครื่อง pH meter และการวัดค่า pH ของของเหลว ในกระเพาะหมัก	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพภาคผนวกที่ 9	การติดตั้ง IV Catheter เส้นเลือดดำคอ (Jugular vein) 72
ภาพภาคผนวกที่ 10	การให้กลูโคสทางหลอดเลือดดำผ่าน IV Catheter 73
ภาพภาคผนวกที่ 11	การเก็บตัวอย่างเลือดและการถอด IV Catheter 74
ภาพภาคผนวกที่ 12	การปั่นแยกพลาสมาและการเก็บรักษาตัวอย่าง 75
ภาพภาคผนวกที่ 13	สภาพการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มโคนมทดลองทั้ง 5 ฟาร์ม 77
ภาพภาคผนวกที่ 14	การผสมอาหารระหว่างอาหารชั้น วัตถุประสงค์อาหารและหญ้าก่อนการให้ โคกิน โดยวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่นิยมใช้ กากถั่วเหลือง กากเปียร์ กากแป้งมันสำปะหลัง 78
ภาพภาคผนวกที่ 15	การให้อาหารโคนมทดลองทั้ง 5 ฟาร์ม โดยให้อาหารผสมระหว่าง อาหารชั้นและอาหารหยาบโดยส่วนใหญ่เสริมหญ้าเนเปียร์ และมีการ จัดหาฟางข้าวให้กินอย่างอิสระ 79
ภาพภาคผนวกที่ 16	การสังเกตอาการและการบันทึกปัญหาสุขภาพโรคและความผิดปกติ ทางเมแทบอลิซึมโคนมทดลองทั้ง 5 ฟาร์ม 80
ภาพภาคผนวกที่ 17	การประเมินคะแนนความสมบูรณ์ร่างกายโคนม 81
ภาพภาคผนวกที่ 18	การจัดการกระบวนการรีดนม 82
ภาพภาคผนวกที่ 19	การตรวจสุขภาพ รักษาโรคโคนมที่พบความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม และการเก็บตัวอย่างเลือดโคนมทดลอง 83
ภาพภาคผนวกที่ 20	ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์การตรวจ ความเข้มข้นของ วิเคราะห์ความเข้มข้นของ AGEs ด้วยชุดทดสอบ ELISA 84
ภาพภาคผนวกที่ 20	สำหรับ N ^ε -carboxymethyl lysine (CML) (OxiSelect™ HK503, Hycult® Biotechnology, Uden, the Netherland) เครื่อง Microplate Absorbance Reader (BIO- RAD® Laboratories, 85
	Inc, USA) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สภาวะกีบอักเสบ (Laminitis) เป็นปัญหาที่สำคัญในโคนมในประเทศไทย โดยปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะกีบอักเสบมีหลายปัจจัย เช่น การจัดการฟาร์ม โรงเรือน พันธุกรรม สายพันธุ์ และอาหาร (Vermunt and Greenough, 1994; Ossent and Lischer, 1998) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยด้านอาหาร ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยหลักของการเกิดสภาวะกีบอักเสบในโคนม (Greenough et al., 1990) ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่แท้จริงของผลกระทบด้านอาหารต่อการเกิดกีบอักเสบ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) เนื่องจากการได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมากเกินไป ประกอบกับการที่โคได้รับอาหารหยาดไม่เพียงพอ ส่งผลให้ความเป็นกรดต่างในกระเพาะหมักลดลง ($\text{pH} < 5.6$) มีความสัมพันธ์กับการเกิดกีบอักเสบ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดว่า เฉพาะสภาวะความเป็นกรดหรือความผิดปกติของระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะหมักด้านอื่นๆ เป็นสาเหตุกระตุ้นให้เกิดสภาวะกีบอักเสบในโคนม

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเลี้ยงโคนมในพื้นที่ต่างๆ เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นอาชีพที่สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้อย่างยั่งยืน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตของโคนมนั้นมีหลายปัจจัย เช่น ระบบจัดการฟาร์ม สายพันธุ์ และอาหาร เป็นต้น โดยเฉพาะปัจจัยด้านอาหารซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากเกษตรกรโดยเฉพาะเกษตรกรรายใหม่ส่วนมาก ขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการจัดการอาหารของโคนม ทำให้การจัดการด้านอาหารมีปัญหา โดยเฉพาะการจัดสัดส่วนระหว่างอาหารข้นกับอาหารหยาดไม่เหมาะสมกับความต้องการของตัวสัตว์ โดยปัญหาที่พบได้โดยทั่วไปคือสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของโคนมและปริมาณผลผลิตของโคนมที่จะได้ สภาวะกรดในกระเพาะหมักเกิดขึ้นโดยเมื่อได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงจะถูกแบคทีเรียกลุ่มที่ทำการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตจะได้กรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid, VFA) และกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งในปกติแล้วแลคติกจะถูกเปลี่ยนไปเป็น VFA เพื่อดูดซึมและเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นกลูโคสต่อไป แต่เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มากเกินไป VFA และกรดแลคติกก็จะสูงทำค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะหมักลดลง ทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (Nocek, 1997)

นอกจากนั้น VFA ที่เพิ่มขึ้นถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และเปลี่ยนเป็นกลูโคสที่ตับผ่านกระบวนการ gluconeogenesis ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์น้ำตาลกลูโคสมากขึ้น ทำให้ระดับกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ส่งผลกระตุ้นให้ Beta cell ของตับอ่อนหลั่งสารอินซูลินในปริมาณที่สูงเพื่อควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือดให้สมดุล โดยสารอินซูลินทำการจับกับ receptors ของเซลล์เพื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ในภาวะที่โคนมมีการสังเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในระดับที่สูงอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงแรกคลอด ทำให้เซลล์ตับอ่อนเพิ่มการหลั่งสารอินซูลินในระดับที่สูงและยาวนาน ส่งผลให้ระดับสารอินซูลินในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลต่อการทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป ประกอบกับสารอินซูลินไม่สามารถจับกับ insulin receptors บนเนื้อเยื่อได้

ทำให้ไม่สามารถต่อต้านอินซูลิน ส่งผลให้น้ำตาลในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น และทำให้มีการสร้างอินซูลินที่ตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นด้วย เมื่อปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น Beta cell ที่ตับอ่อน ถ้าปริมาณ insulin receptors ของเซลล์ลดลง ทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้กลูโคสอยู่ในกระแสเลือดมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ในระยะตับอ่อนจะทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่ง insulin ซึ่งในช่วงแรกที่สามารถชดเชยได้ จะมี insulin ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน จะทำให้การทำงานของการทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป ทำให้การหลั่ง insulin ลดลงในเวลาต่อมาและสารอินซูลินไม่สามารถนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ น้ำตาลในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดภาวะอินซูลิน รีซิสแตนซ์ (insulin resistance) หรือภาวะต่อต้านอินซูลิน (ชลทิศ อุไรฤกษ์กุล, 2010)

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสภาวะกิบอักษะในม้าม ที่ได้รับอาหารชั้นมากเกินไปมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะต่อต้านอินซูลิน และกิบอักษะ (Garner et al., 1978; Rowe et al., 1994; Pollit et al., 2003) นอกจากนั้นสภาวะต่อต้านอินซูลิน ยังส่งผลต่อการสร้างสารแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโพรดักส์ (advance glycation end-products, AGEs) โดยที่สาร AGEs เมื่อมีการสะสมของ AGEs ในเนื้อเยื่อร่างกาย เช่น หัวใจและหลอดเลือด จะส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อนั้นๆ นอกจากนั้น AGEs ยังมีผลกระทบต่อการอักเสบหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดสภาวะกิบอักษะ (Jeffcott et al., 1986; Treiber et al., 2005, 2006) De Laat et al. (2010, 2012) รายงานการเหนี่ยวนำการเกิดสภาวะกิบอักษะในม้ามโดยการให้สารอินซูลินเข้าเส้นเลือดในระยะยาว พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเกิดกิบอักษะในม้ามได้ นอกจากนั้นจากการศึกษาสภาวะกิบอักษะในโคมนของ Pilachai et al. (2012, 2014) พบว่าโคมนที่ได้รับอาหารชั้นที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูงเกิดสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและกิบอักษะ แต่ยังไม่สามารถสรุปว่าเกิดจากสาเหตุของความความเป็นกรดในกระเพาะหรือปัจจัยอื่นๆ (histamine or endotoxin) ดังนั้นในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก เนื่องจากการได้รับอาหารชั้นที่มีแป้งมากเกินไป น่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดสภาวะต่อต้านอินซูลิน และการเพิ่มระดับของ AGEs เช่นเดียวกันกับในม้าม ซึ่งทั้งสองปัจจัยน่าจะมี ความสัมพันธ์กับการเกิดสภาวะกิบอักษะในโคมน นอกจากนั้นมีรายงานการศึกษาในโคมนหลังคลอดใหม่ พบว่าโคมนที่ได้รับอาหารชั้นที่มีสัดส่วนของแป้งสูง ส่งผลให้เกิดภาวะต่อต้านอินซูลิน ในขณะเดียวกัน ก็พบความชุกของสภาวะกิบอักษะในช่วงนี้เช่นเดียวกัน (Leach et al., 1997; Webster, 2001; Tarlton et al., 2002) ดังนั้นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะต่อต้านอินซูลิน สาร AGEs และการเกิดกิบอักษะในโคมน ในสภาวะที่มีการให้อาหารชั้นที่มีสัดส่วนของแป้งสูงเพื่อให้ทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงและใช้เป็นแนวทางในการป้องกันรักษาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโพรดักส์ อินซูลิน รีซิสแตนซ์ และการเกิดสภาวะกิบอักษะในโคมนสาว

1.2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโพรดักส์ อินซูลิน รีซิสแตนซ์ และการเกิดสภาวะกิบอักษะและโรคทางเมแทบอลิกในโคมนตัวเมีย ภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 การทดลองที่ 1 คณะผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตของการวิจัยคือการศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายง่ายในกระเพาะหมักในระดับสูง การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของเหลวในกระเพาะหมัก การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (อัตราการหายใจ การหายใจ และการบีบตัวของกระเพาะหมัก อุณหภูมิร่างกาย การประเมินคะแนนอุจจาระ ระดับน้ำตาลและอินซูลินในเลือด และประเมินภาวะอินซูลิน รีซิสแตนซ์ ด้วยการทดสอบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด (Intravenous Glucose Tolerance Test, IVGTT) ของโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน จำนวน 10 ตัว วางแผนการทดลองแบบ Group T-test แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะปรับตัวทดลอง 7 วัน และระยะทดลอง 6 วัน

1.3.2 การทดลองที่ 2 คณะผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตของการวิจัย โดยวางแผนการศึกษาเชิงพรรณนา ทำการศึกษาในฟาร์มโคนมขนาดกลาง ที่มีโคนมรีดนม ระหว่าง 20-50 ตัว จำนวน 5 ฟาร์ม โดยในแต่ละฟาร์มจะทำการสุ่มโคตรายที่คาดว่าจะคลอด และช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 0-30 วันหลังการคลอด บันทึกข้อมูล อายุ สายพันธุ์ ระยะการให้นม ปริมาณน้ำนมต่อวัน ประเมินความสมบูรณ์ของร่างกาย (BCS) ทำการสังเกตอาการผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสภาวะกีบอักเสบของโคทดลอง และบันทึกปัญหาสุขภาพด้านเมแทบอลิก ได้แก่ โรคคีโตซิส ภาวะรูก้าง มดลูกอักเสบ กระเพาะไค้เคลื่อน และเต้านมอักเสบ ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน กรดไขมันไม่จำเป็นในเลือด (NEFA) สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท (BHBA) AGEs และดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนซ์ ต่อสภาวะกีบอักเสบของโคทดลอง บันทึกปัญหาสุขภาพด้านเมแทบอลิก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงผลของการเกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินในโคนม เนื่องจากการได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะหมัก เช่น มันสำปะหลังในระดับที่สูง และทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ความเข้มข้นของสาร AGEs ในเลือดและการเกิดกีบอักเสบในโคนม

1.4.2 ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของอาหารที่มีสัดส่วนแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะหมักสูงต่อ ภาวะกรดในกระเพาะหมักและการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินต่อไป

1.4.3 ทราบถึงความสัมพันธ์ของการเกิดสภาวะกีบอักเสบและโรคทางเมแทบอลิก เนื่องจากการจัดการอาหารของเกษตรกร ทำให้ใช้เป็นแนวทางศึกษาการเกิดกีบอักเสบและโรคทางเมแทบอลิกในโค

1.4.4 ผลการศึกษาที่ได้หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กรมปศุสัตว์ สัตวแพทย์ สัตวบาลหรือนักวิชาการที่เกี่ยวข้อง สามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและใช้การจัดการในฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมักและภาวะดื้อต่ออินซูลิน และกีบอักเสบในโคนมต่อไป

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักและกระบวนการเกิดโรค

กระเพาะหมัก (Rumen) หรือที่เราเรียกว่า กระเพาะผ้าชีวรี เป็นกระเพาะส่วนแรกมีขนาดใหญ่มาก มีความจุประมาณร้อยละ 80 ของความจุกระเพาะทั้งหมด เป็นกระเพาะที่ทำหน้าที่ในการหมักอาหารหรือหญ้าที่กิน ซึ่งมีพวกเส้นใย (Fiber) สูง เช่นเส้นใยจากหญ้า พางข้าว เป็นต้น กระเพาะรูเมนจะอยู่ทางด้านซ้ายของช่องท้อง อาหารหรือหญ้าที่กินเข้าไปจะอยู่ในกระเพาะนี้ก่อน ภายในกระเพาะนี้ไม่มีเอนไซม์มาช่วยย่อย แต่มีจุลินทรีย์ต่างๆหลายชนิดมาช่วยย่อยในเบื้องต้นที่เรียกว่า กระบวนการหมัก โดยย่อยสลายเส้นใยในผนังของเซลล์พืชและยังช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และจุลินทรีย์ก็จะสะสมหรือใช้อาหารที่ย่อยแล้วเก็บไว้ในเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อสร้างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์จุลินทรีย์ ต่อมาหญ้าที่กินรวมทั้งจุลินทรีย์ก็จะเคลื่อนมาที่กระเพาะส่วนต่อไป

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักคือ ภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในกระเพาะหมักมีค่าต่ำกว่าค่าปกติ โดยค่าความเป็นกรดต่างปกติภายในกระเพาะหมักของโคนั้นจะอยู่ที่ประมาณ 6.0-7.0 (Krause and Oetzel, 2005) โดยในกระเพาะหมักจะมีจุลินทรีย์อยู่ 2 ชนิด คือ จุลินทรีย์ที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยหรืออาหารหยาบและจุลินทรีย์กลุ่มที่มีหน้าที่ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักเกิดจากการที่โคได้รับอาหารชั้นที่มีคาร์โบไฮเดรต ที่ย่อยง่ายในปริมาณที่สูง เมื่อเทียบกับปริมาณอาหารหยาบ ส่งผลให้การหมักคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งผลจากการหมักย่อยของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะได้กรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid, VFA) และกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งเป็นกรดแก่ ในปกติแล้วแลคเตทจะถูกเปลี่ยนไปเป็น VFA เพื่อดูดซึมต่อไปได้ แต่เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มาก ทำให้ขาดสมดุลการดูดซึม VFA ทำให้มีการสะสมของกรดในกระเพาะหมักเพิ่มมากขึ้น โดยที่โคไม่สามารถปรับสมดุลของบัฟเฟอร์ได้ทำให้ค่า pH ลดลง (Ingrid, 2015)

ในขณะเดียวกันน้ำลายที่ถูกขับออกมาในขณะเคี้ยวเอื้องก็มีปริมาณน้อย เนื่องจากโคได้รับอาหารที่มีเยื่อใยหรืออาหารหยาบค่อนข้างน้อย ทำให้ปริมาณน้ำลายลดลง ซึ่งน้ำลายมีส่วนประกอบของสารไบคาร์บอเนตที่มีหน้าที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ทำให้ความสามารถในการลดความเป็นกรดในกระเพาะหมักลดลง ทำให้เกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis; Nocek, 1997) ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก ส่งผลให้โคเกิดการหมักย่อยอาหารเพิ่มขึ้น ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก มีผลกระทบต่อทั้งสุขภาพของกระเพาะหมักและร่างกายโค เช่น มีผลเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดของแบคทีเรีย กระบวนการหมักย่อยอาหาร ทำให้การกินได้ลดลง และส่งผลกระทบต่อผลผลิตที่ลดลงด้วย นอกจากนั้นยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดสภาวะความผิดปกติต่างๆ เช่น ถ่ายเหลว หนั่งกระเพาะหมักอักเสบ กีบอักเสบ และก้อนฝีในตับ เป็นต้น

ผลกระทบของภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักต่อการผลิตโคนม ในต่างประเทศ (Stone, 2004) โดยพบว่า ผลผลิตน้ำนมลดลง 2.7 กิโลกรัมต่อวัน ไขมันในน้ำนมลดลง ร้อยละ 0.3 โปรตีนในน้ำนมลดลง ร้อยละ 0.12

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก

2.2.1 ปริมาณการกินได้ เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในกระเพาะหมัก โดยพบว่า โคนมหรือโคเนื้อระยะขุน มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมักที่สูงเนื่องจากการกินอาหารชั้นสูงแต่มีเยื่อใยในอาหารต่ำหรือมีเยื่อใยขนาดสั้น

2.2.2 สัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายง่ายในอาหารสูง แบ่งจากธัญพืชต่างๆ รำข้าว และมันสำปะหลัง เป็นแหล่งอาหารพลังงานที่นิยมใช้เป็นอาหารโค ถ้าให้ในสัดส่วนที่สูงทำให้เกิดการหมักย่อยได้เร็ว ทำให้ผลผลิตของกรดไขมันระเหยง่ายสูงขึ้น ประกอบกับการได้รับอาหารหยาบปริมาณที่ต่ำ ทำให้ลดการหลั่งบัฟเฟอร์จากน้ำลาย ส่งผลให้ pH ในกระเพาะหมักลดลง จากข้อมูลการศึกษาทั้งในและต่างประเทศ พบว่าโคที่ได้รับอาหารชั้นมากกว่า ร้อยละ 57 มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายง่ายในอาหาร เช่น บาร์เลย์ มันสำปะหลัง และอัลฟาเฮย์อัดเม็ดมากกว่าร้อยละ 60 มีผลให้มีการสะสมของกรดไขมันโดยเมื่อสัดส่วนของแป้งมีปริมาณมากและอาหารหยาบมีปริมาณน้อยจะทำให้กระบวนการย่อยเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายสูงขึ้นและเกิดการสะสมของกรดไขมัน ทำให้เกิดภาวะกรดเกินในกระเพาะหมัก ดังตารางที่ 2.1

2.2.3 ขนาดของอาหารเยื่อใย มีผลต่อกระบวนการเคี้ยวเอื้อง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งน้ำลาย ถ้าอาหารมีขนาดเส้นใยสั้น (<2.5 เซนติเมตร) เช่น ข้าวโพดหมัก ทำให้โคไม่เกิดการเคี้ยวเอื้อง ลดปริมาณน้ำลายไหลเข้าสู่กระเพาะหมัก

2.2.4 ความสามารถในการปรับสภาพ pH ในกระเพาะหมัก โดยหลักการเพื่อบัฟเฟอร์กรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักย่อย แป้งและน้ำตาล ในกระเพาะหมัก โดยที่หลังน้ำลายที่หลั่งออกมาขณะเคี้ยวเอื้องมีบทบาทสำคัญในการเป็นบัฟเฟอร์ โดยประมาณครึ่งหนึ่งของไบคาร์บอเนตที่หลั่งออกมาได้มาจากการหลั่งน้ำลาย อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำลายที่หลั่งต้องขึ้นกับชนิดและลักษณะของอาหารในการกระตุ้นการเคี้ยวเอื้อง

2.2.5 การดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย ความสามารถในการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย มีผลต่อการปรับค่า pH กล่าวคือ การดูดซึมของกรดไขมันระเหยง่าย ผ่านผนังกระเพาะหมักจะมีการแลกเปลี่ยนสารไบคาร์บอเนตเข้ามาในกระเพาะหมักทำให้สามารถเพิ่มค่า pH ให้สูงขึ้น นอกจากนั้น พื้นที่ของส่วนที่มีลักษณะคล้ายนิ้วยื่นออกมา (papillae) ก็มีส่วนที่สำคัญในการเพิ่มการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย ถ้าการจัดการโคช่วงแห้งนมไม่เหมาะสมทำให้การพัฒนาของ papillae ไม่สมบูรณ์ จะมีผลต่อการลดพื้นที่การดูดซึมกรด นอกจากนั้นถ้าผนังกระเพาะหมักมีความผิดปกติเช่น การเกิดกระเพาะหมักอักเสบ (ruminitis) หรือการไม่บีบตัวของกระเพาะหมัก ทำให้การปรับสภาพ pH เสียไปด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 2.1 ชนิดและสัดส่วนของอาหารข้นและอาหารหยาบ ค่า pH ในกระเพาะหมักของโคเนื้อ-โคนม

อ้างอิง	ค่า pH กระเพาะหมัก		อาการ	
	องค์ประกอบอาหาร (% วัตถุแห้ง)	pH<5.6 (นาที่/วัน)เฉลี่ย		
การศึกษาในต่างประเทศ				
1	43% อาหารหยาบ, 57% อาหารข้น	187	6.2	กึ่งเฉียบพลัน
	32% อาหารหยาบ, 68% อาหารข้น	309	6.0	กึ่งเฉียบพลัน
2	50% อัลฟาฟ่าเฮย์, 50% อาหารข้น	112	6.3	ปกติ
	40% อัลฟาฟ่าเฮย์, 60% อัลฟาฟ่าเฮย์อัดเม็ด	558	5.8	กึ่งเฉียบพลัน
3	70% อาหารหยาบ, 30% อาหารข้น	56	6.3	ปกติ
	30% อาหารหยาบ, 70% อาหารข้น	299	5.9	กึ่งเฉียบพลัน
	36% อัลฟาฟ่าเฮย์, 64% อัลฟาฟ่าเฮย์อัดเม็ด	225	5.9	กึ่งเฉียบพลัน
การศึกษาในประเทศ				
4	12.5 % พางข้าว, 87.5 % อาหารข้นที่มีแป้งมันสำปะหลัง	-	5.6	กึ่งเฉียบพลัน
5	46.5 % พางข้าว, 53.5 % อาหารข้นที่มีแป้งมันสำปะหลัง	-	5.9	ปกติ
	12.5 % พางข้าว, 87.5 % อาหารข้นที่มีแป้งมันสำปะหลัง	-	5.0	เฉียบพลัน
	15 % พางข้าว, 50 % แป้งมันสำปะหลังแช่น้ำ	-	5.5	กึ่งเฉียบพลัน
6	15 % พางข้าว, 50 % แป้งมันสำปะหลังแช่กรดแลคติก	-	6.1	ปกติ

ที่มา : 1=Gozho et al. (2007), 2=Khafipour et al. (2009), 3=Li et al. (2012), 4=Pilachai et al. (2012), 5=Pilachai et al. (2014), 6=Pilachai et al. (2017)

2.2.6 การปรับตัวของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก การปรับตัวมีความสำคัญในช่วงที่ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลง (pH<5.5) และมีการผลิตกรดแลคติก โดยที่แบคทีเรียที่ใช้กรดแลคติก เช่น *Megashaera elsdonii* และ *Selenomonas ruminantium* จะถูกกระตุ้นให้เจริญอย่างรวดเร็ว และทำการเมตาบอไลต์กรดแลคติกไปเป็นกรดโพรพิโอนิก และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดต่อไป ซึ่งค่า pKa ของกรดโพรพิโอนิกมีค่าที่สูงกว่าค่า pKa ของกรดแลคติก ดังนั้นค่า pH ในกระเพาะหมักจึงเพิ่มขึ้นอย่างไรก็ตามเมื่อ pH ในกระเพาะหมักลดลงต่ำกว่า 5 โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทำให้เกิดการสะสมของกรดแลคติกในกระเพาะหมัก ในขณะเดียวกันแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก เช่น *Streptococcus bovis* และ *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่ pH ในกระเพาะหมัก <5.0 ส่งผลให้ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลงอย่างต่อเนื่องจนเข้าสู่ภาวะความเป็นกรดเฉียบพลัน

2.3 สาเหตุและปัจจัยเสี่ยง

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดกรดเกินในกระเพาะหมักเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณอาหารที่กิน ขนาดของอาหารย่อยที่กิน สัดส่วนของอาหาร การปรับสภาพของกระเพาะหมัก การดูดซึมภายในกระเพาะ และการปรับตัวของกระเพาะ เป็นต้น แต่ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักมากที่สุดคือ การบริโภคอาหารที่มีสัดส่วนของอาหารชั้นหรือมีสัดส่วนของแป้งจากธัญพืชต่าง ๆ รำข้าว หรือมันสำปะหลัง ถ้าให้ในสัดส่วนที่สูงทำให้เกิดการย่อยได้เร็ว ทำให้ผลผลิตกรดไขมันระเหยง่ายสูงขึ้น ประกอบกับโคได้รับอาหารหยาบในปริมาณที่ต่ำ หรือขนาดของอาหารหยาบมีขนาดเล็กซึ่งย่อยสลายได้เร็ว ทำให้โคมีการเคี้ยวเอื้องน้อยลงส่งผลให้การหลั่งบัฟเฟอร์จากน้ำลายลดลง ส่งผลให้ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลง

บรรจง จงรักษ์วัฒนา (2554) กล่าวว่าสาเหตุการเกิดกรดในกระเพาะหมักเกิดจากให้อาหารชั้นจำพวกแป้งน้ำตาล หรืออาหารชั้นสำเร็จรูปที่มากเกินไป หรือโดยให้อาหารหยาบที่สับย่อยละเอียดเกินไป เพราะกระเพาะของสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีสภาพเป็นถุงหมักอาหาร มีแบคทีเรียและจุลชีพหลายชนิดทำหน้าที่ย่อยอาหาร ซึ่งคาร์โบไฮเดรตจากอาหารโคเป็นแหล่งอาหารหลักของจุลชีพ แบ่งได้ 2 ประเภท 1) คาร์โบไฮเดรตที่ละลายอยู่ภายในเซลล์พืช (ได้แก่ พวกรำแป้ง และน้ำตาล) และ 2) คาร์โบไฮเดรตจากผนังเซลล์พืช (ได้แก่ pectin, cellulose, hemicellulose และ lignin) จุลชีพทั้งหลายจะย่อยคาร์โบไฮเดรตกลายเป็นกรดไขมัน เป็นแหล่งพลังงานของร่างกายโค จุลชีพต่างชนิดกันย่อยคาร์โบไฮเดรตแต่ละประเภท และจุลชีพจะอยู่ได้ในเฉพาะช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเฉพาะตนเท่านั้น เช่น แบคทีเรีย ที่ย่อยแป้งและน้ำตาลจะอยู่ได้ดีในช่วงเป็นกรด (pH 5.5–6.0) ในขณะที่แบคทีเรียที่ย่อยเยื่อใย (fiber) จะอยู่ได้ดีในช่วงค่อนข้างเป็นกลาง (pH 6.0–6.8) ชนิดของอาหารมีผลต่อความเป็นกรดต่างภายในกระเพาะ คาร์โบไฮเดรตในอาหารหยาบจะย่อยได้ช้ากว่าคาร์โบไฮเดรตในอาหารชั้นจำพวกเมล็ดธัญพืช (ข้าวเปลือก, ข้าวโพด ฯลฯ) ตลอดจนพืชที่ให้แป้งโดยตรง (หัวมัน, สาकु ฯลฯ) ดังนั้นสภาพเป็นกรดจากการกินอาหารหยาบจึงเกิดได้ยาก แตกต่างจากแป้งในอาหารชั้นซึ่งจะหมักและทำให้เกิดกรดได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งในอาหารชั้นมีเยื่อไยน้อยโคจึงไม่หลั่งน้ำลายปริมาณมากจึงทำให้สภาพเป็นกรด (pH ลดลง) จะทำให้แบคทีเรียที่ย่อยอาหารหยาบทนอยู่ไม่ได้ เปิดทางสะดวกให้แก่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก เพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าและเพิ่มกรดมากขึ้นไปอีกอีกทั้งอาหารหยาบจะกระตุ้นการหลั่งของน้ำลายซึ่งมีสารไบคาร์บอเนตอยู่ ทำให้สามารถปรับลดความเป็นกรดของกระเพาะ การที่เยื่อไยสั้นก็ใช้เวลาเคี้ยวเอื้องน้อยลง ทำให้น้ำลายหลั่งออกน้อยลงด้วย อาหารหยาบสับย่อยที่มีขนาดสั้นกว่า 2-3 นิ้ว จะทำให้เกิดกรดได้ดี เนื่องจากอาหารหยาบที่สั้นเกินไปจะผ่านกระเพาะหมักอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเกิดสภาพคล้ายคลึงกันคือแบคทีเรียย่อยเยื่อไยลดจำนวนลงและแบคทีเรียย่อยแป้งเพิ่มจำนวน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก)

ชัยเดช อินทร์ชัยศรี และคณะ (2548) ได้ทำการศึกษามลของอาหารและการให้อาหารต่อปัญหาเมแทบอลิซึม พบว่าการเพิ่มจำนวนมื้อการให้อาหารชั้นมีโอกาสดำเนินการต่างของของเหลวในกระเพาะหมักต่ำกว่าการให้อาหารชั้นน้อยมื้อ เนื่องจากการให้อาหารหลายมื้อมีโอกาสดำเนินการได้รับปริมาณอาหารชั้นมากขึ้น และยังมีผลมากขึ้นเมื่อให้อาหารชั้นแยกจากการให้อาหารหยาบ

นอกจากนี้พบว่าชนิดอาหารหยาบมีผลต่อ ค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมัก โดยโคที่กินเปลือกแฉ่ำข้าวโพด ยอดต้นข้าวโพดมี ค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมักต่ำกว่า โคที่กิน ต้นข้าวโพด หญ้าเนเปียร์และฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก ทั้งนี้เนื่องจาก เปลือกแฉ่ำข้าวโพด ยอดต้นข้าวโพด มีเยื่อใยต่ำ (55% และ 58% NDF ตามลำดับ) และมีพลังงานสูงจากคาร์โบไฮเดรต (62% และ 63% TDN ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารหยาบชนิดอื่นในการศึกษานี้การได้รับอาหารที่มีเยื่อใยต่ำหรือมีคาร์โบไฮเดรตสูงจะมีผลลดค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมัก

2.4 อาการที่เกิดจากภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก

อาการของภาวะกรดในกระเพาะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอาการ คือภาวะกรดในกระเพาะหมักชนิดเฉียบพลัน (acute rumen acidosis) และภาวะกรดในกระเพาะหมักชนิดกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute rumen acidosis, SARA) โดยที่ทั้งสองกลุ่มอาการมีสาเหตุและการเกิดโรคที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่ลักษณะของอาการที่แสดงออก โดยกระบวนการเกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก เกิดจากการกินอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายง่ายในกระหมัก กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในกระเพาะหมัก ส่งผลให้มีการผลิตกรดไขมันระเหยง่ายเพิ่มขึ้น และเกิดการสะสมในกระเพาะหมัก ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงอย่างรวดเร็ว ในภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างลดลง <5.0 จะมีการสังเคราะห์กรดแลคติกทั้งชนิด D-lactic และ L-lactic acid และสะสมในกระเพาะมากขึ้น ยิ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อกรดแลคติกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis)

โคที่ไม่สามารถปรับตัวได้เมื่อได้รับอาหารชั้นมากๆ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมักแบบเฉียบพลัน เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถปรับตัวได้ ยกตัวอย่างเช่น เมื่อมีการสังเคราะห์กรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง ซึ่งทำให้แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้กรดแลคติกตาย หรือไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการสะสมของกรดแลคติกในกระเพาะหมักเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกมีค่า pK_a ที่สูงทำให้สามารถปลดปล่อยโปรตอน (H^+) จำนวนมากส่งผลให้ค่า pH ยิ่งลดลง นอกจากนั้นภาวะที่โคไม่สามารถปรับตัวเมื่อกินอาหารชั้นมากๆ มีผลต่อการลดการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย เนื่องจากพื้นผิวของ papillae ไม่สามารถพัฒนาในการเพิ่มจำนวนได้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมลดลง

โคที่เกิดภาวะกรดในกระเพาะหมักแบบเฉียบพลัน จะพบค่า pH ลดลงต่ำกว่า 5.2 อาการที่พบ ได้แก่ ภาวะเลือดเป็นกรด (metabolic acidosis) ถ่ายเหลว ภาวะก๊ออักเสบ และอาการเจ็บขา โคเดินกระเผลก ผื่นกระเพาะหมักอักเสบ ในรายที่รุนแรงอาจทำให้ตายได้ แบบไม่รุนแรง เป็นภาวะที่ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลงอยู่ระหว่าง 6.0-5.5 เนื่องจากการสะสมของกรดไขมันระเหยง่าย ในกระเพาะหมักโคที่ได้รับอาหารชั้นสูง และขาดความสมดุลของบัฟเฟอร์ ในภาวะ SARA นี้จะเกิดจากการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายเท่านั้น โดยไม่มีการสะสมของกรดแลคติก โดยทั่วไปค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกควร <5 mM

โดยสรุปสามารถสังเกตอาการและการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของโคที่เกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก โดยแบ่งเป็นอาการชนิดเฉียบพลันและแบบไม่รุนแรง ดังตารางที่ 2.2 โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในกระเพาะหมัก เช่นแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยแป้งเพิ่มมากขึ้น มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำพวก *Escherichia coli* และปลดปล่อยสารพิษ เช่น เอนโดทอกซิน (endotoxin) จำนวนมาก แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก เช่น *Streptococcus bovis* และ *Lactobacillus* spp. เพิ่มมากขึ้น แต่แบคทีเรียกลุ่มที่สลายกรดแลคติกลดลง (*M. elsdenii*) ทำให้เกิดการสะสมของกรดแลคติก และส่งผลให้ pH ยิ่งลดลงมากขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดแก่ เมื่อ pH ในกระเพาะหมักลดลงต่ำกว่าภาวะปกติมากๆ ทำให้การทำงานของแบคทีเรียลดลงส่งผลให้กระบวนการหมักย่อยอาหารลดลงด้วย และส่งผลต่อร่างกายและผลผลิต

ตารางที่ 2.2 การแบ่ง ลักษณะของอาการโรค Rumen acidosis โดยใช้ระดับของ pH เป็นเกณฑ์

แหล่งข้อมูล	อาการของ Rumen acidosis	ค่า pH ของกระเพาะหมัก
Matthias and Eremark (2002)	Acute	< 5.0
	Subacute	5.0 – 5.5
Nocek (1997)	Acute	< 5.0
	Subacute	5.0 – 5.5
Stone (2004)	Acute	<5.0
	Subacute	5.0 – 5.8
Krause and Oetzel (2005)	Acute	<5.0
	Subacute	5.0 – 5.8

Matthias and Eremark (2002) ได้ทำการศึกษาพบว่าการที่โคมีความผิดปกติของค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะลดลงทำให้ปริมาณการย่อยอาหารของโคลดลงและอาจจะมีลักษณะเหลวและยังมีผลต่อแรงดันของเหลวในกระเพาะหมักเหนียวนำไปเกิดแผลที่กระเพาะหมัก เชื้อแบคทีเรียเข้าไปสู่กระแสเลือด แบคทีเรียเหล่านี้อาจก่อให้เกิดฝีในตับ และอาจลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปอด ทำให้เกิดอาการเลือดออกในปอด ไส้เป็นเลือดและอาจเสียชีวิตแบบเฉียบพลันได้

ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักเกิดจากการที่โคได้รับอาหารชั้นที่มีคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยง่ายในปริมาณที่สูง เมื่อเทียบกับปริมาณอาหารหยาบ ส่งผลให้การหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การเกิดกรดในกระเพาะหมักแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การอักเสบแบบรุนแรง (acute rumen acidosis) และ การอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute rumen acidosis) หรือการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic rumen acidosis) โดยสามารถแบ่งตามค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดไขมัน ปริมาณแบคทีเรีย และค่าต่างๆในเลือด ดังตารางที่ 2.3

Nordlund et al. (1995) ได้ทำการศึกษาผลกระทบทางพยาธิสภาพของกระเพาะหมัก (rumen) ส่งผลต่อการดูดซึมสารอาหารในระยะยาวและการเกิดแผลที่เยื่อบุกระเพาะอาจเป็นที่ผ่านของ *Fusobacterium necrophorum* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ แพร่กระจายเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดไปยังตับทำให้เกิดฝี และถ้าเชื้อไปที่ปอดจะทำให้เส้นเลือดในปอดมีการแตกทำให้เกิดเลือดกำเดา

(epistaxis) หรือการไอเป็นเลือด (hemoptysis) โดยทั่วไปถ้ามีอาการเหล่านี้มักเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต Tajik and Nazifi (2011) ได้กล่าวว่าการเกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบไม่แสดงอาการ (sub-acute) โดยทั่วไปจะไม่แสดงอาการเจ็บป่วย แต่จะแสดงอาการทางคลินิกบางอย่างที่บ่งบอกภาวะกรดเกินในกระเพาะหมัก ได้แก่ กินฟางหรืออาหารหยาบลดลง กีบอึกเสบ ปริมาณไขมันในน้ำนมลดลง การเปลี่ยนแปลงลักษณะของอุจจาระ โคมิร่างกายผอมลง

ตารางที่ 2.3 แสดงถึงความแตกต่างทางคลินิกของภาวะกรดในกระเพาะหมักทั้ง 2 ลักษณะ

	Ruminal acidosis	
	Acute	Sub-acute
การเปลี่ยนแปลงภายในกระเพาะหมัก		
(1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ต่ำกว่า 5	5.0 – 5.4
(2) กรดแลคติก	เพิ่มขึ้น (50-120 mM)	ปกติ (0-5 nM)
(3) Volatile fatty acids (VFA)	ลดลง (<100mM)	เพิ่มขึ้น (150-225 mM)
(4) แบคทีเรียแกรมลบ	ลดลง	ปกติ
(5) แบคทีเรียแกรมบวก	เพิ่มขึ้น	ปกติ
(6) <i>Streptococcus bovis</i>	เพิ่มขึ้น	ปกติ
(7) <i>Lactobacillus</i> spp.	เพิ่มขึ้น	ปกติ
(8) Lactic acid producers	เพิ่มขึ้น	เพิ่มขึ้น
(9) Lactic acid consumers	ลดลง	เพิ่มขึ้น
(10) Blood pH	ต่ำ	ปกติ
(11) Bicarbonate	ต่ำ	ปกติ
(12) Lactate	สูง	ปกติ

ที่มา : Hernandez et al. (2014)

นอกจากนั้น Pilachai et al. (2012, 2014) พบว่าโคที่กินอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลัง สูงในสูตรอาหาร ส่งผลให้เกิดภาวะกรดในกระเพาะ และมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะกีบอึกเสบได้ โดยเมื่อรับปริมาณอาหารที่มีแป้งที่ย่อยง่ายในปริมาณที่สูง จะเกิดการหมักได้กรดไขมันเพิ่มขึ้น การดูดซึมไปยังตับเพื่อเปลี่ยนเป็นกลูโคสก็มากตามไปด้วย ทำให้ระดับกลูโคสในกระแสเลือดสูง ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการอึกเสบบริเวณส่วนต่างๆ เช่น รอบเขา หรือกีบเท้า โดยพบว่า เฉพาะในวันที่ 3 ของระยะ เวลาการทดลอง สังเกตพบโค พบว่า 3 จาก 4 ตัว มีอาการกีบอึกเสบ และบริเวณรอบๆ กีบเท้ามีอาการบวมแดงและเกิดการอึกเสบ

สุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย (2558) ได้กล่าวว่าปัญหาจากอาหารโคที่ไม่สมดุล คุณภาพโดยเฉพาะอาหารหยาบไม่ดีพอและไม่เพียงพอ ตลอดจนการให้อาหารข้นจำนวนมาก ทำให้มีปัญหากรดใน

กระเพาะสูง และมีปัญหาโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการอยู่มาก มีผลให้ไขมันและโปรตีนต่ำลง และมีไขมันที่ทำให้นมเหม็นหืนง่ายมากขึ้น ทำให้อายุการเก็บรักษาน้ำนมสั้นกว่าที่ควร

2.5 ผลกระทบด้านอุตสาหกรรมและด้านเศรษฐกิจ

ปีตุนาถ หนูแสน (2547) กล่าวว่าเมื่อเกิดโรค rumen acidosis นั้นจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนม ซึ่งจะทำให้ผลตอบแทนที่ได้จากการขายน้ำนมลดลง เนื่องจากราคาน้ำนมจะถูกกำหนดโดยปริมาณไขมันในน้ำนมโดยจะมีผลทำให้ปริมาณไขมันและโปรตีนในน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการผลิต acetate ลดลงซึ่ง acetate เป็นส่วนสำคัญในการผลิตไขมันในการสร้างไขมันในน้ำนมและการเกิด rumen acidosis นั้น มีผลทำให้ pH ในกระเพาะหมักลดลงมีผลทำให้ microorganism ลดลง ซึ่ง microorganism เหล่านี้เป็นแหล่งของโปรตีนหลักสำหรับสัตว์ซึ่งในสัตว์จำพวก ruminant จะอาศัย microbial protein เหล่านี้เป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญในร่างกาย จากข้อมูลจะเห็นได้ว่ากลุ่มของโคปกติและโคที่เป็นโรค rumen acidosis จะมีส่วนประกอบของน้ำนมทั้งปริมาณของโปรตีนและไขมันในน้ำนมแตกต่างกัน ซึ่งพบว่าโคนมเกิดโรค rumen acidosis จะทำให้ปริมาณของโปรตีนและไขมันในน้ำนมลดต่ำลงมากเมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมในโคนมที่เลี้ยงระหว่างโคกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เกิดภาวะกรดเกินในกระเพาะหมักแบบไม่แสดงอาการ

องค์ประกอบ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เกิดภาวะกรดเกินในกระเพาะหมัก	SEM	P-value
ปริมาณน้ำนม, กก/วัน	31.6	28.3	1.7	0.07
ไขมัน, %	3.30	2.93	0.09	0.003
ผลผลิตไขมัน, กก/วัน	0.97	0.85	0.05	0.03
โปรตีน, %	3.29	3.42	0.07	0.08
ผลผลิตโปรตีน, กก/วัน	0.98	1.00	0.03	0.56

ที่มา : Khafipour et al. (2009)

2.6 แนวทางการป้องกันภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก

การเกิดกรดในกระเพาะหมักส่งผลกระทบต่อผลผลิตของโคนมเป็นอย่างมากโคนกินและย่อยอาหารได้น้อยลง ผลผลิตน้ำนมและปริมาณไขมันในน้ำนมลดลงและยังโน้มนำให้เกิดสภาวะกับอักเสบ (Nocek, 1997) อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อกระเพาะหมักเหนียวนำไปเกิดกระเพาะอักเสบ และเกิดการกีดกร่อนของเยื่อผนังกระเพาะรูเมน ทำให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปสู่กระแสเลือด แบคทีเรียเหล่านี้อาจก่อให้เกิดฝีในตับ และอาจลุกลามไปยังเนื้อเยื่อปอด ทำให้เกิดอาการเลือดออกในปอด ไส้เป็นเลือดและอาจเสียชีวิตแบบเฉียบพลันได้ (Ingrid, 2015) จากผลกระทบดังกล่าว ทำให้มีความพยายามศึกษาเพื่อหาแนวทางควบคุมและป้องกันการเกิดสภาวะในกระเพาะหมัก เช่น การเพิ่มสัดส่วนของเยื่อใยในสูตร

อาหาร เสริมสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างเพื่อปรับสภาพความเป็นกรดในกระเพาะหมัก (Plaizer et al., 2008)

สิทธิศักดิ์ คำผา (2548) ได้ทำการศึกษาระดับการเสริมโซเดียมดีแอลมาเลท (sodium dl-malate) ในอาหารชั้นที่มีมันเส้นเป็นองค์ประกอบระดับสูงต่อประสิทธิภาพกระบวนการหมักของกระเพาะรูเมน โดยการเสริมโซเดียมดีแอลมาเลท 4 ระดับ ได้แก่ 0, 9, 18 และ 27 กรัม/ตัว/วัน ตามลำดับ ร่วมกับอาหารหยาบฟางหมักยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำให้กินอย่างเต็มที่ พบว่าการเสริมโซเดียมดีแอลมาเลท ที่ระดับ 18 กรัม/ตัว/วัน ในอาหารชั้นที่มีมันสำปะหลัง (มันเส้น) เป็นองค์ประกอบในระดับสูงร่วมกับการได้รับฟางหมักยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอาหารหยาบสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการหมักของกระเพาะรูเมนและเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีนในกระเพาะหมักเพิ่มขึ้น ช่วยทำให้ความเป็นกรด-ด่างของเหลวในกระเพาะหมัก

ฤทธิ์ชัย พิลาย และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษามันสำปะหลังแช่ด้วยกรดแลคติกต่ออัตราการย่อยสลายของวัตถุแห้งและเปียกภายในกระเพาะหมัก โดยใช้โคเนื้อเพศผู้เจาะกระเพาะหมักและติดตั้งท่อขนาดเล็กจำนวน 3 ตัว โคแต่ละตัวจะได้รับการจุ่มลงในล่อนที่มีมันสำปะหลังบดแช่กรดแลคติก ความเข้มข้น ร้อยละ 0, 0.5 และ 1 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ในกระเพาะหมัก ผลการศึกษาพบว่ามันสำปะหลังบดกรดแลคติกความเข้มข้น ร้อยละ 1 มีผลทำให้ประสิทธิภาพ การย่อยสลายของแข็งที่อัตราการไหลผ่านลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาของแป้งมันสำปะหลังคงอยู่ในกระเพาะหมักนานขึ้น ทำให้กรดแลคติกเข้มข้น ร้อยละ 1 มีผลในการป้องกันการย่อยสลายแป้งในกระเพาะหมักได้ เนื่องจาก กรดแลคติกมีผลต่อการย่อยสลายแห้งและเปียกในกระเพาะหมัก เพิ่มการไหลผ่านของแป้งไปยังลำไส้เล็ก ทำให้ความเข้มข้นของ VFA ในกระเพาะหมักลดลงและค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะหมักเพิ่มขึ้น

2.7 ความผิดปกติของการเผาผลาญอาหารในโคนม

ความผิดปกติเกี่ยวกับอาหารและการเผาผลาญอาหารในโคนม หรือเรียกว่า Metabolic disorders หรือ Metabolic diseases เป็นภาวะความผิดปกติของสารเมแทบอลิซึมที่ได้จากกระบวนการเผาผลาญอาหาร เช่น การสะสมของกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) ในกระเพาะหมักจำนวนมากทำให้ค่า pH ลดลง ส่งผลให้เกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก (rumen acidosis) ความเข้มข้นของสารคีโตนบอดี (ketone bodies) ในเลือดสูงเรียกว่า โรคคีโตซิส (ketosis) ความเข้มข้นของแคลเซียม (calcium) ในเลือดต่ำ ส่งผลให้เกิดโรคน้ำนม (milk fever) หรือปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันไม่จำเริญ (non-esterified fatty acids, NEFA) สูงส่งผลให้เกิดภาวะไขมันคั่งสะสมในตับ (fatty liver) เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดโรคความผิดปกติอื่นๆ เช่น กีบอักเสบ (laminitis) และกระเพาะแท้เคลื่อน (abomasum displacement) เป็นต้น โดยภาวะความผิดปกติดังกล่าวมักเกิดขึ้นในช่วงการคลอด ซึ่งเริ่มตั้งแต่ 3 เดือนก่อน จนถึง 3 เดือน หลังคลอดลูก โดยส่วนใหญ่พบมากในช่วง 1 เดือนแรกหลังการคลอด เนื่องจากในช่วงนี้แม่โคพบภาวะขาดสมดุลของสารอาหารที่ต้องการกับสารอาหารที่ได้รับ ทำให้ร่างกายโคต้องชดเชยโดยการดึงเอาสารอาหารที่สะสมในร่างกายมาใช้เพื่อให้เพียงพอในการผลิตน้ำนม

แม้โคนมหลังคลอดมีความต้องการพลังงานอย่างมากในการสร้างน้ำนม ซึ่งพลังงานที่ต้องการนี้ไม่สามารถได้รับอย่างเพียงพอจากการกินอาหาร เนื่องจากแม่โคมีปริมาณการกินอาหารที่ลดลง โดยพบว่าในช่วงหลังคลอด ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดลดลง ส่งผลให้ปริมาณการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนลดลง ทำให้การนำเอากลูโคสไปใช้ได้ลดลงด้วย ร่างกายต้องมีการสลายไขมันที่สะสมในร่างกายเพื่อชดเชยการขาดหายไปของน้ำตาลกลูโคส เพื่อให้เต้านมยังสามารถสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสได้เพียงพอในช่วงที่มีการผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้น จากผลการสลายตัวของไขมันจำนวนมากทำให้มีการปลดปล่อย NEFA ออกมาในกระแสเลือดสูงเช่นกัน NEFA มีความสำคัญเมื่อถูกการเผาผลาญให้ได้พลังงาน และมีการเมแทบอลิซึมให้ได้กลูโคสที่ตับ ตับมีความสามารถในการออกซิเดชัน NEFA อย่างสมบูรณ์ ได้ ร้อยละ 15-20 ของปริมาณในเลือด ส่วนที่เหลือเกิดการออกซิเดชันไม่สมบูรณ์ได้สาร คีโตนบอดี และถูกเปลี่ยนไปเป็นไตรกลีเซอไรด์และสะสมในตับ และ VLLP เพื่อนำกลับไปสะสมเป็นเนื้อเยื่อไขมันในร่างกาย สารคีโตนบอดีจะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับเนื้อเยื่อ เช่น สมอง และกล้ามเนื้อหัวใจ ดังนั้น NEFA และ สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท (BHBA) จึงเป็นส่วนหนึ่งของการปรับตัวของโคในภาวะขาดสมดุลพลังงานในระยะหลังคลอดใหม่ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการปลดปล่อย NEFA และสังเคราะห์ BHBA จำนวนมาก ส่งผลให้เกิดภาวะขาดสมดุลของพลังงาน (negative energy balance หรือ NEB) โดยในภาวะนี้แม่โคจะใช้พลังงานจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ที่สะสมในร่างกายออกมาใช้

คีโตซิส (ketosis) โรคนี้มักเกิดกับโคที่ให้น้ำนมสูงในระยะต้นของการให้นม (early lactation) คือในระยะ 6 สัปดาห์หลังคลอด เพราะร่างกายใช้กลูโคสในการสร้างน้ำนมมาก แต่สัตว์ได้รับอาหารไม่เพียงพอ แม้ว่าจะกินอาหารเต็มที่ก็ตามโคจะมีน้ำหนักลดลงและมีสมดุลพลังงานเป็นลบ เมื่อร่างกายได้รับคาร์โบไฮเดรตไม่เพียงพอจึงมีการดึงไขมันมาใช้โดยเกิดการสลายตัวของไขมันที่ตับด้วยอัตราเร็วสูงเพื่อให้ได้พลังงาน ในกระบวนการนี้จะทำให้เกิดอะซิโตะอะซิเตท (acetoacetate) ซึ่งเป็นสารคีโตนชนิดหนึ่งจะถูกขับออกจากตับเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปเผาผลาญต่อไปในไตและกล้ามเนื้อ ถ้าไตและกล้ามเนื้อใช้สารคีโตน (ketone bodies) ไม่ทัน จะทำให้สารคีโตนเหลืออยู่ในเลือดในระดับสูงกว่าปกติ เรียกว่า Ketonemia ซึ่งจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ทำให้ปัสสาวะมีสารคีโตนอยู่สูง (ketonuria) และลมหายใจจะมีกลิ่นอะซิโตน (acetone) โรคนี้เรียกว่า คีโตซิส (ketosis) (พิพัฒน์ เหลืองลาวัญญ์ และ วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ, 2557)

ในขณะที่มีการบริโภคสารอาหารที่ไม่เพียงพอหรือมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อประสิทธิภาพการทำงานของร่างกายและสุขภาพของโค ตัวอย่างเช่นโคนมมักจะมีการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรืออินซูลิน รีซิสแตนซ์ (insulin resistance) เพิ่มขึ้นในระยะหลังคลอดซึ่งส่วนใหญ่เนื่องจากการบริโภคพลังงานที่ไม่เพียงพอ ความดื้อต่ออินซูลินทำให้การเผาผลาญในเซลล์ของตับผิดปกติ เกิดการย่อยไตรกลีเซอไรด์และปล่อยกรดไขมันอิสระนี้เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้เกิดภาวะการอักเสบนี้ ทำให้เกิดตะกรันเกาะบนผนังหลอดเลือดและผนังหลอดเลือดจะค่อยๆ ตีบแคบลง โคนมในช่วงก่อนคลอดไปจนถึงช่วงเริ่มต้นของการให้ผลผลิตน้ำนม จะประสบปัญหาเกี่ยวกับการได้รับพลังงานจากอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย แม้ว่าจะมีการให้อาหารอย่างเต็มที่ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงก่อนคลอดนั้น ลูกอาจมีการดึงกลูโคสจากร่างกายของแม่โคมากไป หรือในช่วงหลังคลอดก็จะมี การนำกลูโคสไปใช้ในการสร้างน้ำนม ในขณะเดียวกันนั้นโคก็มี

การกินได้ที่ลดลง จึงมีผลทำให้โคมนมีน้ำหนักตัวลดลงและมีขาดสมดุลพลังงาน (พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์ และ วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ, 2557 อ้างจาก บุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2541) แม้โคมนเสียสมดุลพลังงานเป็นลบจะทำให้เกิดการสลายตัวของไขมันในอัตราที่สูงเพื่อให้ได้พลังงานที่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เมื่อมีการสลายตัวของไขมันจะทำให้เกิดสารคีโตน ซึ่งมีสภาพเป็นกรดอย่างแรงมีผลทำให้สมดุลกรด-ด่าง (acid-base balance) ในร่างกายเสียไปเกิดสภาวะ acidosis ในสัตว์ (พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์ และ วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ, 2557)

ผลต่อเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลในกระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น เช่นภายหลังการรับประทานอาหาร เบตาเซลล์จะหลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้น ฮอร์โมนอินซูลิน จะกระตุ้นให้เพิ่มการขนถ่ายกลูโคส จากกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ ส่งเสริมการแพร่ของน้ำตาลกลูโคสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อของไขมัน และตับ ระดับของอินซูลินที่เปลี่ยนแปลงตามระดับของกลูโคสภายหลัง รับประทานอาหาร ถ้ามีกลูโคสเข้าสู่เซลล์เป็นจำนวนมาก กลูโคสจะเก็บไว้ในรูป ไกลโคเจนที่ตับและ ในกล้ามเนื้อซึ่ง ร่างกายสามารถนำมาใช้ได้เมื่อต้อง (สายลม เกิดประเสริฐ, ม.ป.ป.)

2.8 ฮอร์โมนอินซูลิน

อินซูลินเป็นฮอร์โมนประเภทเปปไทด์ สร้างมาจากเบตาเซลล์ของไอเลตส์ออฟแลงเกอร์ฮานส์ (islets of Langerhans) ของตับอ่อน ยีนของอินซูลินในคนจะอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 11 โมเลกุลแรกที่สังเคราะห์มาจะมีขนาดใหญ่เรียกว่าโปรอินซูลิน (proinsulin) ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 51 หน่วย แบ่งเป็นสาย เอ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 21 หน่วย สายบีประกอบด้วยกรดอะมิโน 30 หน่วย ทั้ง 2 สายเชื่อมด้วยเปปไทด์เชื่อม (connecting peptide หรือ C peptide) หลังจากนั้นจะมีการตัดโมเลกุลบางส่วนของส่วนนำออก เหลือเป็นอินซูลิน (insulin) และมันตัวเชื่อมด้วย พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 3 ที่ ซึ่งเป็นรูปที่ยังไม่ทำงาน เมื่อร่างกายต้องการใช้จะถูกย่อยด้วย เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เพื่อตัดเอาเปปไทด์เชื่อม (connecting peptide) ออกได้เป็นอินซูลิน อินซูลินมีผลต่อเซลล์เกือบทุกชนิดในร่างกาย โดยมีอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญคือ ตับ กล้ามเนื้อลาย และเซลล์ไขมัน อินซูลินได้ชื่อว่าเป็นฮอร์โมนแห่งความอุดมสมบูรณ์ (hormone of abundance) เป็นฮอร์โมนที่ส่งเสริมให้มีการสะสมกลูโคส กรดไขมันและกรดอะมิโนไว้ในเซลล์ต่างๆ และสำรองไว้ใช้ระหว่างช่วงมื้ออาหารและเมื่อร่างกายขาดแคลน ทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดมีค่าปกติ (สายลม เกิดประเสริฐ, ม.ป.ป.)

อินซูลินทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ตับอ่อนนอกจากผลิตฮอร์โมนอินซูลิน แล้ว ตับอ่อนยังผลิตน้ำย่อยและฮอร์โมนชนิดอื่นอีกด้วย อาหารประเภทแป้งและน้ำตาลเมื่อถูกดูดซึมจากลำไส้ เข้าสู่กระแสเลือดจะกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งอินซูลิน เซลล์ทั่วร่างกายจะมีโปรตีนตัวรับอินซูลินที่เยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า insulin receptor ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดขบวนการดึงกลูโคสจากเลือดเข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อ อินซูลินในเลือดจับกับโปรตีนตัวรับของอินซูลินที่ผิวเซลล์เท่านั้น กลูโคสเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ก็จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเพื่อสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ หรือเก็บไว้ในรูปของไกลโคเจนที่สะสมในตับและกล้ามเนื้อ และอินซูลิน มีบทบาทที่สำคัญ

ในการเผาผลาญกลูโคสของโคนม การเผาผลาญกลูโคสของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่เห็นได้ชัดคือความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระดับต่ำมีผลในการตอบสนองต่ออินซูลินที่ต่ำของเนื้อเยื่อมีผลกระทบต่ออินซูลินในการเผาผลาญกลูโคสจะถูกควบคุมโดยการหลั่งอินซูลิน โดยตับอ่อนจะมีความไวต่ออินซูลินของกล้ามเนื้อ กระดูก เนื้อเยื่อไขมัน และตับ (Koster and Opsomer, 2013)

ความผิดปกติของการหลั่งอินซูลิน เมื่อมีฮอร์โมนนี้มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ซึ่งจะมีผลต่อเซลล์ของสมอง อย่างรวดเร็ว ทำให้มีอาการสับสน มึนงง อ่อนเพลีย นอกจากนี้ยังไปกระตุ้นการทำงานของประสาทซิมพาเทติก ทำให้มีอาการหิว ใจสั่น เหงื่อออกมาก และเพิ่มการหลั่งแคทีโคลามีนจากต่อมหมวกไต ให้ตับมีการสลายไกลโคเจน เป็นกลูโคสมากขึ้น ถ้าไม่ได้รับการแก้ไขโดยการให้กลูโคสทดแทนอาการจะรุนแรงคือชัก หหมดสติ และเสียชีวิตได้ และเมื่อมีอาการขาดฮอร์โมนอินซูลินก็จะทำให้กลูโคสเข้าเซลล์เนื้อเยื่อไม่ได้ ทำให้ร่างกายเหมือนขาดอาหาร ตับจึงต้องสลายไกลโคเจนมาอย่างหมดเลือดทำให้ระดับน้ำตาลยิ่งสูงมากขึ้น (hyperglycemia) (สายลม เกิดประเสริฐ, ม.ป.ป.) การเก็บไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ ตับ และการสะสมน้ำตาลกลูโคสไว้ในร่างกายของโคนม ในเวลาที่ต้องการใช้งาน เมื่อกลูโคสในร่างกายต่ำหรือมีความต้องการน้ำตาลกลูโคสสูง ในช่วงสิ้นสุดของการตั้งครรภ์และช่วงการให้นม การสะสมไกลโคเจนในไว้ในตับจะสามารถนำออกมาใช้โดยตรงเพื่อรองรับระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ การเก็บสะสมไกลโคเจนในตับเป็นการสำรองกลูโคสไว้เพื่อนำน้ำตาลกลูโคสออกมาใช้ ในระยะสุดท้ายของการตั้งครรภ์ และ ในช่วงต้นของการให้นม (Koster and Opsomer, 2013)

2.9 ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance)

ภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือ อินซูลิน รีซิสแตนซ์ (insulin resistance) เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อถูก Overload ด้วยเซลล์ไขมัน จะทำให้ insulin receptor ลดลง และทำให้การพากลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้กลูโคสเหลืออยู่ในกระแสเลือดมากขึ้น เมื่อเกิดภาวะน้ำตาลสูงในเลือด ก็ยังทำให้ตับอ่อนทำงานหนักเพื่อที่จะหลั่งอินซูลิน ซึ่งในช่วงแรกที่ยังสามารถชดเชยได้ จะมีอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้นอีกเช่นกัน ซึ่งอินซูลินเป็น Anabolic hormone ทำให้เกิดการสร้างไขมันมากขึ้นด้วย เมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน จะทำให้การทำให้การทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป และทำให้การหลั่งอินซูลิน ลดลงในเวลาต่อมา ทำให้เกิดภาวะที่อินซูลิน ก็หลั่งน้อยลงเช่นกัน และทำให้เนื้อเยื่อก็ดื้อต่ออินซูลิน น้ำตาลในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น และทำให้มีการสร้างอินซูลินที่ตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นด้วย เมื่อปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น Beta cell ที่ตับอ่อนจะหลั่งอินซูลินออกมาและเมื่ออินซูลินจับกับ receptors ก็จะทำให้พากลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วย ถ้าปริมาณ insulin receptors ของเซลล์ลดลง ทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้กลูโคสอยู่ในกระแสเลือดมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ในระยะตับอ่อนจะทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่ง อินซูลิน ซึ่งในช่วงแรกที่สามารถชดเชยได้ จะมีอินซูลิน ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน จะทำให้การทำให้การทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป ทำให้การหลั่งอินซูลินลดลงในเวลาต่อมา ทำให้เกิดการหลั่งอินซูลิน ก็ลดลงน้อย และเนื้อเยื่อก็ดื้อต่ออินซูลิน น้ำตาลในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น (ชลทิศ อุไรฤกษ์กุล, 2010)

2.10 การประเมินภาวะดื้อต่ออินซูลิน

ภาวะดื้อต่ออินซูลินเป็นสาเหตุหลักของการรบกวนการเผาผลาญอาหารที่ได้เพิ่มขึ้น สำหรับการวัดความไวของอินซูลิน และการประเมินความไวของอินซูลิน ทำได้หลายวิธีโดยการตรวจวัดความเข้มข้นของกลูโคส และอินซูลินในเลือด สำหรับการสัมมนาครั้งนี้มุ่งเน้นการประเมินภาวะดื้อต่ออินซูลินที่นิยมใช้ในโคดังนี้

การทดสอบการตอบสนองของฮอโมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด (Intravenous Glucose Tolerance Test, IVGTT) เป็นวิธีการประเมินความต้านทานต่ออินซูลินในโคนม ที่สามารถวัดได้ง่ายในโคนม โดยทำการวัดความเข้มข้นของกลูโคสและอินซูลิน หลังจากฉีดกลูโคสเข้าเส้นเลือดดำ ซึ่งปริมาณการฉีดกลูโคส มีความแตกต่างกัน เช่น 150, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยทำการวัดในช่วงเวลา 60 หรือ 180 นาที หลังการฉีด การทดสอบ IVGTT สามารถทำได้ง่ายที่ แม้จะยังมีข้อโต้แย้งของข้อมูลที่ได้รับบางอย่างในการเผาผลาญกลูโคสและอินซูลิน ระดับน้ำตาลในเลือดในระหว่างการทดสอบ IVGTT ได้มาจากการฉีดน้ำตาล กระบวนการเมแทบอลิซึมจากตับและไต การดูดซึมกลูโคสจากลำไส้เข้าสู่อวัยวะกลูโคสที่ไต การดูดซึมกลูโคสจากต่อมน้ำนมและมดลูกและการดูดซึมกลูโคส โดยเนื้อเยื่อที่ไวต่ออินซูลิน เช่น กล้ามเนื้อโครงร่างและเนื้อเยื่อไขมัน ส่วนระดับอินซูลินในระหว่างการทดสอบ IVGTT เป็นผลมาจากการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในการตอบสนองต่อกลูโคสและการกำจัดของอินซูลินโดยตับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของระดับอินซูลินและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในช่วง IVGTT สามารถคำนวณหาการตอบสนองของอินซูลินได้ดังนี้ คำนวณค่าคงที่ (fractional turnover rate, k) ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงสุดลดลงครึ่งหนึ่ง ($T_{1/2}$) เวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสกลับเข้าสู่ค่าพื้นฐาน พื้นที่ใต้เส้นกราฟของระดับน้ำตาลที่เวลา 60 และ 120 นาที โดยที่ k -value (%/min) คำนวณได้จาก: $100 \times [(\log \text{ glucose } T_{15} - \log \text{ glucose } T_{45}) / (T_{45} - T_{15})]$ และ ค่า $T_{1/2}$ (min) คำนวณจากสมการ $100 \times (0.693/k)$

การแปลผลภาวะดื้อต่ออินซูลินสามารถประเมินได้จาก อัตราการขจัดกลูโคสออกจากเลือด (clearance rate of glucose and insulin) อยู่ในระดับต่ำ โดยที่พื้นที่ใต้เส้นกราฟของระดับน้ำตาลสูง ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงสุดลดลงครึ่งหนึ่ง (time to reach half of the maximal glucose) และเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสกลับเข้าสู่ค่าพื้นฐาน (time to reach the basal glucose) มีค่าสูง (Opsomer et al., 1999)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MINMOD เพื่ออำนวยความสะดวกในการคำนวณ โปรแกรมนี้จะคำนวณหาพารามิเตอร์ความไวของอินซูลิน การหายไปของน้ำตาลกลูโคสเป็นเศษส่วนต่อหน่วยอินซูลิน หรือประสิทธิภาพกลูโคสอินซูลินที่ศูนย์ ความสามารถของน้ำตาลกลูโคสในการกระตุ้นของตัวเอง การหายไปและยับยั้งการผลิตกลูโคสภายนอก หรือการตอบสนองต่ออินซูลินเฉียบพลันกลูโคส การเพิ่มขึ้นของอินซูลินหลังจากที่ฟังก์ชันฉีดกลูโคสเข้าเซลล์อินซูลินความจุหลังของตับอ่อนเซลล์ หรือดัชนีจำเพาะ: ตัวชี้วัดการทำงานของ B-cell ในความสัมพันธ์กับความไวของอินซูลิน

Chagas et al. (2009) ได้ทำการทดสอบ IVGT โดยการฉีดน้ำตาลกลูโคส 300 mg/kg โดยทำการฉีดภายใน 2 นาที เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, ทุกๆนาที่ตั้งแต่เวลาที่ 2-12 และ ที่เวลา 15, 18,

20, 23, 26, 30, 35, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, และ 240 min. ทำการคำนวณค่าพารามิเตอร์ดังนี้

$$k\text{-value (\%/min)} = 100 \times [(\log \text{ glucose T15} - \log \text{ glucose T45}) / (T45 - T15)]$$

$$T1/2 \text{ (min) คำนวณจาก} = 100 \times (0.693/k)$$

โดยที่ค่าคงที่ (fractional turnover rate, k), the half-life ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงสุดลดลงครึ่งหนึ่ง ($T1/2$) และเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสกลับเข้าสู่ค่าพื้นฐาน มีค่าสูงพื้นที่ใต้เส้นกราฟของระดับน้ำตาลที่เวลา 60 และ 120 นาที

นอกจากนั้น Holtenius and Holtenius (2007) ได้ทำการคำนวณภาวะดื้ออินซูลินได้จากการตัดแปลงโดยใช้สูตรการคำนวณค่า Revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) โดยใช้ค่าความเข้มข้นของ กลูโคส อินซูลิน และค่ากรดไขมันอิสระ เช่น NEFA ดังนี้

$$RQUICKI = 1/(\log[\text{basal glucose}] + \log [\text{basal insulin}] + \log [\text{NEFA}])$$

โดย Holtenius and Holtenius (2007) ได้ศึกษาในโครีดนมจำนวน 237 ตัว พบว่าค่า RQUICKI มีค่าต่ำในโคหลังคลอดที่มี BCS สูง สามารถใช้และมีความแม่นยำในการประเมินสอดคล้องกับการคำนวณค่าพารามิเตอร์ของกลูโคสและอินซูลิน

2.11 ความผิดปกติของการเผาผลาญอาหาร ปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และภาวะดื้อต่ออินซูลิน

คีโตซิสเป็นโรคที่สำคัญของการเผาผลาญอาหารโคนม ในช่วงระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงหลังคลอด แต่สาเหตุที่เกี่ยวข้องกันยังเป็นแบบไม่ชัดเจน จากการศึกษาจะชี้แจงความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดออกซิเดชัน การทำงานของตับ Chuang et al. (2014) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของภาวะดื้อต่ออินซูลิน และคีโตซิสในโคนม ใช้สัตว์ทดลองจากฟาร์มโคนมที่ได้มาตรฐานในจังหวัดเฮย์หลงเจียงประเทศจีน โค 16 ตัวที่พบว่ามีอาการเกิดคีโตซิส และโคอีก 24 ตัวที่มีสุขภาพปกติที่นำมาเป็นตัวควบคุม เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลองทั้งหมด โดยเก็บในระยะ 14 วันหลังคลอดในระหว่างการอดอาหารเข้า นำมาทดสอบพารามิเตอร์ เพื่อหาสมดุลพลังงาน ความเครียดออกซิเดชัน ความไวของอินซูลินและการทดสอบการนำกลูโคสไปใช้ระหว่างโคกลุ่มคีโตซิส และกลุ่มควบคุมโดยก่อนการทดสอบโคแต่ละตัวจะได้รับกลูโคส 0.5 mg/kg ของน้ำตาลกลูโคส 50% โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำในเวลา 10-15 นาที ก่อนเก็บตัวอย่างเลือด โดยใช้เข็ม catheters แหวงเส้นเลือดดำที่คอไว้ โดยจะเก็บเลือดในเวลา 15 นาทีก่อนการให้กลูโคสและหลังการให้กลูโคสเวลาที่ 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 นาที ทำการตรวจหาค่ากลูโคส (Glc) สารเบต้า ไฮ ดรอกซี บิวทีเรท (BHBA) และ กรดไขมันอิสระ (NEFA) สำหรับประเมินสถานะสมดุลพลังงานสำหรับตรวจสอบสถานะความเครียดออกซิเดชัน และการทดสอบความไวของอินซูลิน ตามความเข้มข้นของกลูโคส NEFAs และอินซูลิน ในพลาสมาจากโคกลุ่มที่พบ

อาการคีโตซีส และโคกลุ่มควบคุม โดยความแตกต่างของดัชนีวัดความไวของ อินซูลิน (RQUICKI) สามารถวัดได้โดยสูตร ($RQUICKI = 1 / [\log G0 + \log I0 + \log NEFAs\ 0]$) ผลการศึกษาพบว่าค่าความเข้มข้นของ NEFA และ BHBA ($P < 0.01$) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในโคกลุ่มคีโตซีสเมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นค่า malondialdehyde (MDA) และ superoxide dismutase (SOD) ในพลาสมา เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในโคกลุ่มคีโตซีส มากกว่าโคกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือด และอินซูลินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ในโคกลุ่มที่พบคีโตซีสเมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุม และดัชนีวัดความไวของอินซูลิน (RQUICKI) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในโคกลุ่มคีโตซีสมากกว่าค่าของโคกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโคกลุ่มคีโตซีสมีภาวะขาดสมดุลพลังงาน ส่งผลให้ตับเสียหายที่มีผลมาจากความเครียดออกซิเดชัน และทำให้การตอบสนองต่ออินซูลินที่ต่ำลง ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่าง คีโตซีสและภาวะดื้อต่ออินซูลินจึงเกี่ยวข้องกับการทำงานของตับและความเครียดออกซิเดชัน ที่สามารถทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลิน

Opsomer et al. (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของการเผาผลาญอาหาร และโรครังไข่ม้วนน้ำ ในโคนมที่ให้ผลผลิตสูง โดยใช้โคทั้งหมด 30 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 15 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับความเครียดจากโรคเรื้อรังไข่ม้วนน้ำ และกลุ่มโคปกติเป็นตัวควบคุม ทำการทดสอบ Glucose Tolerance Test เพื่อทดสอบการทำงานของอินซูลินที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในโคที่มีรังไข่ม้วนน้ำ ความแตกต่างในการนำกลูโคสไปใช้ระหว่างโคที่มีรังไข่ม้วนน้ำและโคควบคุม วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างในการตอบสนองต่ออินซูลินที่เพิ่มขึ้นสูงในช่วงเวลาที่ 60 และ 120 นาทีหลังการให้กลูโคส ทำการทดสอบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือดด้วยวิธี Glucose Tolerance โดยการฉีดกลูโคส 30% เข้าเส้นเลือดดำ ปริมาณมาตรฐาน 300 กรัมของน้ำตาลกลูโคส 1,000 มล วัดระดับน้ำตาลและอินซูลินก่อนการให้กลูโคส 10 นาที และหลังจากให้กลูโคสจะจับเวลาเริ่มเก็บเลือดที่ 5 นาทีหลังจากให้กลูโคส และเก็บซ้ำในเวลา 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, และ 120 นาที นำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการหมุนเวียนเศษส่วน k, น้ำตาลครึ่งเวลา T, และพื้นที่ใต้เส้นโค้ง AUC ช่วงเวลาที่ 60 และ 120 นาทีหลังการให้กลูโคส

จากข้อมูลการศึกษาดังตารางที่ 2.5 ชี้ให้เห็นระดับความเข้มข้นของอินซูลินของโคกลุ่มที่พบภาวะรังไข่ม้วนน้ำ มีค่าต่ำกว่าโคในกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับระดับสูงสุดของอินซูลินโคกลุ่มรังไข่ม้วนน้ำก็มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และสอดคล้องกับพื้นที่ใต้กราฟช่วงเวลา 60 ที่มีค่าต่ำกว่า แสดงถึงการตอบสนองต่ออินซูลินของโคกลุ่มรังไข่ม้วนน้ำน้อยกว่าโคกลุ่มควบคุม เมื่อร่างกายมีปริมาณอินซูลินต่ำก็ส่งผลให้กลูโคสต่ำด้วย ผลที่ตามมาคือเกิดการสลายไขมันนำไปสู่สภาวะพลังงานเป็นลบ และมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์

ตารางที่ 2.5 การตรวจหาพารามิเตอร์ในเลือด การประเมินสถานะสมดุลพลังงาน การตรวจสอบสถานะความเครียดออกซิเดชัน และการตรวจสอบของการทดสอบความไวของอินซูลิน

พารามิเตอร์	โค Ketosis	โคปกติ	P-value
จำนวน ตัว	16	24	-
NEFAs (mmol/L)	0.99 ± 0.32	0.51 ± 0.15	0.010
BHBA (mmol/L)	2.71 ± 1.29	0.62 ± 0.11	0.010
SOD (U/mL)	75.61 ± 6.34	70.11 ± 7.86	0.031
MDA (nmol/mL)	2.89 ± 0.48	2.29 ± 0.37	0.047
Glucose (mmol/L)	2.70 ± 0.89	3.31 ± 0.17	0.003
Insulin (mIU/L)	13.87 ± 1.75	14.01 ± 2.01	0.043
RQUICKI (mIU/L)	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.017

BHBA, beta- hydroxybutyric acid; MDA, Malondialdehyde;

*RQUICKI ($\mu\text{IU/L}$) = $1/[\log G0 + \log I0 + \log \text{NEFAs0}]$. G0, glucose (mg/dl); I0, insulin ($\mu\text{IU/mL}$); NEFAs0, non-esterified fatty acids (NEFAs, non-esterified fatty acids; SOD, superoxide dismutase mmol/L) ที่มา: Chuang et al. (2014)

การศึกษาแนวทางการป้องกันภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดย Leiva et al. (2014) ได้ศึกษาการเสริมโครเมียมในโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง โดยที่โครเมียมเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยเฉพาะการใช้กลูโคสในร่างกาย ซึ่งทำงานร่วมกับอินซูลิน ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและการเผาผลาญน้ำตาล โครเมียมทำหน้าที่เสริมการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน โดยเป็นส่วนประกอบของ glucose tolerance factor ซึ่งมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลินต่อตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) การเสริมโครเมียมอยู่ในรูปของโครเมียมพิโคลิเนต (Chromium Picolinate) หรือ โครเมียม โพลีนิโคไทเนต (Chromium polynicotinate) โครเมียมเป็นแร่ธาตุจำเป็นซึ่งร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย มีบทบาทสำคัญในเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และไขมัน การเสริมโครเมียมทำให้อินซูลินทำงานได้ดีขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายมีประสิทธิภาพในการนำกลูโคสไปใช้ได้เพิ่มขึ้น เพื่อเปรียบเทียบพารามิเตอร์การดื้อต่ออินซูลินในโคที่ได้รับพลังงานที่ขาดและเกิน โดยการเสริมโครเมียม ใช้สัตว์ทดลอง 13 ตัว ที่ได้รับอาหารที่ให้ตามความต้องการของสัตว์และไม่เสริมโครเมียม สูตรที่ 2 อาหารที่ให้พลังงานสูงไม่เสริมโครเมียม และอาหารสูตรที่ 3 อาหารที่ให้พลังงานสูงและเสริมโครเมียม ทำการทดสอบด้วยวิธี Glucose Tolerance Test โดยทำในวันที่ 32 และ 88 ของระยะการทดลอง โคได้รับการฉีดกลูโคส 0.5 g/ น้ำหนักตัว 1 kg และทำการเก็บตัวอย่างเลือดวัดระดับน้ำตาลและอินซูลินก่อนการให้กลูโคส และเริ่มเมื่อ 5 นาทีหลังจากให้กลูโคส และเก็บซ้ำในเวลา 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, และ 120 นาที

ตารางที่ 2.6 ความแตกต่างการตอบสนองต่ออินซูลินและการนำกลูโคสไปใช้ ระหว่างโคที่พบรังไข่
บวมน้ำ และโคตัวควบคุม

Parameter	โครังไข่บวมน้ำ (n=15)	โคปกติ (n=15)	P-value
Basal glucose (mmol / l)	3.55 (2.93-3.98)	3.45 (2.63-3.89)	0.40
K (% /min)	1.65 (0.71-2.85)	38.61 (28.05-74.08)	0.23
T1/2 (minutes)	48.86 (24.30-97.16)	1.90 (0.94-2.47)	0.23
AUC glucose (T60) (mmol /l /55 min)	507 (341-657)	463 (352-614)	0.09
AUC glucose (T120) (mmol /l /115 min)	786 (555-1061)	710 (533-958)	0.12
Basal insulin (μIU /ml)	9.91 (6.2-26)	10.62 (1.8-23)	0.51
Ins peak (μIU /ml)	94 (19-195)	136 (75-240)	0.04
ΔMax (μIU /ml)	84 (13-186)	125 (57-226)	0.04
AUC insulin (T60) (μIU /ml /55 min)	3,066 (882-5625)	4135 (2078-6860)	0.09
AUC insulin (T120) (μIU /ml /115 min)	4,025 (1748-6156)	4959 (2442-7829)	0.20

การวิเคราะห์ความเข้มข้นสูงสุด ΔMax และ Insulin peak แสดงให้เห็นว่าอินซูลินมีการตอบสนอง
ต่อการนำกลูโคสไปใช้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในโคที่มีรังไข่บวมน้ำเมื่อเทียบกับโคตัวควบคุม (P=0.04)
อย่างไรก็ตามความแตกต่างในพื้นฐานระดับความเข้มข้นของอินซูลิน (P=0.51) และพื้นที่ใต้กราฟ
(T60: P=0.09; T120: P=0.20) จึงมีผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่มา: Opsomer et al. (1999)

ผลการศึกษาพบว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีแนวโน้มค่ากลูโคสในเลือดมากกว่าโคที่มี
การเสริมโครเมียมและโคควบคุม (P=0.09) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ค่า NEFAs ของโคที่ได้รับ
อาหารที่มีพลังงานสูงมากกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุม (P=0.08) ซึ่งไม่มีความแตกต่าง

ทางสถิติ ค่า RQUICKI ของโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีค่าการตอบสนองต่ออินซูลินน้อยกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุม ($P=0.05$) พื้นที่ใต้กราฟของ Glucose พบว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุม ($P=0.45$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ Insulin พบว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุม ($P=0.04$) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ อัตราการใช้กลูโคสของโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีค่าการใช้กลูโคสต่ำกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.61$) และโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูง มีค่าครึ่งชีวิตของกลูโคสสูงกว่าโคที่มีการเสริมโครเมียมและโคควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.68$) ดังตารางที่ 2.7 จากผลการศึกษานี้ให้เห็นว่า โคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูงจะมีค่า RQUICKI ที่บ่งชี้ถึงดัชนีการประเมินการตอบสนองต่อการทำงานของอินซูลินที่ต่ำกว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูงแต่เสริมด้วยโครเมียม และส่งผลให้ Glucose clearance rate หรือระดับการขจัดกลูโคสที่ต่ำกว่าโคที่ได้รับอาหารที่มีพลังงานสูงและเสริมโครเมียม ดังนั้นการเสริมโครเมียมในอาหารสามารถช่วยให้อินซูลินทำงานได้ดี

ตารางที่ 2.7 ดัชนีวัดการตรวจสอบการตอบสนองต่ออินซูลิน (RQUICKI) ของโคที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน (MAN; $n = 4$) อาหารที่เกินความต้องการของพวกเขาก็โดยไม่ต้องเสริมโครเมียม (HIGH ; $n = 4$) อาหารที่มีพลังงานสูงโดยได้เสริมโครเมียม (HIGH Cr; $n = 4$) อาหารที่มีพลังงานสูงโดยเสริมโครเมียม

tem	HIGH	HIGH Cr	MAN	SEM	P-value
น้ำตาลกลูโคส (mg/dL)	95.6	91.1	92.7	1.3	0.09
NEFAs (mmol/L)	0.176	0.139	0.144	0.012	0.08
RQUICKI	0.578	0.780	0.841	0.072	0.05
Glucose tolerance test					
พื้นที่ใต้กราฟ Glucose, mg/dL min)	18,638	17,708	16,971	1,650	0.45
พื้นที่ใต้กราฟ Insulin, mg/dL min)	6,324	3,668	4,918	1,394	0.04
อัตราการขจัดกลูโคส,% min	0.494	1.163	1.049	0.173	0.61
ค่าครึ่งชีวิตของกลูโคส	101.7	77.4	78.1	21.9	0.68

ที่มา: Leiva et al. (2014)

2.12 ภาวะดื้อต่ออินซูลินและการเกิดภาวะกีบอักเสบ (Insulin resistance and Laminitis)

2.12.1 ภาวะกีบอักเสบ (Laminitis)

หมายถึง การอักเสบแบบไม่ติดเชื้อที่กระจายทั่วไปบริเวณเนื้อเยื่อชั้นลามินา (lamina) ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างผนังของกีบและบริเวณชั้นหนังแท้ที่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง หรือ คอร์เรียม

(corium) ของกีบโค หรือเรียกอีกอย่างว่า โพโดเดอร์มาไตติส อะแซบติกา ดิบฟิวซา (pododermatitis aseptica diffusa) ภาวะกีบอักเสบเป็นสาเหตุเริ่มต้นที่สำคัญของการเกิดอาการเดินขาเกะแผลในโคนม (lameness) โดยมีรอยโรคที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะรอยชำเลือดบริเวณพื้นกีบ (sole hemorrhage) และบริเวณขอบขาวของกีบ (white line hemorrhage) ตลอดจนแผลหลุมที่พื้นกีบ (sole ulcer) ซึ่งรอยโรคเหล่านี้เป็นรอยโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดอาการเดินขาเกะแผลในโคนม ซึ่งมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจการเลี้ยงโคนมเป็นอย่างยิ่ง โดยมีผลทำให้สูญเสียผลผลิตน้ำนม ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ ลดลง และโคมีความเสี่ยงในการถูกคัตทิ้งเพิ่มมากขึ้น

ปัจจุบันเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าการเกิดภาวะกีบอักเสบมีความสัมพันธ์กับอาหารที่โคได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีผลต่อการเกิดภาวะกรดในกระเพาะหมัก จากข้อมูลทั้งในและต่างประเทศพบว่า อาหารและการให้อาหารมีส่วนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค เช่น การที่โคได้รับอาหารชั้นในปริมาณมากๆ และมีสัดส่วนของอาหารหยาบน้อย ตลอดจนการเสริมแป้งที่มีการย่อยสลายในกระเพาะหมักได้ง่าย เช่น ข้าวบาร์เลย์ หรือแป้งมันสำปะหลัง ในสูตรอาหารปริมาณที่สูง มีผลต่อการเกิดภาวะกีบอักเสบ ถึงแม้ว่ายังไม่ทราบถึงกลไกของการเกิดโรคที่แน่ชัดก็ตาม

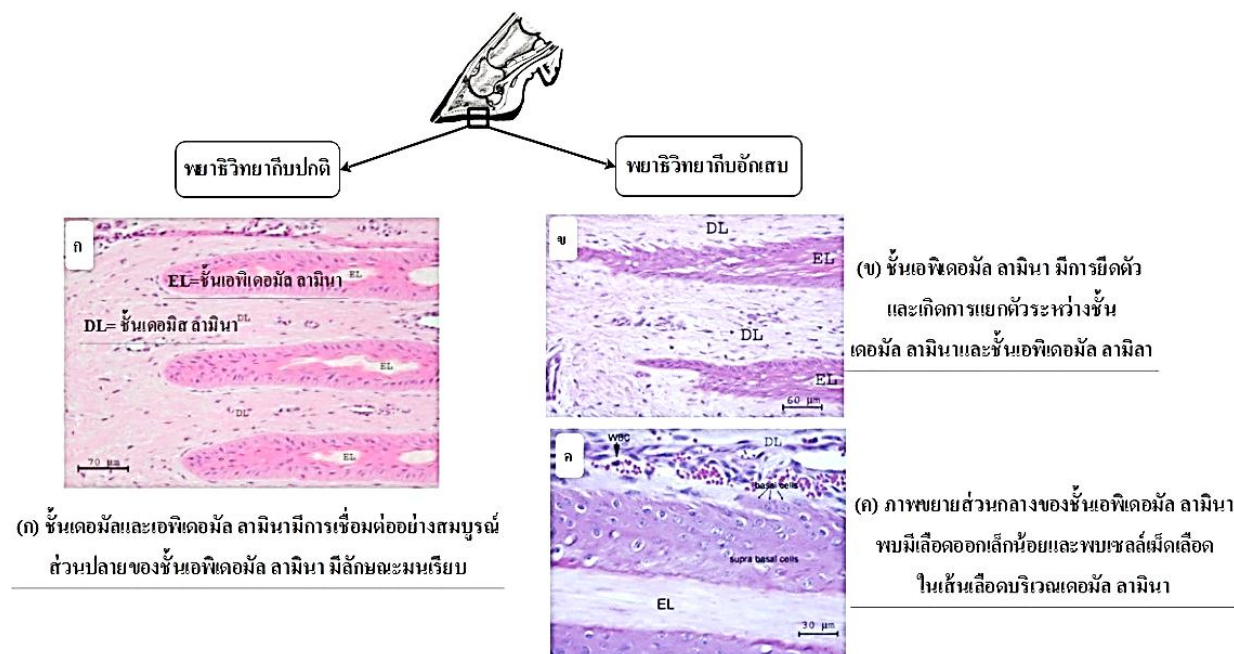
อาการที่สำคัญของกีบอักเสบ สามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้

1. อาการเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน (acute and sub-acute form)
2. อาการกึ่งเฉียบพลันและเรื้อรัง (sub-acute and chronic form)

โคที่แสดงอาการเฉียบพลันมักส่งผลกระทบต่อเนื้อให้โคแสดงอาการกึ่งเฉียบพลัน โดยพบว่าโคมีอาการเจ็บกีบ (foot pain) เดินขาเกะแผล ยืนหลังโกง ยืนย่ำเท้าทั้ง 4 ข้าง (shifting weight) และพบการอักเสบบริเวณเส้นขอบของโคโลนารี (coronary band inflammation) หลังจากนั้นโคจะแสดงอาการแบบกึ่งเฉียบพลัน ซึ่งมีความรุนแรงลดลง โดยยังพบอาการยืนย่ำเท้าทั้ง 4 ข้าง และพบการอักเสบบริเวณเส้นขอบของโคโลนารี และอาการเจ็บกีบ นอกจากนั้นมักพบรอยโรคที่กีบร่วมด้วย เช่น ลักษณะรอยชำเลือดบริเวณพื้นกีบ และบริเวณขอบขาวของกีบ หากโคไม่ได้รับการรักษา หรืออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ยืนบนพื้นแข็งเป็นเวลานาน เดินในระยะทางไกลๆ หรือเดินบนพื้นที่ขรุขระ จะเพิ่มความรุนแรงของรอยโรคมากยิ่งขึ้น และพัฒนาไปเป็นอาการแบบเรื้อรัง เช่น รูปร่างกีบเปลี่ยนแปลง เนื่องจากการรับน้ำหนักไม่สมดุล ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเจริญของกีบ กีบยาวผิดปกติ ซึ่งโดยส่วนใหญ่อาการกลุ่มนี้โคจะไม่แสดงอาการผิดปกติให้เห็น ยกเว้นการสังเกตรอยโรคที่พื้นกีบในขณะการตัดแต่งกีบเท่านั้น แต่ในรายเรื้อรังเป็นเวลานานอาจพัฒนาเกิดแผลหลุมที่พื้นกีบ ซึ่งส่งผลกระทบต่อโคอย่างยิ่ง ทำให้โคแสดงอาการเดินขาเกะแผล การกินอาหารลดลง ผลผลิตและประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ลดลง

พยาธิสรีรวิทยาการเกิดภาวะกีบอักเสบ (pathophysiology of laminitis) ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่สำคัญของกีบอักเสบ คือการเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณชั้นลามินา ที่เกิดจากความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือดในชั้นคอร์เรียมของกีบ (vascular disturbances) ส่งผลทำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจนของเซลล์ (hypoxia) ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อชั้นล่างสุดของผิวหนังกำพวด หรือ เอพิเดอมีล เบซอลเซลล์ (epidermal basal cell) ส่งผลให้เกิดการแยกตัว

ระหว่างชั้นหนังแท้และชั้นหนังกำพร้า นอกจากนั้นความผิดปกติของเส้นเลือดบริเวณกีบยังมีผลทำให้ความดันเลือดเพิ่มขึ้น เกิดภาวะบวมน้ำ (edema) และมีเลือดออกภายในส่วนคอร์เรียม ทำให้เกิดการอักเสบและเจ็บปวดตามมา (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 พยาธิวิทยากีบปกติ (ก) และกีบอักเสบ (ข, ค) (ดัดแปลงมาจาก Thoenes et al., 2005)

สาเหตุสำคัญที่มีผลต่อความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือดและเส้นเลือดที่กีบ มีหลายสาเหตุที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญอาหาร ได้แก่ สารเอนโดทอกซิน (endotoxin) กรดแลคติก (lactic acid) ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) เป็นต้น ซึ่งสาเหตุทั้งหมดที่กล่าวมา มีผลมาจากการจัดการอาหารที่ไม่สมดุล และส่งผลกระทบต่อการทำงานของกระเพาะหมักทั้งสิ้น

2.12.2 อาหารและการเกิดภาวะกีบอักเสบ (Nutrition and Laminitis)

ปัจจุบันกลไกการเกิดภาวะกีบอักเสบที่มีสาเหตุจากอาหาร ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่จากการเรียงเรียงเอกสารที่ผ่านมาผู้เขียนสันนิษฐานว่า ปัจจัยที่สำคัญที่เป็นสาเหตุการเกิดภาวะกีบอักเสบมี 2 ปัจจัย คือการเพิ่มขึ้นของสารเอนโดทอกซินในกระเพาะหมักและลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) และการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance)

1) เอนโดทอกซินและการเกิดภาวะกีบอักเสบ

ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดทอกซินและการเกิดภาวะกีบอักเสบ ได้อธิบายตามภาพที่ 2.2 ดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อโคกินอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งสูงจะไปกระตุ้นการเจริญของ

จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและเพิ่มกระบวนการหมักย่อยอาหาร ทำให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายจำนวนมาก ประกอบกับโคมีการเคี้ยวเอื้องลดลงเนื่องจากสัดส่วนของอาหารเยื่อใยที่ได้รับลดลง ส่งผลให้การหลั่งบัพเฟอร์จากน้ำลายลดลง และความสามารถในการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่ายของพาลิลลีของกระเพาะหมักลดลงเนื่องจากโคไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับภาวะที่ได้รับอาหารสูงๆ ในช่วงหลังคลอดใหม่หรือในระยะขุนได้ ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้ส่งผลให้เกิดการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายในกระเพาะหมักทำให้ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลงกว่าเกณฑ์ที่เหมาะสมของการเจริญของแบคทีเรีย ($\text{pH} < 5.6$) และในภาวะที่ค่า pH ลดลงเรื่อยๆ จะมีการสังเคราะห์กรดแลคติก และสะสมในกระเพาะมากขึ้น ยิ่งทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงอย่างต่อเนื่อง ($\text{pH} < 5.0$) ส่งผลให้เกิดการตายของแบคทีเรียและมีการปลดปล่อย เอนโดทอกซิน หรือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ หรือ แอลพีเอส (lipopolysaccharide, LPS) ออกมาจำนวนมาก จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในและต่างประเทศ (ตารางที่ 2.8) พบว่าโคที่ได้รับแป้งจากข้าวบาร์เลย์ หรือมันสำปะหลังมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้ pH ในกระเพาะหมักลดลง และพบการเพิ่มขึ้นของแอลพีเอสในกระเพาะหมัก นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบแอลพีเอสในลำไส้ส่วนหลังเนื่องจากเกิดกระบวนการหมักย่อยแป้งในอวัยวะส่วนนี้ด้วย

สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ตายแล้วและมีความสามารถกระตุ้นการอักเสบของร่างกาย ซึ่งในปัจจุบันเชื่อได้ว่าแอลพีเอส เป็นสารสื่อกลางที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะก๊ออักเสบ โดยเมื่อแอลพีเอส ถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดแล้ว จะไปจับตัวกับโมเลกุลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ไลโปโบลี บายดิ้งโปรตีน (LBP-LPS) หลังจากนั้นจะไปจับตัวกับ CD14 ของเซลล์แมโครฟาจที่ตับ ทำให้แมโครฟาจถูกกระตุ้นการสร้างและหลั่งสารสื่อการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) หลายชนิด เช่น อินเตอร์ลิวคิน (inter-leukine, IL) ทูเมอร์เนโครซิส แฟคเตอร์ อัลฟา (tumor-necrosis factor-alpha, TNF-alpha) และไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ซึ่งสารเหล่านี้เชื่อว่ามีผลต่อการทำหน้าที่ของหลอดเลือดในชั้นคอร์เรียมของผนังกับ

2) ภาวะดื้อต่อสารอินซูลิน (insulin resistance) และการเกิดภาวะก๊ออักเสบ

โคที่มีการหมักย่อยอาหารคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่สูง ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์กรดไขมันระเหยง่ายที่ในกระเพาะหมักสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดโพรพิโอนิก ประกอบกับโคหลังคลอดใหม่ต้องการน้ำตาลกลูโคส เพื่อสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้นในช่วงนี้ ทำให้มีการนำเอากรดโพรพิโอนิกไปสังเคราะห์เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ที่ตับ ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น และมีผลกระตุ้นการหลั่งสารอินซูลิน (insulin) จากตับอ่อนเพื่อดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ในภาวะปกติร่างกายสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินให้สมดุลได้ แต่ในกรณีที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง ตับอ่อนมีการทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่งอินซูลิน ซึ่งในระยะแรกตับอ่อนสามารถชดเชยได้ โดยมีการหลั่งอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น แต่ในระยะยาวเมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน ส่งผลทำให้การทำงานของตับอ่อนเสียไป และลดการหลั่งอินซูลิน ประกอบกับเนื้อเยื่อไม่มีตัวรับอินซูลิน ทำให้ไม่สามารถดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เรียกว่า ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งภาวะนี้ส่งผลต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดตามมา

ตารางที่ 2.8 ชนิดและสัดส่วนของอาหารชั้นและอาหารหยาบ ค่า pH ความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ในกระเพาะหมักของโคเนื้อ-นม

อ้างอิง	องค์ประกอบอาหาร (% วัตถุแห้ง)	ค่า pH กระเพาะหมัก		LPS (10 ³ EU/ml)
		pH<5.6	เฉลี่ย	
		(นาที่/วัน)		
การศึกษาในต่างประเทศ				
1	60-40% อัลฟาฟ่าเฮย์, 40-60% อาหารชั้นที่มี	98	6.3	8.2
2	100-59% อัลฟาฟ่าเฮย์, 0-41% อาหารชั้นที่มี	0	6.7	6.3
	24% อัลฟาฟ่า เฮย์, 76% อาหารชั้นที่มีบาร์เลย์	121	6.1	26.9
3	43% อาหารหยาบ, 57% อาหารชั้น	187	6.2	24.5
	32% อาหารหยาบ, 68% อาหารชั้น	309	6.0	128.8
4	50% อัลฟาฟ่า เฮย์, 50% อาหารชั้น	112	6.3	42.1
	40% อัลฟาฟ่า เฮย์, 60% อัลฟาฟ่า เฮย์อัดเม็ด	558	5.8	145.6
5	70% อาหารหยาบ, 30% อาหารชั้น	56	6.3	10.4
	30% อาหารหยาบ, 70% อาหารชั้น	299	5.9	168.4
6	85% อัลฟาฟ่า เฮย์, 15% อาหารชั้นที่มีบาร์เลย์	-	6.7	7.9
	70% อัลฟาฟ่า เฮย์, 30% อาหารชั้นที่มีบาร์เลย์	-	6.7	50.2
	55% อัลฟาฟ่า เฮย์, 45% อาหารชั้นที่มีบาร์เลย์	-	6.5	88.7
การศึกษาในประเทศ				
7	12.5 % ฟางข้าว, 87.5 % อาหารชั้นที่มีแป้งมัน	-	5.6	40.3
8	46.5 % ฟางข้าว, 53.5 % อาหารชั้นที่มีแป้งมัน	-	5.9	4.5
	12.5 % ฟางข้าว, 87.5 % อาหารชั้นที่มีแป้งมัน	-	5.0	104.0

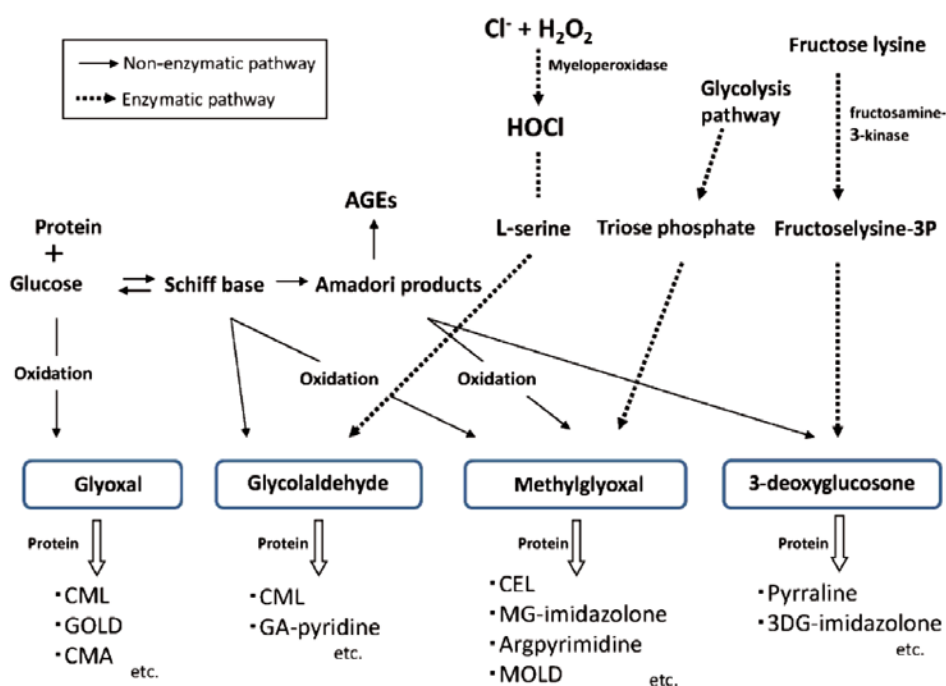
1= Gozho et al. (2005), 2=Gozho et al. (2006), 3=Gozho et al. (2007), 4=Khafipour et al. (2009), 5=Li et al. (2012), 6=Emmanuel et al. (2008), 7=Pilachai et al. (2012), 8=Pilachai et al. (2014)

ภาวะความเข้มข้นของอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia) และภาวะดื้อต่ออินซูลิน มีรายงานว่าเมื่อผลต่อการเกิดภาวะกีดกันเสบในม้า ถึงแม้ว่ายังไม่มียางานยืนยันที่ชัดเจนเกี่ยวกับการเกิดในโค อย่างไรก็ตามจากพยาธิวิทยาการเกิดกีดกันเสบทั้งในโคและม้ามีความใกล้เคียงกันอย่างมาก โดยพบว่าม้าที่ได้รับอาหารชั้นในปริมาณสูงมีผลให้เกิดภาวะความเป็นกรดในลำไส้และปลดปล่อยสาร

การอักเสบและไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งมีผลต่อการทำหน้าที่ของหลอดเลือด การไหลเวียนเลือด เกิดภาวะหลอดเลือดเสื่อมซึ่งเป็นพยาธิสภาพเริ่มต้นของภาวะกับอักเสบ

2.13 แอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นโดโปรดักต์ (Advanced Glycation End-products, AGEs)

เกิดจากผลของการเกิดปฏิกิริยาการจับตัวของหมู่ carbonyl group ของน้ำตาลกับ กรดอะมิโนของโปรตีน ที่เรียกว่าปฏิกิริยา Glycation หรือ Maillard reaction ได้สารประกอบ Carbonyl-amine ที่มีลักษณะสีน้ำตาล หรือเรียกว่า ปฏิกิริยาสีน้ำตาล หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน (Dehydration reaction) หรือเรียกว่าขั้นตอน Schiff's base ได้เป็นสารกลุ่ม amine และมีการเรียงตัวใหม่ของสารเอมีน ได้สารอินเทอร์มีเดียตของปฏิกิริยา Maillard ที่เรียกว่า Amadori products เช่น Aldoseamine ซึ่งสารกลุ่มนี้จะเปลี่ยนเป็น AGEs ต่อไป นอกจากนั้นในช่วงการเกิดปฏิกิริยา Maillard ยังเกิดการสร้างสารอินเทอร์มีเดียตของน้ำตาลกลูโคส เช่น glucose autooxidation, lipid peroxidation หรือ polyol pathway และสารกลุ่ม glyoxal, methylglyoxal 3-deoxyglucosone ขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น AGEs ชนิดต่างๆ เช่น สาร Glyoxal เปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น N_ε-(carboxymethyl) lysine (CML) glyoxal-derived lysyl dimer (GOLD) หรือ N-(carboxymethyl) arginine (CMA) ส่วน Methylglyoxal เปลี่ยนไปเป็น N-(carboxyethyl) lysine (CEL), methylglyoxal-derived lysyl dimer (MOLD), argpyrimidine or methylglyoxal-derived hydroimidazolone MG-H1 ในขณะที่ 3-deoxyglucosone เปลี่ยนเป็น pentosidine imidazolone หรือ CML เป็นต้น (Thornalley, 1990) ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเกิด Advanced Glycation End Products
ที่มา: Thornalley (1990)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ อินซูลิน รีซิสแตนซ์ และการเกิดสภาวะกีดกันไขมันในโคนมสาว

3.1.1 สัตว์ทดลอง

การทดลองครั้งนี้ใช้โคนมสาวสายพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนมากกว่า ร้อยละ 75 ที่มีอายุระหว่าง 15-20 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 275 ± 13.8 กิโลกรัม ($\pm$ SD) จำนวน 10 ตัว สัตว์ทดลองทุกตัวมีสุขภาพแข็งแรง และไม่มีปัญหาภาวะกรดในกระเพาะหมักและกีดกันไขมันก่อนการทดลอง โดยโคทดลองถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยว พื้นคอนกรีต ขนาด 3×3 ตารางเมตร ในเรือนที่มีการระบายอากาศตามธรรมชาติ พื้นคอกรองด้วยทรายหนาน้อย 10 เซนติเมตร

3.1.2 การวางแผนการทดลอง

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองการประเมินจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์เพื่องานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี เลขที่ ศธ 0543.7/333 โดยวางแผนการทดลองแบบ Group T-test มีระยะเวลาทดลอง 13 วันโดยแบ่งเป็น 2 ระยะ ในแต่ละระยะประกอบด้วย ระยะเตรียมและปรับสัตว์ทดลอง 7 วัน และระยะทดลอง 6 วัน สัตว์ทดลองถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ 5 ตัว ให้ได้รับอาหารสูตรควบคุม และสูตรทดลอง

3.1.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1.3.1 อาหารและการให้อาหาร

ตลอดระยะเวลา 7 วัน ของการปรับสัตว์ทดลอง โคทุกตัวได้รับอาหารสูตรควบคุมผสมสำเร็จและให้ฟางข้าวสับกินอย่างเต็มที่ โดยอาหารสูตรอาหารควบคุมผสมสำเร็จมีสัดส่วนของฟางข้าวสับ มันเส้น กากถั่วเหลือง รำละเอียด ยูเรีย กำมะถัน และแร่ธาตุ ร้อยละ 50, 13, 25, 10, 0.5, 0.5 และ 1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) ตามวิธีของ Pilachai et al. (2014) ในระยะเวลา 5 วันของระยะทดลอง โคกลุ่มควบคุมได้รับอาหารเช่นเดียวกับโคในระยะปรับสัตว์ทดลอง ส่วนโคกลุ่มทดลองได้รับอาหารสูตรทดลองผสมสำเร็จมีสัดส่วนของฟางข้าวสับ มันเส้นบดละเอียด กากถั่วเหลือง รำละเอียด ยูเรีย กำมะถัน และแร่ธาตุ ร้อยละ 15, 50, 10.23, 0.5, 0.5 และ 1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) โดยการให้อาหารถูกแบ่งให้กินอย่างเต็มที่ เช้าและบ่าย (08.00 และ 17.00) ทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึกปริมาณอาหารก่อนและหลังการให้อาหารทุกวัน จัดหาน้ำสะอาดให้เพียงพอตลอดเวลา

3.1.3.2 การเก็บและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

บันทึกปริมาณการกินได้ของอาหารในแต่ละวัน ตลอดระยะการทดลอง และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทั้งสองสูตร โดยการเก็บในถุงกระดาษ ปริมาณ 500 กรัม เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter; DM) เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude

protein, CP) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber; NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (acid-detergent fiber; ADF) และไขมัน (ether extract; EE) ตามวิธีการของ Van Soest et al. (1991)

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบและสัดส่วนในอาหารชั้น

ส่วนผสม (% dry matter)	อาหารสูตรควบคุม	อาหารสูตรทดลอง
ฟางข้าวสับ	50	15
มันเส้น	13	-
มันบด	-	50
กากถั่วเหลือง	25	10
รำข้าว	10	23
ยูเรีย	0.5	0.5
กำมะถัน	0.5	0.5
แร่ธาตุ	1	1
รวม	100	100

3.1.3.3 การตรวจสอบสุขภาพเบื้องต้น

ในวันที่ 0, 3 และ 5 เวลา 12.00 นาฬิกา ของระยะทดลอง โคททดลองได้รับการตรวจสอบสุขภาพเบื้องต้น โดยทำการวัดอัตราการหายใจโดยการสังเกตการเคลื่อนที่ ขึ้น-ลงบริเวณสวาทอย่างสม่ำเสมอ ในรอบ 1 นาที การวัดการเต้นของหัวใจโดยใช้สเตทโทสโคป (*stethoscope*) นับจำนวนเสียงเต้นของหัวใจในรอบ 1 นาที บริเวณซอกขาหน้าด้านซ้ายและช่องอก การวัดการบีบตัวของกระเพาะหมักโดยใช้สเตทโทสโคป นับจำนวนครั้งของการบีบตัวของกระเพาะหมัก บริเวณสวาทด้านซ้ายของตัวโค ในช่วงเวลา 5 นาที วัดอุณหภูมิทวารหนักโดยการสอดปรอทเข้าช่องทวาร นาน 1 นาที และบันทึกผลข้อมูล การประเมินคะแนนอุจจาระ โดยออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้ คะแนน 1 อุจจาระเหลวเป็นน้ำให้ คะแนน 2 อุจจาระเลอะไม่มีรูปทรง คะแนน 3 อุจจาระมีรูปทรงตั้งเป็นกองเมื่อตกลึงพื้น คะแนน 4 อุจจาระตั้งเป็นก้อน และคะแนน 5 อุจจาระเป็นก้อนแข็งกระจายตัวออกจากกัน ตามวิธีของ Hughes (2001) การประเมินสภาวะกีบอึกเสบ ทำการประเมินลักษณะการอึกเสบบริเวณ coronary band และลักษณะการยืนแบบสลับขา (weight shifting) ตามวิธีของ Greenough et al. (2007) และประเมินคะแนนการเดิน (locomotion score) โคที่แสดงสภาวะกีบอึกเสบจะแสดงอาการบวมแดงที่ coronary band และมีสภาวะ weight shifting และ คะแนน locomotion score >2 ขึ้นไป

3.1.3.4 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในกระเพาะหมัก

ในวันที่ 0, 3 และ 5 ที่เวลา 08.00 น., 12.00 น. และ 16.00 น. ของระยะทดลอง ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักโคทุกตัว โดยการสอดท่อ Stomach tube ผ่านทางหลอดอาหารไปยังกระเพาะรูเมน และทำการดูดน้ำในกระเพาะหมักด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ (suction) ทำการวัดค่า pH อ่านและทำการจดบันทึก โดยก่อนทำการสอดท่อ Stomach tube ลงไป

ยังหลอดอาหาร ทำการทาสารหล่อลื่น (KY jelly) เพื่อลดการระคายเคืองต่อหลอดอาหาร ทำการสอดท่อผ่านเข้าทางช่องปาก หลอดอาหาร และกระเพาะหมักอย่างนุ่มนวล โดยระวังไม่ให้เข้าหลอดลม และทำการตรวจสอบโดยการดมกลิ่นแก๊สมีเทนและแอมโมเนียจากปลายท่อ เพื่อยืนยันว่าท่อนั้นอยู่ในกระเพาะหมัก เชื่อมต่อปลายท่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศ หลังจากนั้นเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อดูดเก็บของเหลว โดยดูดทิ้งของเหลวส่วนแรก ปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ที่มีการปนเปื้อนกับน้ำลาย และทำการเก็บตัวอย่างส่วนที่สองประมาณ 250 มิลลิลิตร เมื่อเก็บตัวอย่างเพียงพอ ทำการปิดปั๊ม แล้วค่อยๆ ดึงท่อออกอย่างนุ่มนวล นำตัวอย่างของเหลวที่ได้มารองด้วยผ้าก๊อสนหนา 3 ชั้น ทำการวัดค่า pH ของของเหลวในกระเพาะหมักทันที ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler-Toledo GmbH 8603, Schwerzenbach, Switzerland)

3.1.3.5 การเก็บตัวอย่างเลือด

ในวันที่ 0, 3 และ 5 ที่เวลา 08.00, 12.00 และ 16.00 น. ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ทดลองจากเส้นเลือด Jugular vein ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แยกตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA และ Sodium fluoride ปริมาตรหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร และหลอดเก็บซีรัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทำการดูดพลาสมาและซีรัม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

3.1.3.6 การทดสอบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด (Intravenous Glucose Tolerance Test, IVGTT)

ในวันที่ 5 ของระยะการทดลอง ทำการงดอาหารโค 12 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบ IVGTT และประมาณน้ำหนักโคโดยใช้สายวัดน้ำหนัก และนำมาคำนวณปริมาณกลูโคสที่ขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทำการติดตั้งท่อเก็บเลือด (IV catheter) ที่เส้นเลือด Jugular vein ของโคทดลองทุกตัว ก่อนการทดสอบ ในวันที่ 6 ที่เวลา 08.00 น. (เวลาที่ 0 นาที) ของระยะการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดผ่าน IV catheter ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอด EDTA และ Sodium fluoride หลังจากนั้นทำการให้กลูโคสปริมาณตามน้ำหนักตัวที่คำนวณได้ผ่านทางสายน้ำเกลือในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาทีหลังการให้กลูโคส แบ่งเก็บใส่หลอด EDTA และ Sodium fluoride นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทำการดูดพลาสมาและซีรัม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ระดับน้ำตาลและสารอินซูลินในเลือดต่อไป

3.1.3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง โดยทำการวิเคราะห์วัตถุแห้ง (DM) เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber; NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (acid-detergent fiber; ADF) และไขมัน (ether extract; EE) ตามวิธีการของ Van Soest et al. (1991) การวิเคราะห์ VFA และ lactate ในของเหลวใน

กระเพาะหมัก โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Samuel et al. (1997) วิเคราะห์ความเข้มข้นของ Glucose ด้วยวิธี Hexokinase ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (BS-400, Mindray Co., Ltd., Shenzhen, China) วิเคราะห์ความเข้มข้นของ insulin ด้วยชุดทดสอบ ELISA kit (Bovine insulin ELISA) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AGEs สำหรับ methylglyoxal ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (C18 column, 3.9 mmx150 mm, and 4 μ m particle diameter, MA, USA; flow rate 1 mL/mL) ตามวิธีของ Dhar et al. (2009)

3.1.3.8 การคำนวณและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในเลือด นำมาคำนวณค่าการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือดตามวิธีของ Opsomer et al. (1999) ดังนี้ คำนวณค่าอัตราการกำจัดกลูโคสในเลือด (clearance rate; k ; %/min) โดยสมการดังนี้ $100 \times [(\log \text{glucose T15} - \log \text{glucose T45}) / (T45 - T15)]$ ระยะเวลาที่ระดับสูงสุดของน้ำตาลในเลือดลดลงครึ่งหนึ่ง ($T_{1/2}$; min) คำนวณจากสมการ $100 \times (0.693/k)$ และเวลาที่ความเข้มข้นของกลูโคสกลับเข้าสู่ค่าพื้นฐาน (T_{basal} ; min) คำนวณจาก $100 \times [(\log \text{peak glucose} - \log \text{basal glucose}) / k]$ คำนวณพื้นที่ใต้เส้นกราฟของระดับน้ำตาลและอินซูลินในเลือดที่เวลา 60 และ 120 นาที ด้วยวิธี trapezoidal method

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS[®] version 20 for window ข้อมูลปริมาณการกินได้ ความเข้มข้นของ VFA, lactate และ pH ในกระเพาะหมัก วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Analysis of variance (ANOVA) ด้วยวิธี Repeated measures analysis of variance ส่วนข้อมูลทางสรีรวิทยา ระดับน้ำตาลกลูโคส lactate และ LBP วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบด้วยวิธี Univariate test การเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับน้ำตาลกลูโคส lactate และ LBP ระหว่างวันที่ 3 และ 5 ของระยะการทดลองด้วยวิธี Student's paired t-test โดยข้อมูลทั้งหมด เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอตวานซีไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ อินซูลิน รีซีสแตนท์ การเกิดสภาวะก๊ิบอักเสบและโรคทางเมแทบอลิกในโครีดนม ภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

3.2.1 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการศึกษาแบบไปข้างหน้าเชิงพรรณนา (cohort study) โดยทำการศึกษาในฟาร์มโคนมขนาดกลาง ที่มีโคนมรีดนม ระหว่าง 20-50 ตัว จำนวน 5 ฟาร์ม โดยในแต่ละฟาร์มจะทำการสุ่มโคทรายที่คาดว่าจะคลอด ระหว่าง 7-10 วัน โดยทำการคำนวณจำนวนโคที่จะใช้ในการศึกษาจากค่าความชุกของการเกิดโรคทางเมแทบอลิกในแต่ละฟาร์ม ร้อยละ 50 (Theera et al., 2007) ซึ่งข้อมูลมีอำนาจจำแนกความแตกต่างได้อย่างถูกต้อง (power) ที่ระดับ ร้อยละ 80 และที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ดังนั้น ในแต่ละฟาร์มจะทำการสุ่มโคก่อนคลอด ร้อยละ 20 จากการสำรวจข้อมูลโคในฟาร์มโคนม อำเภอสรรคบุรี ในช่วงเดือน กรกฎาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2559 พบว่าเกษตรกรมีโคทราย

ที่คาดว่าจะคลอด ประมาณ 10 ตัวต่อเดือน ดังนั้น จำนวนโคที่ถูกสุ่มต่อฟาร์ม ประมาณ 2 ตัวต่อเดือน ทำการศึกษาระยะเวลา 3 เดือน ดังนั้นในแต่ละฟาร์มทำการสุ่มโคทราย ฟาร์มละ 6 ตัว โดยทำการศึกษาในฟาร์มโคนม จำนวน 5 ฟาร์ม รวมโคทรายที่ศึกษาทั้งสิ้น 30 ตัว ซึ่งฟาร์มโคนมที่สุ่มเลือกต้องมีการจัดการฟาร์มและการให้อาหารเหมือนกัน กล่าวคือมีการให้อาหารชั้นที่มีการเสริมข้าวโพดหมัก หรือหญ้าเนเปียร์สับ และกากมันสำปะหลัง ร่วมกับอาหารผสมสำเร็จ โดยให้กินตามสัดส่วนของการให้น้ำนมที่ 1 กิโลกรัมอาหารชั้นต่อผลผลิตน้ำนม 2 กิโลกรัม และให้กินฟางข้าวอย่างเต็มที่ ฟาร์มโคนมมีลักษณะการเลี้ยงแบบขังคอกและปล่อยอิสระภายในโรงเรือน โดยที่พื้นคอกมีลักษณะเป็นพื้นดินสลับกับพื้นคอนกรีต มีการรีดนม 2 ช่วงเวลา (เช้า-บ่าย) โดยเริ่มทำการศึกษาดังตั้งช่วงก่อนที่คาดว่าจะคลอด 7 วัน จนถึงหลังคลอด 30 วัน

3.2.2 อาหารและการให้อาหาร

โดยที่ฟาร์มโคนมที่ถูกสุ่มเลือกต้องมีการจัดการฟาร์มและการให้อาหารเหมือนกัน กล่าวคือมีการให้อาหารชั้นที่มีการเสริมข้าวโพดหมัก หรือหญ้าเนเปียร์สับ และกากมันสำปะหลัง ร่วมกับอาหารผสมสำเร็จ โดยให้กินตามสัดส่วนของการให้น้ำนมที่ 1 กิโลกรัมอาหารชั้นต่อผลผลิตน้ำนม 2 กิโลกรัม และให้กินฟางข้าวอย่างเต็มที่ ฟาร์มโคนมมีลักษณะการเลี้ยงแบบขังคอกและปล่อยอิสระภายในโรงเรือน โดยที่พื้นคอกมีลักษณะเป็นพื้นดินสลับกับพื้นคอนกรีต มีการรีดนม 2 ช่วงเวลา (เช้า-บ่าย)

3.2.3 การเก็บตัวอย่าง

การบันทึกข้อมูลโคทดลองรายตัว โดยบันทึก อายุ สายพันธุ์ ระยะการให้นม ปริมาณน้ำนมต่อวัน ประเมินความสมบูรณ์ของร่างกาย (BCS) ก่อนและหลังคลอด ทำการบันทึกปริมาณการกินอาหารตลอดระยะการศึกษา ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารชั้นและหยาดของโคทดลอง ช่วงก่อนและหลังคลอดของแต่ละฟาร์ม ทำการชั่งน้ำหนักอาหารและอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บในถุงพลาสติกเพื่อรอการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 0-30 วันหลังคลอด ทำการสังเกตอาการผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสภาวะก๊ีบอักเสบและเจ็บขาของโคทดลอง ทำการประเมิน locomotion score โดยการบันทึก VDO นอกจากนั้นยังทำการบันทึกปัญหาสุขภาพด้านเมแทบอลิกอื่นๆ ได้แก่ โรคคีโตซิส ภาวะรบกวน มดลูกอักเสบ กระเพาะแก่เคลื่อน และเต้านมอักเสบ บันทึกผล

ในวันที่ 7 ก่อนวันที่คาดว่าจะคลอด และวันที่ 14 และ 28 หลังคลอด ที่เวลา 0 ชั่วโมงก่อนการให้อาหารช่วงบ่าย ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดโคนหาง และแบ่งเลือด 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่เคลือบด้วย NaF จำนวน 1 หลอด และหลอดที่เคลือบสาร EDTA จำนวน 3 หลอด หลังจากนั้นนำหลอดตัวอย่างเลือดทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และทำการดูดพลาสมา ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก (Eppendorf) เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจความเข้มข้นของ glucose, insulin, NEFA, BHBA และ AGEs ต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง โดยทำการวิเคราะห์หัวตุ๋นแห้ง (DM) เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber; NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (acid-detergent fiber; ADF) และไขมัน (ether extract; EE) ตามวิธีการของ Van Soest et al. (1991) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง โดยทำการวิเคราะห์หัวตุ๋นแห้ง (DM) เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990) วิเคราะห์หาเยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral-detergent fiber; NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกรด (acid-detergent fiber; ADF) และไขมัน (ether extract; EE) ตามวิธีการของ Van Soest et al. (1991)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Glucose ด้วยวิธี Hexokinase ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (BS-400, Mindray Co., Ltd., Shenzhen, China) สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ insulin ด้วยวิธี Radioimmunoassay kit วิเคราะห์ความเข้มข้นของ NEFA และ BHBA ด้วยวิธี Enzymatic method โดยใช้ชุดทดสอบ Randox[®] ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Olympus AU-400 และวิเคราะห์ความเข้มข้นของ AGEs ด้วยชุดทดสอบ ELISA สำหรับ Nε-carboxymethyl lysine (CML) (OxiSelect™ HK503, Hycult[®] Biotechnology, Uden, the Netherlands) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 ด้วยเครื่อง Microplate Absorbance Reader (BIO- RAD[®] Laboratories, Inc, USA)

3.2.5 การคำนวณและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณอุบัติการณ์ของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องทางเมแทบอลิก โดยหาสัดส่วนของโคนมที่เกิดโรคต่อจำนวนโคนมทั้งหมดในช่วงเวลาที่ศึกษา ข้อมูลระดับน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน NEFA และ BHBA ในเลือด นำมาคำนวณหาค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ (Insulin sensitivity index, RQUICKI) ตามวิธีของ Holtenius and Holtenius (2007) ดังนี้ $RQUICKI = 1 \div [\log \text{glucose (mg/dl)} + \log \text{insulin (mU/ml)} + \log \text{NEFA (mmol/L)}]$ เปรียบเทียบความแตกต่างของปัจจัยทั้งหมดระหว่างกลุ่มโคที่พบอาหารโรคทางเมแทบอลิก กับกลุ่มที่ปกติด้วยวิธี Student's t-test ข้อมูลทั้งหมดทำการวิเคราะห์ multiple regression analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ของภาวะดื้อต่ออินซูลิน ต่อการเกิดสภาวะกีดกันและโรคทางเมแทบอลิก โดยกำหนดให้ดัชนี RQUICKI เป็นตัวแปรตาม และความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีน (CML) ระดับน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน ไตรกลีเซอไลต์ NEFA และ BHBA ในเลือด ระยะเวลาให้น้ำนม คะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย และภาวะโคที่พบโรคโคโรนาเป็น ตัวแปรอิสระ วิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ stepwise โดยพิจารณาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4

ผลการศึกษาและวิจารณ์

4.1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ อินซูลิน รีซิสแทนท์ และการเกิดสภาวะกีดกันไขมันในโคนมสาว

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1

4.1.1.1 องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณการกินได้วัตถุแห้ง

องค์ประกอบวัตถุแห้งและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แสดงในตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองทั้ง 2 กลุ่มพบว่าค่า DM, Ash และ CP ของอาหารทดลองทั้งสองกลุ่มมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) อยู่ที่ ร้อยละ 90.9 ± 0.71 , 8.3 ± 1.20 , 91.8 ± 1.20 และ 15.7 ± 0.64 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 วัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีอาหารทดลอง

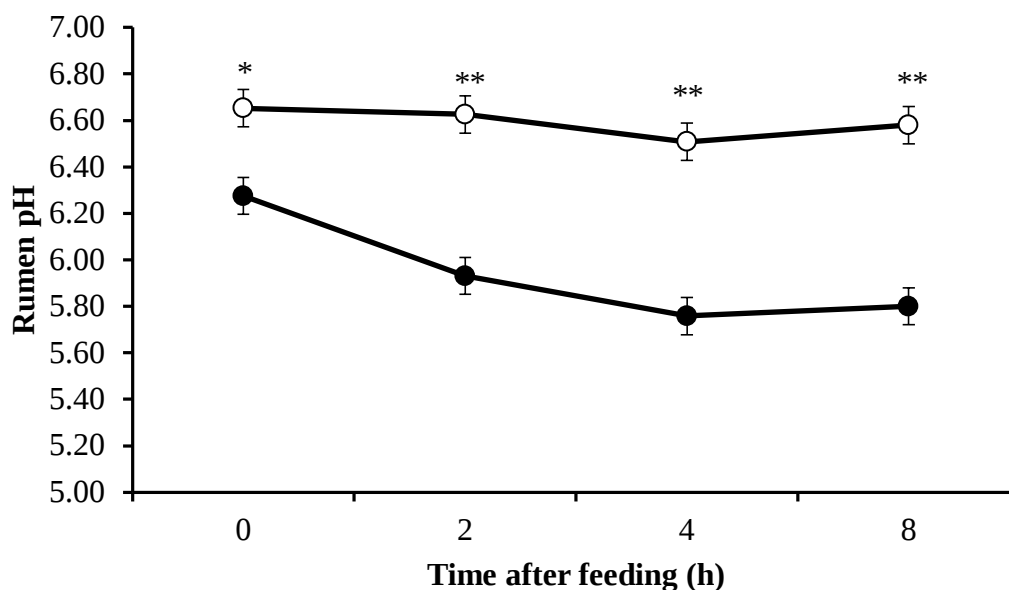
Item	Control	Treatment
Ingredient composition (% of DM)		
Rice straw	50.0	15.0
Cassava	13.0	48.0
Rice bran	10.0	10.0
Soybean meal	25.0	25.0
Premix	1.0	1.0
Urea	0.5	0.5
Sulphur	0.5	0.5
Analyzed composition (% of DM)		
DM	90.4	91.4
Ash	9.1	7.4
OM	90.9	92.6
CP	15.2	16.1
NDF	42.8	24.2
ADF	29.13	16.61
EE	0.2	0.02
NSC	32.8	52.3

Mineral premix consisted of (g per kg): 10 Mg; 6 Zn; 8 Mn; 10 Fe; 1.6 Cu; (mg per kg) 100 I; 20 Co; 60 Se; 2,000,000 IU vitamin A; 400,000 IU vitamin D; 3000 IU vitamin E (TS Dairy mix[®], Thailand). ³ NSC= (100 - crude ash - crude protein - NDF - EE)

องค์ประกอบของ NDF, ADF และ Ether extract พบว่าอาหารกลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละที่สูงกว่าอาหารกลุ่มทดลอง ในขณะที่ร้อยละองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural carbohydrate; NSC) ในอาหารกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม

4.1.1.2 ปริมาณการกินได้วัตถุแห้งและกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก

ในช่วงระยะ 4 วันของระยะการทดลองพบว่าโคสาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่าปริมาณการกินได้ของวัตถุแห้ง แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 9.9 และ 10.5 กิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) และในวันที่ 5 ของระยะการทดลองพบว่าโคสาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีปริมาณการกินได้เฉลี่ยที่ 5.4 ± 0.90 และ 5.2 ± 0.85 ตามลำดับ ในวันที่ 0 ของระยะการทดลอง ก่อนการให้วัตถุอาหารแห้ง ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักของโคทดลองทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.64$) โดยโคกลุ่มควบคุมมีค่า pH ในกระเพาะหมักที่ 6.76 และโคกลุ่มทดลองมีค่า pH ที่ 6.87 หลังจากการให้วัตถุอาหารแห้งที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักสูง โคกลุ่มควบคุมมีค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักอยู่ที่ 6.42 มากกว่าโคกลุ่มทดลองซึ่งอยู่ที่ 6.40 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.89$) ค่าเฉลี่ยของ pH ของของเหลวในกระเพาะหมัก พบว่าโคที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองมีค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในกระเพาะหมักตลอดทั้งวัน พบว่าโคที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองมีค่า pH ลดลงหลังการกินอาหารที่ชั่วโมง 2, 4 และ 8 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของ pH ของของเหลวในกระเพาะหมักของโคที่ได้รับอาหาร กลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) *, ** แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$ และ $P<0.01$ ตามลำดับ), Error bar หมายถึง standard error of the means

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ Total VFA, acetate, propionate, butyrate, lactic acid และความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ ชนิด methylglyoxal ในกระเพาะหมัก แสดงในตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาพบว่าโคที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ Total VFA, propionate, butyrate และ lactic acid สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ยกเว้นความเข้มข้นของ methylglyoxal ที่พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.272$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการกินได้ ค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมัก และความเข้มข้นของ Total VFA และ Lactic acid และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ ชนิด Methylglyoxal ในกระเพาะหมักโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารทดลองที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ 48

Measure	Control	Cassava based ration	SE	P-value
DMI, kg/day	9.9	10.5	0.13	0.215
Mean rumen pH	6.56	5.84	0.07	<0.001
Total VFA, mM	88.14	131.35	14.78	<0.001
Acetate	66.53	79.77	4.46	<0.001
Propionate	14.29	39.47	2.46	<0.001
Butyrate	7.28	12.10	1.65	<0.001
Lactic acid, mM	2.03	3.57	0.41	0.003
Methylglyoxal ($\mu\text{mol/mL}$) ^a	5.32	3.51	0.78	0.272

ค่าเฉลี่ย DMI คำนวณจากปริมาณการกินได้ของวันที่ 1-4 ของระยะทดลอง ค่าเฉลี่ยของ rumen pH และ Total VFA คำนวณจากค่าที่วัดได้ในชั่วโมงที่ 2, 4 และ 8 หลังการให้อาหาร

4.1.1.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส สารอินซูลิน และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ (methylglyoxal) ในพลาสมา

ในวันที่ 5 ของระยะการทดลอง ค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส สารอินซูลิน และสาร methylglyoxal ในพลาสมาโคสาวก่อนได้รับอาหารทดลอง มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคสาวกลุ่มควบคุม หลังจากโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักในสัดส่วนที่สูง มีผลทำให้ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับระดับความเข้มข้นของสารอินซูลินในพลาสมาพบว่ามีความเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และความเข้มข้นของ methylglyoxal ในพลาสมาพบว่าโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองมีความเข้มข้นสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน และ แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ ชนิด Methyglyoxal ในพลาสมาโคสาว ก่อนและหลังการได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารกลุ่มทดลอง ที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ 48

Measure	Cassava based		SE	P-value
	Control	ration		
Glucose (mmol/L)				
Before feeding	4.11	4.87	0.19	0.028
After feeding	4.11	5.13	0.21	0.010
Insulin (pmol/L)				
Before feeding	152.77	794.89	116.74	0.009
After feeding	198.59	981.55	186.57	0.024
Methylglyoxal (μmol/mL)				
Before feeding	0.52	1.22	0.18	0.005
After feeding	0.56	1.29	0.44	0.001

ค่าเฉลี่ยหลังให้อาหารคำนวณจากค่าที่วัดได้ในชั่วโมงที่ 2, 4 และ 8 หลังการให้อาหาร

4.1.1.4 ค่าทางสรีรวิทยาคะแนนของลักษณะอาการและภาวะกีบอึกเสบ

โคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารกลุ่มทดลองที่มีสัดส่วนของแป้งที่น้อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักในสัดส่วนที่สูง ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของ อุณหภูมิทวารหนัก อัตราการเต้นของหัวใจ การหายใจ และการบีบตัวของกระเพาะหมัก โดยพบว่า ค่าทางสรีรวิทยาอยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่วนค่าคะแนนอาการพบว่าโคกลุ่มทดลองทุกตัวมีค่าคะแนนของอาการ ระดับ 4 ซึ่งอาการมีลักษณะเหลว ในขณะที่โคกลุ่มควบคุมทุกตัวมีค่าคะแนนอาการที่ระดับ 3 นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าโคสาวที่ได้รับอาหารทดลอง แสดงอาการเจ็บกีบและมีลักษณะการยืนแบบสลับขาไปมา (weight shifting) ร้อยละ 60 (3/5) ในขณะที่โคกลุ่มควบคุมไม่พบอาการความผิดปกติ (ตารางที่ 4.4)

4.1.1.5 ค่าความทนทานต่อน้ำตาลในร่างกายโคและการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลิน

การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองหลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค แสดงดังภาพที่ 4.2 จากภาพพบว่าก่อนการฉีดน้ำตาลกลูโคส โคทั้งสองกลุ่มมีระดับน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างกัน ระดับน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงสุดที่เวลา 5 นาทีหลังจากฉีดกลูโคส โดยพบว่าโคกลุ่มทดลองมีค่าระดับกลูโคสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มทดลอง โดยที่โคกลุ่มทดลองมีอัตราการลดลงของกลูโคสสูงกว่าโคควบคุม อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ 120 นาที หลัง

การฉีดน้ำตาลกลูโคส พบว่าโคกลุ่มควบคุมมีระดับน้ำตาลสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มทดลอง

ตารางที่ 4.4 เปรียบการตอบสนอง ค่าสรีรวิทยา การบีบตัวของกระเพาะหมัก คะแนนลักษณะอุจจาระ และการแสดงอาการกีบอักเสบ ในโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารกลุ่มทดลอง ที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักในสัดส่วนร้อยละ 48

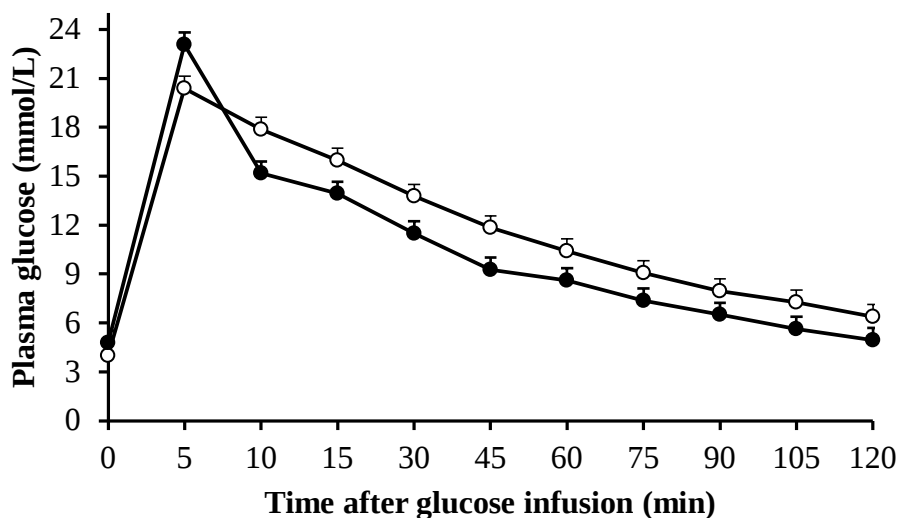
Item	Control	Treatment	SE	P-value
Rectal temperature, °F	101.6	101.4	0.41	0.998
Heart rate, /min	94.9	99.9	6.87	0.476
Respiration rate, /min	52.8	55.4	8.25	0.756
Rumen contraction /5 min	7.1	7.4	0.46	0.575
Feces score	3 (5/5)	4 (5/5)	-	-
Laminitis (%)	0 (0/5)	60 (3/5)	-	-

4.1.1.6 ค่าความทนทานต่อน้ำตาลในร่างกายโคและการตอบสนองของฮอร์โมน

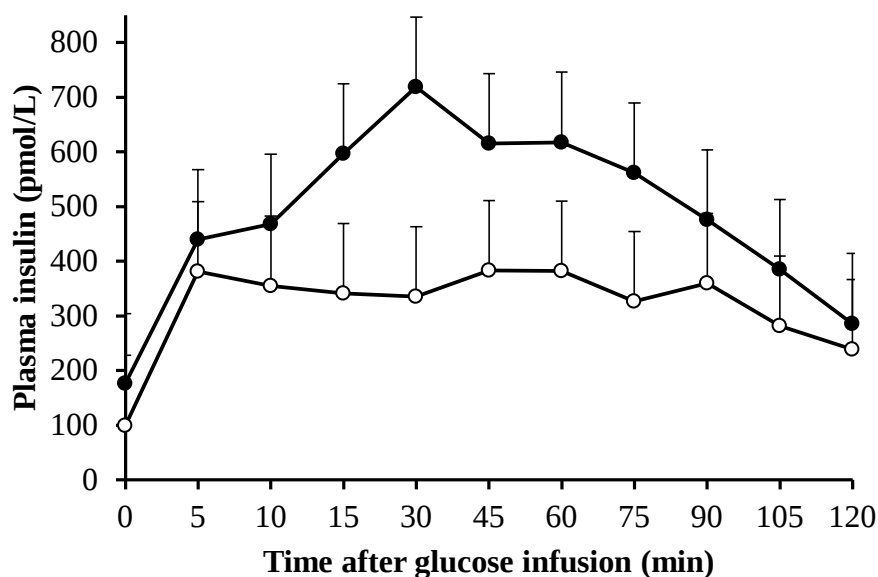
อินซูลิน

การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองหลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค แสดงดังภาพที่ 4.2 จากภาพพบว่าก่อนการฉีดน้ำตาลกลูโคส โคทั้งสองกลุ่มมีระดับน้ำตาลกลูโคสไม่แตกต่างกัน ระดับน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงสุดที่เวลา 5 นาทีหลังจากฉีดกลูโคส โดยพบว่าโคกลุ่มทดลองมีค่าระดับกลูโคสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มทดลอง โดยที่โคกลุ่มทดลองมีอัตราการลดลงของกลูโคสสูงกว่าโคควบคุม อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ 120 นาที หลังการฉีดน้ำตาลกลูโคส พบว่าโคกลุ่มควบคุมมีระดับน้ำตาลสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มทดลอง

การตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของโคสาวที่ได้ รับอาหารกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง หลังการฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค แสดงดังภาพที่ 4.3 จากภาพพบว่าก่อนการฉีดน้ำตาลกลูโคส โคกลุ่มทดลองมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนอินซูลินสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม หลังจากฉีดกลูโคสพบว่าระดับฮอร์โมนอินซูลินทั้งสองพบว่าเพิ่มสูงขึ้น โดยที่โคกลุ่มทดลองมีค่าระดับอินซูลินเพิ่มสูงสุดที่เวลา 30 นาทีหลังการฉีดกลูโคส แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม และโคกลุ่มทดลองมีอัตราการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าโคควบคุม



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) หลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค, P-value time <0.01, P-value treatment =0.116, P-value Time*treatment=0.055, Error bar หมายถึง standard error of the means



ภาพที่ 4.3 การตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินของโคที่ได้รับอาหาร กลุ่มควบคุม (○) และกลุ่มทดลอง (●) หลังฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าเส้นเลือด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักโค, P-value time <0.01, P-value treatment =0.141, P-value Time*treatment=0.330, Error bar หมายถึง standard error of the means

ผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักสูงต่อค่าความสามารถของร่างกายโคในการใช้น้ำตาลโดยการวัดความทนทานต่อน้ำตาลในร่างกายโคและการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลิน แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าค่าเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส (Basal glucose) ของโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลอง มีค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.008$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารควบคุม โดยที่อัตราการขจัดน้ำตาลในเลือด (glucose clearance rate) ของโคสาวกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.025$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม โคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงครึ่งหนึ่งจากระดับสูงสุด ($T_{1/2}$) และระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงสู่ระดับเริ่มต้น ($\text{Time}_{\text{basal}}$) สั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.034$ และ $P=0.041$ ตามลำดับ) พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลในเลือดพบว่าโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งที่เวลา 60 และ 120 นาที หลังการทดสอบ ($P=0.036$ และ $P=0.034$ ตามลำดับ)

การตอบสนองของสารอินซูลินต่ออาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายในกระเพาะหมักเร็ว พบว่าค่าความเข้มข้นของอินซูลินเริ่มต้น (Basal insulin) ในโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลอง มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.04$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามระดับอินซูลินสูงสุด และผลต่างระหว่างค่าอินซูลินสูงสุดและต่ำสุดของโคทดลองทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.177$ และ $P=0.244$ ตามลำดับ) สอดคล้องกับพื้นที่ใต้กราฟของอินซูลินทั้งที่เวลา 60 และ 120 นาที หลังการทดสอบ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.121$ และ $P=0.137$ ตามลำดับ) ค่าการดื้อต่ออินซูลิน (HOMA insulin resistance) พบว่าโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าการดื้อต่ออินซูลินสูงกว่าโคกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.041$) ในขณะที่ค่าความไวต่อการตอบสนองต่ออินซูลิน (%S) โคกลุ่มทดลองมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.02$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มทดลอง (ตารางที่ 4.5)

ผลการวิเคราะห์ Spearman rank-order correlation coefficients ของข้อมูล คะแนนภาวะกิบอัสเสบ ระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และ Methylglyoxal ในพลาสมา และระดับความเข้มข้นของ VFA และ lactic acid ของของเหลวในกระเพาะหมักในวันที่ 5 ของโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแสดงในตารางที่ 4.6 คะแนนภาวะกิบอัสเสบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินในเลือด โดยพบว่าเมื่อระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินเพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ ($R^2=0.59$) กับการเกิดภาวะกิบอัสเสบในโคทดลองที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งสูง (ภาพที่ 4.4) และมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของ VFA ของของเหลวในกระเพาะหมัก ในขณะที่ methylglyoxal มีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของกรด lactic แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับคะแนนภาวะกิบอัสเสบ ระดับความเข้มข้นของ VFA ของของเหลวในกระเพาะหมักมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฮอร์โมนอินซูลินและกรด lactic

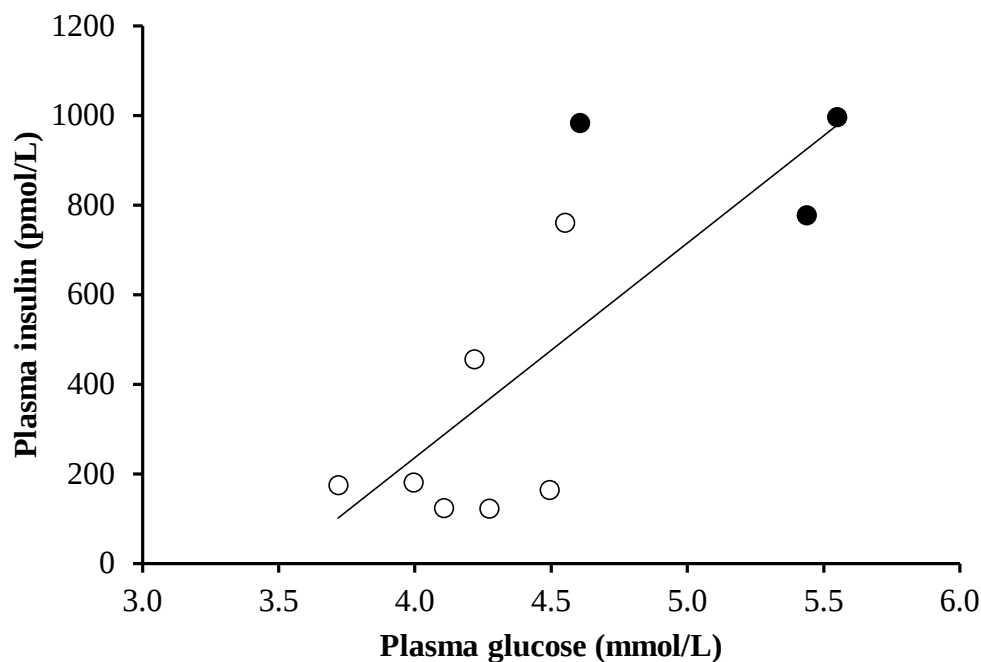
ตารางที่ 4.5 เปรียบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด (Intravenous Glucose Tolerance Test) ในโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารทดลองที่มีแป้งมันสำปะหลังบดในสัดส่วนร้อยละ 48

	Control	Treatment	SE	P-value
Basal glucose (mmol/L)	3.9	4.8	0.23	0.008
Glucose clearance rate (%min)	0.4	0.6	0.06	0.025
T _{1/2}	164.5	118.3	18.05	0.034
T _{basal} (min)	170.3	112.1	23.88	0.041
AUC glucose mmol/L)				
Time 5-60 min (/55 min)	761.9	648.6	45.20	0.036
Time 5-120 min (/115 min)	1252.9	1043.0	82.41	0.034
Basal insulin (pmol/L)	99.6	176.1	31.38	0.041
Insulin peak-basal (pmol/L)	452.1	652.1	159.04	0.244
AUC insulin (mmol/L)				
Time 5-60 min (/55 min)	19789.6	34060.0	8493.45	0.121
Time 5-120 min (/115 min)	38963.7	62184.8	1394.42	0.137
HOMA-Insulin resistance	1.7	3.1	0.57	0.041
Insulin sensitivity (%)	59.6	36.4	7.949	0.020
T _{1/2} ระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงครึ่งหนึ่งจากระดับสูงสุด				
T _{basal} ระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงสู่ระดับเริ่มต้น				
AUC พื้นที่ใต้กราฟ				

ตารางที่ 4.6 Spearman rank-order correlation coefficients ของข้อมูล คะแนนภาวะกีบอักเสบ ระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และ Methylglyoxal ในพลาสมา และระดับความเข้มข้นของ VFA และ lactic acid ในของเหลวในกระเพาะหมักในวันที่ 5 ของโคที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม (n=5) และกลุ่มทดลอง (n=5)

	Glucose	Methylglyoxal	VFA	Lactic	Insulin
Laminitis score	0.789**	-0.114	0.646*	0.418	0.789**
Insulin	0.770*	0.322	0.758*	0.721*	
Lactic	0.721	0.648*	0.782**		
VFA	0.624	0.261			
Methylglyoxal	0.127				

*P<0.05, **P<0.01



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินของโคสาวที่เกิดภาวะกีดอัส (●) และโคทดลองที่ไม่เกิดภาวะกีดอัส (○) $Y=479.46X-1681.6$, $R^2=0.59$, $P\text{-value}<0.01$

4.1.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาที่โดดเด่นในครั้งนี้อาจยืนยันสมมติฐานได้ว่าโคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของไขมันสูง (ร้อยละ 48) ในสูตรอาหาร ส่งผลให้เกิดกระบวนการหมักย่อยอาหารเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid) และกรดแลคติกเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากการได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่สูงส่งผลกระตุ้นกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะหมักเพิ่มขึ้น ประกอบกับแป้งสูงสามารถย่อยสลายในกระเพาะหมักได้เร็ว (ฤทธิ์ช่วยพลาไซ, 2557) ส่งผลให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดไขมันระเหยง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดโพรพิโอนิก ที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารกลุ่มควบคุมที่มีสัดส่วนของไขมันต่ำ ร้อยละ 13 ถึงแม้ว่าค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกในกระเพาะโคสาวที่ได้รับอาหารทดลองจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (3.8 vs 2.3 mM) อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกยังอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าภาวะที่เกิด metabolic acidosis ที่พบค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกมากกว่า 48 mM (Brown et al., 2000) ซึ่งกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดโพรพิโอนิกในกระเพาะหมัก (Nocek, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มโคสาวที่ได้รับอาหารทดลองเปรียบเทียบกับโคสาวกลุ่มควบคุม (38.3 vs 18.1 mM)

การศึกษานี้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมักของโคกลุ่มทดลอง มีค่าลดลงต่ำกว่า 5.8 ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ค่าปกติ (pH 6.5-7.0) ที่จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักสามารถทำหน้าที่หมักย่อยได้เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่าภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก เป็นภาวะที่มีการสะสมของกรดในกระเพาะหมักมากเกินไป และการขาดสมดุลของบัฟเฟอร์ ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะหมัก

ต่ำกว่า 5.6 เป็นระยะเวลานาน (มากกว่า 180 นาทีต่อวัน) มีผลต่อการทำหน้าที่ของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก และสุขภาพโค (Gozho et al., 2005) อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้ ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก โดยการสอดท่อผ่านช่องปาก และหลอดอาหาร ซึ่งของเหลวที่ดูดเก็บได้มีการปนเปื้อนกับน้ำลายทำให้ค่า pH สูงกว่าการวัดในตำแหน่งปกติ (ventral sac ของกระเพาะหมัก) โดยทั่วไปค่า pH ของของเหลวในกระเพาะหมักที่ดูดเก็บด้วยวิธีนี้จะมีความสูงว่าการดูดเก็บจากกระเพาะหมักโดยตรงด้วยวิธี rumenocentesis ประมาณ 0.33 – 0.35 (Duffield et al., 2004) ซึ่งจากกระบวนการเก็บตัวอย่างผู้วิจัยได้หาค่า pH ส่วนที่สองของของเหลวที่เก็บได้เพื่อลดการปนเปื้อนของน้ำลาย Enemark et al. (2004) แนะนำว่าภาวะกรดในกระเพาะหมักชนิดกึ่งเฉียบพลัน เป็นภาวะที่ค่า pH ในกระเพาะหมักลดลงอยู่ระหว่าง 6.0-5.8 เมื่อวัดจากของเหลวในกระเพาะหมักที่เก็บด้วยวิธี stomach tube

ดังนั้นจากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าโคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 48 ในสูตรอาหาร สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักแบบไม่รุนแรง (subacute rumen acidosis, SARA) สอดคล้องกับการศึกษาของ Pilachai et al. (2012) พบว่าโคที่กินอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังในสูตรอาหารร้อยละ 40 ส่งผลให้เกิดค่า pH ลดลงกว่า 5.6 ซึ่งอยู่ในภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมัก และสอดคล้องกับรายงานของ Pilachai et al. (2014) พบว่าการให้อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 46.3 ร่วมกับมีสัดส่วนของฟางข้าวเพียง 1.5 กก.ต่อวัน ส่งผลให้ค่า pH ลดลงน้อยกว่า 5.0 โดยที่การศึกษาของ Pilachai et al. (2012, 2014) เป็นการวัดค่า pH โดยตรงที่ตำแหน่ง ventral sac ของกระเพาะหมักทำให้ได้ค่า pH ต่ำกว่าค่า pH ที่วัดได้จากการศึกษารังนี้

การศึกษารังนี้พบว่าทั้งในวันที่ 3 และ 5 ของระยะการทดลอง ความเข้มข้นของทั้งน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนสารอินซูลินของโคกลุ่มทดลอง ที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลัง ในสัดส่วนที่สูง มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคสาวที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องมาจากโคสาวมีการหมักย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยสลายได้เร็วในกระเพาะหมักในปริมาณที่สูง ส่งผลให้เพิ่มการผลิตกรดไพรูวิกอินิกมากขึ้น หลังจากดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด กรดไพรูวิกอินิกถูกนำไปสังเคราะห์เป็นน้ำตาลกลูโคส ผ่านกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ที่ตับ ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น และมีผลกระตุ้นการหลั่งสารอินซูลินจากตับอ่อน เพื่อดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้นทำให้ความเข้มข้นของทั้งกลูโคสและอินซูลินเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

โคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง มีค่าความเข้มข้นของสาร methylglyoxal ในพลาสมาสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคสาวกลุ่มควบคุม เนื่องจาก ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลที่สูงและไม่สามารถกลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ จากกระบวนการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ โดยฮอร์โมนอินซูลิน เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานเนื้อเยื่อต่างๆ และอาจจากสาเหตุของการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินบกพร่องทำให้ร่างกายไม่สามารถจัดปฏิกิริยา Maillard ได้อย่างสมดุลและเกิดการผลิตสาร methylglyoxal มากเกินไป เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า methylglyoxal เป็นสารอินเทอร์มีเดียตของแอดวานซ์ไกลเคชัน เอ็นโดโปรตีนส์ ที่เกิดจากปฏิกิริยาการจับตัวของหมู่ carbonyl group ของน้ำตาลกับกรดอะมิโนของ

ปฏิกิริยา (Maillard reaction) ได้สารประกอบ Carbonyl-amine ที่มีลักษณะสีน้ำตาล หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชันได้เป็นสาร amine (Shiff's base) และมีการเรียงตัวใหม่ได้เป็นสารอินเทอร์มีเดียของปฏิกิริยา Maillard ที่เรียกว่า Amadori products เช่น Aldoseamine ซึ่งสารกลุ่มนี้จะเปลี่ยนเป็นสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ต่อไป นอกจากนี้ในช่วงการเกิดปฏิกิริยา Maillard ยังเกิดการสร้างสารอินเทอร์มีเดียของน้ำตาลกลูโคสกลุ่ม glyoxal, methylglyoxal และ 3-deoxyglucosone ซึ่งสารกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ ชนิดต่างๆ โดย methylglyoxal ถูกเปลี่ยนไปเป็น AGE ชนิด N-(carboxyethyl) lysine (CEL), methylglyoxal-derived lysyl dimer (MOLD), argpyrimidine หรือ methylglyoxal-derived hydroimidazolone MG-H1 (Thornalley, 1990)

การศึกษาครั้งนี้โคที่รับประทานอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูงมีผลการทดสอบการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสปกติในเลือดโคนม พบว่าอยู่ระหว่าง 1.9-3.4 mmol/L จากผลการศึกษาพบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินก่อนการทดสอบ IVGTT ของโคกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าสูงกว่าโคกลุ่มควบคุม โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในโคกลุ่มทดลอง (4.8 mmol/L) มีค่าที่สูงกว่าระดับปกติ ซึ่งได้อธิบายแล้วข้างต้น กล่าวคือเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรดไพรูวิกจากกระบวนการหมักย่อยแป้งมันสำปะหลังในสูตรอาหารที่สูงขึ้น มีผลต่อการสังเคราะห์น้ำตาลกลูโคสที่ตับเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาสมาดุลของระดับน้ำตาลกลูโคสให้อยู่ในระดับปกติ ความเข้มข้นของอินซูลินที่สูงมีผลต่ออัตราการขจัดน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ระยะเวลา $T_{1/2}$ และระดับของ T_{basal} มีค่าที่สั้นกว่าในโคกลุ่มทดลอง ส่งผลต่อพื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลกลูโคสของโคกลุ่มทดลองต่ำกว่าโคกลุ่มควบคุม นอกจากระดับฮอร์โมนอินซูลินก่อนการทดสอบที่พบว่าโคกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแล้ว การตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อการทดสอบ IVGTT ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตจากค่าความแปรปรวนของค่าอินซูลินและพื้นที่ใต้กราฟของทั้งสองกลุ่มมีค่าที่สูง ซึ่งส่งผลต่อความสำคัญทางสถิติ โดยโคกลุ่มทดลองมีแนวโน้มของพื้นที่ใต้กราฟที่สูงกว่าโคกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาที่โดดเด่นอีกอย่างหนึ่งของการศึกษานี้คือ โคกลุ่มทดลองมีค่า HOMA อินซูลิน รีซิสแตนท์ เพิ่มขึ้น และค่าการตอบสนองของอินซูลินลดลง (ตารางที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุมซึ่งอาจเนื่องจาก ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง ตับอ่อนมีการทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่งอินซูลิน ซึ่งในระยะแรกตับอ่อนสามารถชดเชยได้ โดยมีการหลั่งอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น แต่ในระยะยาวเมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน ส่งผลทำให้การทำงานของตับอ่อนเสียไป และลดการหลั่งอินซูลิน ประกอบกับเนื้อเยื่อไม่มีตัวรับอินซูลิน ทำให้ไม่สามารถดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เรียกว่า ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งภาวะนี้ส่งผลต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดตามมา (Opsomer et al., 1999, Leiva et al., 2014) นอกจากนี้ภาวะอินซูลินในกระแสเลือดสูง (hyperinsulinemia) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยการลดการตอบสนองของ

ตัวรับอินซูลินภายในเซลล์ ทำให้ไม่สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลและอินซูลินในเลือดสูง

ผลการศึกษานี้เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเนื่องจากโคสาวกลุ่มทดลอง 3 ใน 5 ตัว แสดงอาการเจ็บตับ โดยมีคะแนนของการยื่นสลับขา (weight shifting) และการอักเสบของบริเวณ coronary band ที่ชัดเจน โคมีอาการเดินเจ็บขาเล็กน้อย โดยพบอาการความผิดปกติตั้งแต่วันที่ 3-5 ของระยะการทดลอง และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคะแนนภาวะกีบอักเสบ ระดับน้ำตาลกลูโคส ฮอร์โมนอินซูลิน และ methylglyoxal ในพลาสมา และระดับความเข้มข้นของ VFA และ lactic acid ในของเหลวในกระเพาะหมัก ด้วยวิธี Spearman rank-order correlation coefficients พบว่า ระดับน้ำตาลในเลือด ความเข้มข้นของฮอร์โมนอินซูลินและ ความเข้มข้นของ VFA มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับคะแนนภาวะกีบอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินพบว่าโคที่มีภาวะกีบอักเสบมีค่าระดับกลูโคสและฮอร์โมนอินซูลินในระดับสูง (ภาพที่ 4.6) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของการเกิดกีบอักเสบเนื่องจากภาวะอินซูลินสูง ตามกลไกการเกิดกีบอักเสบเนื่องจาก

ภาวะความเข้มข้นของอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia) และภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ มีรายงานว่ามีส่วนต่อการเกิดภาวะกีบอักเสบในม้า นอกจากนั้นการศึกษาของ De Laat et al. (2012) ที่เชื่อว่าการเกิดของสาร แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะกีบอักเสบในม้า เช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานยืนยันที่ชัดเจนเกี่ยวกับการเกิดในโค อย่างไรก็ตามจากพยาธิวิทยาการเกิดกีบอักเสบทั้งในโคและม้ามีความใกล้เคียงกันอย่างมาก โดยพบว่าม้าที่ได้รับอาหารชั้นในปริมาณสูง มีผลให้เกิดภาวะความเป็นกรดในลำไส้ และปลดปล่อยสารแอลพีเอสและกระตุ้นสารสื่อการอักเสบ เช่นเดียวกับในโค ประกอบกับจากการศึกษาการฉีดแอลพีเอสเข้ากระแสเลือดเพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการเกิดภาวะกีบอักเสบทั้งในม้าและโค แต่พบว่าม้าที่ได้รับอาหารชั้นสูงร่วมกับการฉีดแอลพีเอส สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกีบอักเสบได้ นอกจากนั้นยังพบว่าการฉีดอินซูลินเข้ากระแสเลือดในม้ามีผลเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกีบอักเสบได้เช่นกัน จากการศึกษาในหนูทดลองพบว่า ในภาวะที่มีอินซูลินในเลือดสูง ส่งผลต่อการกระตุ้นการหลั่งสารสื่อการอักเสบจากแมโครฟาส เช่นเดียวกับสารแอลพีเอส ซึ่งสารสื่อการอักเสบที่สำคัญ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน 1 และ 6 และทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ อัลฟา ส่งผลให้เกิดภาวะการขาดความสมดุลของสารไนตริกออกไซด์ ในหลอดเลือดที่ชั้นคอร์เรียมของผนังกีบ ส่งผลให้การทำหน้าที่ของหลอดเลือดเสียไป ทำให้ผนังหลอดเลือดอักเสบและเสื่อมสลาย

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ผลกระทบของภาวะน้ำตาลและอินซูลินในเลือดสูงต่อการเกิดภาวะกีบอักเสบโดยการศึกษา สารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ ชนิดอื่นๆ และสารสื่อการอักเสบที่สำคัญ ได้แก่ อินเตอร์ลิวคิน 1 และ 6 และทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ อัลฟา เพิ่มเติม

4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอตวานซีไกลเคชั่นเอ็นโปรดิกส์ ดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแทนท์ การเกิดสภาวะกีดกันและโรคทางเมแทบอลิกในโครีดนม ภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

4.2.1 ผลการทดลองที่ 2

4.2.1.1 คุณสมบัติโคทดลองและอุบัติการณ์การเกิดโรคทางเมแทบอลิก

การศึกษานี้ ทำการศึกษาโคนมในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี จำนวน 2 ฟาร์ม และจังหวัดขอนแก่น จำนวน 3 ฟาร์ม โดยแม่โคที่ถูกสุ่มทั้ง 30 ตัว มีสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน เฉลี่ย ($\pm$ SD) ร้อยละ 90.39 ± 3.64 และมีช่วงแห่งความเชื่อมั่น ระหว่าง 88.52 – 92.27 มีระยะการให้น้ำนมเฉลี่ย 3.29 ± 0.85 มีช่วงแห่งความเชื่อมั่น ระหว่าง 2.86 – 3.73 ปริมาณน้ำนมของแม่โค ณ สัปดาห์ที่ 4 หลังคลอด เฉลี่ย 21.82 ± 3.99 กิโลกรัมต่อวัน ค่าเฉลี่ยคะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย (BCS) พบว่าแม่โคมีค่าเฉลี่ย BCS ในช่วงก่อนคลอด หลังคลอด 14 วัน และหลังคลอด 28 วัน เท่ากับ 3.56 ± 0.63 , 2.77 ± 0.62 , 2.50 ± 0.43 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยคะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย และค่าช่วงแห่งความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โคทดลองจำนวน 30 ตัว

ระยะเวลาการคลอดลูก	ค่าเฉลี่ยคะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย ($\pm$ SD)	95% confidence interval
ก่อนคลอด	3.56 ± 0.63	3.23 - 3.88
หลังคลอด 14 วัน	2.77 ± 0.62	2.45 - 3.08
หลังคลอด 28 วัน	2.50 ± 0.43	2.28 - 2.72

เมื่อจำแนกความถี่ของคะแนน BCS ในแต่ละระยะการคลอด พบว่าแม่โคก่อนคลอด มีค่าร้อยละ ความถี่ของคะแนน BCS ที่ระดับ 3.0 สูงสุด รองลงมาค่า BCS ที่ระดับคะแนนระดับ 4.5 แม่โคหลังคลอด 14 วัน พบว่ามีค่าร้อยละความถี่ของคะแนน BCS ที่ระดับ 3.5 และค่า BCS ที่ระดับคะแนน 2.0 สูงที่สุด ในขณะที่แม่โคหลังคลอด 28 วัน พบค่าร้อยละความถี่คะแนน BCS ที่ระดับ 3.0 และค่า BCS ที่ระดับ 2.0 สูงที่สุด ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ร้อยละคะแนนความสมบูรณ์ร่างกายจำแนกตามระดับคะแนน 1-5 ของโคทดลองจำนวน 30 ตัว

ระยะเวลาการคลอดลูก	คะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย (ร้อยละ)					
	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
ก่อนคลอด	0	0	47.10	17.60	11.80	23.50
หลังคลอด 14 วัน	29.40	17.60	23.50	29.40	0	0
หลังคลอด 28 วัน	35.30	29.40	35.30	0	0	0

แม่โคหลังคลอดตั้งแต่ 0-30 วัน พบอุบัติการณ์กับอ๊กเสบและเจ็บขา ร้อยละ 9.01 และพบอุบัติการณ์ ภาวะโรคทางเมแทบอลิก ดังนี้ โรคคีโตซีส ภาวะขาดสมดุลพลังงาน ภาวะรบกวน/มดลูกอ๊กเสบ และกระเพาะทะลุเคลื่อน ร้อยละ 22.73, 4.55, 13.64, 9.01 และ 4.55 ตามลำดับ โดยพบการเกิดโรคในช่วงระยะเวลาหลังคลอด 14 วันมากที่สุด

4.2.1.2 อาหารและการให้อาหาร

การจัดการการให้อาหารของทั้ง 5 ฟาร์ม พบว่าเกษตรกรมีการให้อาหารที่มีความหลากหลายทั้งรูปแบบการให้อาหารและวัตถุดิบ โดยพบว่ามี 4 ฟาร์ม ที่มีการผสมอาหารระหว่างอาหารข้น วัตถุดิบอาหารและหญ้า ก่อนการให้โคกินและมีการจัดหาฟางข้าวให้กินอย่างอิสระ ซึ่งมีเพียง 1 ฟาร์ม เท่านั้นที่มีระบบการแยกจ่ายอาหารระหว่างอาหารข้นและอาหารหยาบ วัตถุดิบอาหารสัตว์ส่วนใหญ่นิยมใช้ กากถั่วเหลือง กากเปียร์ กากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และบางส่วนเป็นเศษเหลือทางการเกษตร เช่น กากมันสำปะหลัง เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า เกษตรกรนิยมให้อาหารตามปริมาณน้ำนม โดยมีการเพิ่มกากถั่วเหลืองให้กับโคคลอดใหม่และมีปริมาณน้ำนมสูง องค์ประกอบทางโภชนาพบว่าอาหารทั้ง 5 ฟาร์ม มีองค์ประกอบโปรตีน ระหว่างร้อยละ 11.22-15.06 มีเยื่อใย NDF ระหว่าง ร้อยละ 32.82-36.94 (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ลักษณะอาหาร วัตถุดิบอาหารสัตว์และคุณค่าทางโภชนา

ฟาร์ม	ลักษณะการให้อาหาร (%DM)	DM	Ash	CP	NDF	ADF	EE
1	ผสมอาหารข้น+หญ้าเนเปียร์	95.35	5.80	11.22	32.90	30.44	3.18
2	แยกอาหารข้นและอาหารหยาบ	96.53	5.49	12.62	36.94	23.21	1.83
3	ผสมอาหารข้น+หญ้าเนเปียร์	96.33	6.16	12.33	36.33	29.84	3.19
4	ผสมอาหารข้น+หญ้าเนเปียร์+กากมัน+กากเปียร์	96.83	8.62	15.06	34.08	16.67	4.31
5	ผสมกากถั่วเหลือง+หญ้าเนเปียร์+กากมัน+กากเปียร์	96.25	5.67	14.71	32.82	18.67	3.51
คุณค่าทางโภชนาวัตถุดิบอาหารสัตว์ (%DM)							
	กากถั่วเหลือง	96.09	5.28	38.57	18.03	22.89	1.39
	กากเปียร์	96.12	3.75	19.84	66.60	26.51	8.88
	กากมันสำปะหลัง	96.86	5.56	1.84	27.40	39.78	0.31
	หญ้าเนเปียร์	95.27	4.92	6.32	59.62	27.53	1.08

4.2.1.3 ค่าดัชนีอินซูลิน รีชีสแตนท์ (RQUICK) ความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโปรตีนส์ และสารเมแทโบไลต์ในเลือดโคนมก่อนและหลังการคลอดลูก

ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาหลังคลอดมีผลต่อค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ ($P=0.027$) โดย โคนมหลังคลอด 14 วัน มีค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ ต่ำสุด (1.02 ± 0.10) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ ของ โคนมก่อน และหลังคลอด 28 วัน (1.53 ± 0.22 และ 1.63 ± 0.37 ตามลำดับ) ความเข้มข้นของ

แอตวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ ชนิด CML พบว่าโคนมหลังคลอด 28 วัน มีค่าความเข้มข้นของ CML ต่ำสุด ($P=0.017$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคนมก่อนและหลังคลอด 14 วัน ค่าความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคส อินซูลิน ไตรกลีเซอไลต์ NEFA และ สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรทในเลือด พบว่าระยะเวลาหลังคลอดมีผลต่อค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไลต์ NEFA และ สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรทในเลือด ($P<0.01$) โดย โคนมหลังคลอด 14 วัน มีค่าความเข้มข้นของ NEFA และ สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรทสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคนมก่อน และหลังคลอด 28 วัน ในขณะที่ช่วงระยะเวลาหลังการคลอดไม่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคส และอินซูลินในเลือด

4.2.1.4 การเปรียบเทียบค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ความเข้มข้นของสารแอตวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ และสารเมแทโบไลต์ในเลือดของโคนมที่เกิดภาวะคีโตซิส

ผลการศึกษาพบโคแสดงอาการของโรคคีโตซิส ในช่วง 14 วันหลังคลอดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ความเข้มข้นของ CML และสารเมแทโบไลต์ในเลือดในช่วงนี้ พบว่าโคนม กลุ่มที่เกิดโรคคีโตซิส มีค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ต่ำกว่า โคกลุ่มที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.008$) ในขณะที่ความเข้มข้นของ CML ไม่มีความแตกต่างกัน ความเข้มข้นของ NEFA และสารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรทในเลือดของโคนมกลุ่มโรคคีโตซิส มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มปกติ ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาล กลูโคส และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของโคนมกลุ่มโรคคีโตซิส มีแนวโน้มต่ำกว่า ($P=0.051$ และ $P=0.052$) โคกลุ่มปกติ แต่ความเข้มข้นของอินซูลินมีแนวโน้ม ($P=0.051$) สูงกว่ากลุ่มโคปกติ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ (RQUICK) ความเข้มข้นของสารแอตวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ (CML) และสารเมแทโบไลต์ในเลือดของโคนมที่เกิดภาวะคีโตซิส

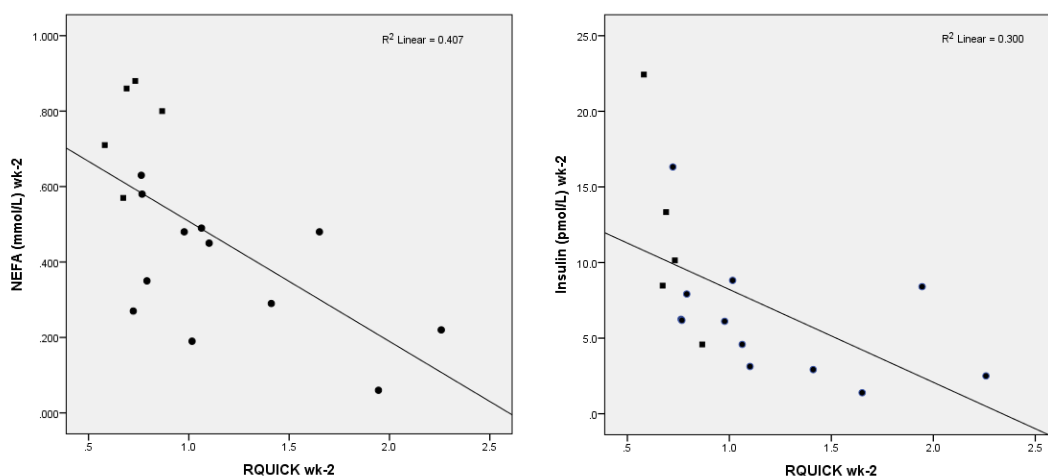
	กลุ่มปกติ (control) (n=20)	กลุ่มโรคคีโตซิส (n=5)	P-value
RQUICK			
ก่อนคลอด	1.86 ± 1.27	0.96 ± 0.34	0.073
หลังคลอด 14 วัน	1.21 ± 0.51	0.71 ± 0.1	0.008
หลังคลอด 28 วัน	1.78 ± 1.68	1.83 ± 2.80	0.058
CML (μmol/L)			
ก่อนคลอด	2.47 ± 0.69	1.28 ± 0.58	0.013
หลังคลอด 14 วัน	2.51 ± 0.82	2.19 ± 0.83	0.267
หลังคลอด 28 วัน	1.75 ± 0.87	1.41 ± 0.83	0.526
NEFA (mmol/L)			
ก่อนคลอด	0.19 ± 0.164	0.17 ± 0.11	0.874
หลังคลอด 14 วัน	0.37 ± 0.17	0.76 ± 0.13	0.003

หลังคลอด 28 วัน	0.23 ± 0.11	0.42 ± 0.44	0.473
ตารางที่ 4.10 (ต่อ)			
	กลุ่มปกติ (control) (n=20)	กลุ่มโรคคีโตซีส (n=5)	P-value
BHBA (mmol/L)			
ก่อนคลอด	0.23 ± 0.08	0.19 ± 0.10	0.427
หลังคลอด 14 วัน	0.57 ± 0.21	2.40 ± 0.75	0.002
หลังคลอด 28 วัน	0.48 ± 0.12	1.42 ± 1.18	0.008
Glucose (mmol/L)			
ก่อนคลอด	1.67 ± 0.42	1.81 ± 0.36	0.751
หลังคลอด 14 วัน	2.08 ± 0.35	1.41 ± 0.60	0.051
หลังคลอด 28 วัน	1.58 ± 0.72	2.08 ± 0.78	0.140
Triglyceride (mmol/L)			
ก่อนคลอด	0.15 ± 0.07	0.13 ± 0.07	0.672
หลังคลอด 14 วัน	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.052
หลังคลอด 28 วัน	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.065
Insulin (pmol/L)			
ก่อนคลอด	14.77 ± 13.55	32.86 ± 32.81	0.459
หลังคลอด 14 วัน	6.21 ± 4.01	11.79 ± 6.73	0.051
หลังคลอด 28 วัน	9.42 ± 6.64	31.50 ± 33.09	0.014

ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ stepwise ในการพยากรณ์ดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ NEFA และอินซูลินในเลือด มีความสัมพันธ์แบบพหุคูณต่อค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.037$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พหุคูณเป็น 0.755 สามารถพยากรณ์ปัจจัยได้ ร้อยละ 57.00 มีความคาดเคลื่อนมาตรฐานในการพยากรณ์เท่ากับ 0.37 ดังตารางที่ 4.11 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และระดับความเข้มข้นของ NEFA ระดับความเข้มข้นอินซูลิน พบว่าเมื่อค่า NEFA และอินซูลินเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.006$ และ $P=0.023$) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.407 และ 0.300 ตามลำดับ ตามภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ stepwise ในการพยากรณ์ดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ (RQUICK)

ปัจจัย	b	Standard error	Beta	P value
ค่าคงที่ (constant)	1.887	0.208		<0.001
NEFA	-1.076	0.362	-0.536	0.010
อินซูลิน	-0.037	0.016	-0.416	0.037



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ ระดับความเข้มข้นของ NEFA ($P=0.006$, $R^2=0.407$) และอินซูลินในเลือด ($P=0.023$, $R^2=0.300$) ของโคที่กลุ่มภาวะโรคคีโตซีส (■) และกลุ่มโคปกติ (●)

4.2.2 วิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบอุบัติการณ์การเกิดโรคทางเมแทบอลิก ได้แก่ โรคคีโตซีส ภาวะขาด ภาวะรบกวน/มดลูกอักเสบ และกระเพาะไคเลี่ยน โดยพบอุบัติการณ์ของโคนมที่ป่วยด้วย โรคคีโตซีส สูงสุด รองลงมาคือ มดลูกอักเสบ โดยกลุ่มอาการของโรคพบสูงสุดในระยะ 14 วันหลังคลอด ซึ่งแตกต่างจาก Theera Rukkwamsuk (2008) ที่พบการโรคคีโตซีสในช่วงสัปดาห์ที่ 4 หลังคลอดสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ก่อนคลอด และ 2 สัปดาห์หลังคลอด ซึ่งโรคคีโตซีส เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยที่มีการสลายไขมันไม่จำเป็นและสะสมในเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้กรดไขมันไม่จำเป็นถูกออกซิไดซ์ ไปเป็นสารอะซิติลโค เอ (acetyl CoA) ในกรณีที่กระบวนการออกซิเดชันของอะซิติลโค เอ ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการสังเคราะห์สารคีโตนบอดี (Ketogenesis) ได้แก่ อะซิโตน อะซิโตะอะซิเตท และ สารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท มากเกินความต้องการและเกิดการสะสมในเนื้อเยื่อและกระแสเลือดสูง มีการขับสารคีโตนออกทางปัสสาวะและน้ำนม โดยค่าความเข้มข้นของเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท ใน โคนมหลังคลอด มากกว่า 1.2-1.4 มิลลิโมลต่อลิตร จะจำแนกว่าเกิดโรคคีโตซีสแบบไม่แสดงอาการ และถ้าค่าสูงกว่า 1.4 มิลลิโมลต่อลิตร จะจำแนกว่าเกิดโรคคีโตซีสแบบแสดงอาการ (Duffield et al, 2000)

การศึกษาครั้งนี้โคนม 4 ใน 5 ตัว ที่แสดงอาการของโรคคีโตซิส พบว่าค่าความเข้มข้นของสารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท ในกระแสเลือดสูงกว่า 2.0 มิลลิโมลต่อลิตร โดยโคมีการกินอาหารลดลง สูญเสียน้ำหนักหลังคลอดมาก ปริมาณน้ำนมลดลง และพบ 1 ใน 4 ที่อาการทางระบบประสาทร่วมด้วย ส่วนแบบไม่แสดงอาการ พบเพียง 1 ตัว โดยมีค่าความเข้มข้นของสารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรท ในกระแสเลือดสูงกว่า 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร แต่ไม่พบการแสดงอาการของโรคที่ชัดเจน โคนมกลุ่มที่พบอาการโรคคีโตซิสมีสภาพการสูญเสียน้ำหนักสูง โดยพบว่า คะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายระยะก่อนคลอดลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายที่ 4 สัปดาห์หลังคลอด (3.70 ± 0.57 และ 2.70 ± 0.45 ตามลำดับ) ซึ่งการสูญเสียน้ำหนักตัวหลังคลอดที่สูง เกิดจากแม้โคนมหลังคลอดมีความต้องการพลังงานในการสร้างน้ำนมปริมาณมาก ซึ่งพลังงานที่ความต้องการนี้ไม่สามารถได้รับอย่างเพียงพอจากการกินอาหาร โดยพบว่าในช่วงหลังคลอด ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดลดลง ส่งผลให้ปริมาณการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนลดลง ทำให้การนำเอากลูโคสไปใช้ได้ลดลงด้วย ร่างกายจึงต้องมีการสลายไขมันที่สะสมในร่างกายเพื่อชดเชยการขาดหายไปของน้ำตาลกลูโคส จากผลการสลายตัวของไขมันจำนวนมาก ทำให้มีการปลดปล่อยกรดไขมันไม่จำเป็น (non-esterified fatty acids) หรือ เอ็นอีเอฟเอ(NEFA) ออกมาในกระแสเลือดสูง (Rukkwamsuk et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบค่าความเข้มข้นของ NEFA ในโคนมกลุ่มที่พบโรคคีโตซิส มีระดับที่สูงกว่าโคกลุ่มปกติ โดยมีระดับที่สูงสุดในโคนมหลังคลอด 14

Duffield et al (2000) กล่าวว่าโคนมหลังคลอดที่เกิดภาวะขาดสมดุลพลังงาน มีค่าความเข้มข้นของกรดไขมันไม่จำเป็นในเลือด มากกว่า 0.7 มิลลิโมลต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของกลูโคส มากกว่า 3 มิลลิโมลต่อลิตร และ มีค่าความเข้มข้นของสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท สูงกว่า 1.2 มิลลิโมลต่อลิตร มีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมที่สูง ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าโคนมทั้ง 5 ตัว ที่แสดงอาการของภาวะโรคคีโตซิส ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของทั้ง NEFA และสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท ในสัปดาห์ที่ 2 หลังคลอดสูงกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดจึงมีความเสี่ยงในการเกิดภาวะขาดสมดุลพลังงาน และมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่น เอ็นโพรดักส์ได้ เนื่องจากพบอุบัติการณ์การเจ็บขาของโคเพียง 1 ใน 30 ตัว เท่านั้น ซึ่งเกิดจากสาเหตุเป็นแผลที่พื้นกีบ (sole ulcer) และเป็นอาการของโรคระยะเรื้อรัง ไม่ใช่สาเหตุที่ไม่เกี่ยวข้องกับอาหาร และภาวะดื้อต่ออินซูลินดังกล่าว ดังนั้นการศึกษารั้งต่อไปควรเพิ่มขนาดประชากรและกลุ่มโคที่พบอาการกีบอักเสบและเจ็บขามากขึ้นเพื่อให้สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเกิดโรคได้

ค่าความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ (RQUICK) ความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโพรดักส์ และสารเมแทโบไลต์ในเลือดโคนมก่อนและหลังการคลอดลูก การศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะเวลาหลังคลอดมีผลต่อค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยโคนมหลังคลอด 14 วัน มีค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ ของโคนมก่อนและหลังคลอด 28 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แมโคนมที่พบภาวะโรคคีโตซิส ซึ่งมีค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ที่ต่ำสุด ดังนั้นจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าแมโคนมหลังคลอดกลุ่มนี้มีความเสี่ยงการเกิดภาวะอินซูลิน รีชีสแตนท์ เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อถูกแทรกด้วยเซลล์ไขมัน จะทำให้ insulin receptor ลดลง และทำให้การพากลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้กลูโคสเหลืออยู่ในกระแสเลือด

มากขึ้น เมื่อเกิดภาวะน้ำตาลสูงในเลือด ก็ยังทำให้ตับอ่อนทำงานหนักเพื่อที่จะหลั่งอินซูลิน ซึ่งในช่วงแรกที่ยังสามารถชดเชยได้ จะมีอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้นอีกเช่นกัน ซึ่งอินซูลินเป็น Anabolic hormone ทำให้เกิดการสร้างไขมันมากขึ้นด้วย เมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน ทำให้การทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป และส่งผลต่อการหลั่งอินซูลินลดลงในเวลาต่อมา เกิดภาวะที่อินซูลินในกระแสเลือดต่ำ และทำให้เนื้อเยื่อไม่สามารถนำเอาน้ำตาลกลูโคสเข้าภายใน เซลล์เพื่อเข้าสู่กระบวนการสันดาปต่อไป ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น และทำให้มีการสร้างอินซูลินที่ตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นด้วย เมื่อปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น Beta cell ที่ตับอ่อน จะหลั่งอินซูลินออกมา และเมื่ออินซูลิน จับกับ receptors ก็จะทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วย ถ้าปริมาณ insulin receptors ของเซลล์ลดลง ทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ส่งผลให้กลูโคสอยู่ในกระแสเลือดมากขึ้น เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ในระยะตับอ่อนจะทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่งอินซูลิน ซึ่งในช่วงแรกที่สามารถชดเชยได้ จะมีอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน จะทำให้การทำงานของตับอ่อนส่วนของ Beta cell เสียไป ทำให้การหลั่งอินซูลินลดลงในเวลาต่อมา ในภาวะที่อินซูลินลดลง และเนื้อเยื่อต่อต้านอินซูลิน ส่งผลให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Koster and Opsomer, 2015)

การประเมินภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ หรือภาวะดื้อต่ออินซูลิน ของการศึกษารังนี้ ได้อ้างอิงการประเมินค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ของ Holtenius and Holtenius (2007) ซึ่งได้ทำการคำนวณภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ จากการดัดแปลงโดยใช้สูตรการคำนวณค่า Revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) โดยใช้ค่าความเข้มข้นของ กลูโคส อินซูลิน และค่ากรดไขมันอิสระ เช่น NEFA ดังนี้ $RQUICKI = 1/(\log[\text{basal glucose}] + \log[\text{basal insulin}] + \log[\text{NEFA}])$ โดย Holtenius and Holtenius (2007) ได้ศึกษาในโครีดนมจำนวน 237 ตัว พบว่าค่า RQUICKI มีค่าต่ำในโคหลังคลอดที่มี BCS สูง สามารถใช้และมีความแม่นยำในการประเมินสอดคล้องกับการคำนวณค่าพารามิเตอร์ของกลูโคสและอินซูลิน ค่าดัชนีที่คำนวณจากค่าระดับกลูโคสและอินซูลิน และกรดไขมันไม่จำเป็น หากพบว่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ มีค่าต่ำ แสดงถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินสูง การศึกษารังนี้พบว่าโคที่แสดงอาการของโรคคีโตซิส ในวันที่ 14 วันหลังคลอด มีค่าเฉลี่ยดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ (0.71 ± 0.10) ซึ่งต่ำกว่าโคกลุ่มที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.008$) นอกจากนั้นยังพบว่าความเข้มข้นของ NEFA และสารเบต้า ไฮดรอกซีบิวทีเรตในเลือดของโคนมกลุ่มโรคคีโตซิส มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มปกติ ในขณะที่ความเข้มข้นของอินซูลิน น้ำตาลกลูโคส และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของโคนมกลุ่มโรคคีโตซิส มีแนวโน้มต่ำกว่าโคกลุ่มปกติ จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าโคนมหลังคลอดที่มีภาวะโรคคีโตซิสเกิดภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าภาวะดื้อต่ออินซูลินมีความสัมพันธ์กับโรคความผิดปกติของการเผาผลาญอาหารในโคนมหลังคลอด Chuang et al. (2014) ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างภาวะคีโตซิส และการดื้ออินซูลิน พบว่าภาวะคีโตซิสในโคนม ซึ่งเป็นโรคเมแทบอลิกที่สำคัญ และเกิดขึ้นได้ง่ายในช่วงการเปลี่ยนแปลงการเผาผลาญในช่วงหลังคลอด และโคที่ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับความต้องการน้ำตาลที่สูงในช่วงนี้ได้ ส่งผลให้ต้องใช้พลังงานจากการสลายตัวของเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งส่งผลกระทบให้เกิดภาวะโรคทางเมแทบอลิกต่างๆ เช่น คีโตซิส และไขมันคั่งสะสมในตับ เป็นต้น (Chagas et al., 2009)

Chuang et al. (2014) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของภาวะอินซูลิน รีซิสแทนท์ และโรคคีโตซีสในโคนม ใช้สัตว์ทดลองจากฟาร์มโคนมที่ได้มาตรฐาน ในจังหวัดเฮย์หลงเจียงประเทศจีน จำนวน 16 ตัวที่พบว่ามีการเกิดคีโตซีส และอีกจำนวน 24 ตัวที่มีสุขภาพปกติที่นำมาเป็นตัวควบคุม เก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลองทั้งหมด โดยเก็บในระยะ 14 วันหลังคลอดในระหว่างการอดอาหาร เข้า นำมาทดสอบพารามิเตอร์ เพื่อหาสมดุลพลังงาน ความเครียดออกซิเดชัน ความไวของอินซูลิน และการทดสอบการนำกลูโคสไปใช้ระหว่างโคกลุ่มคีโตซีส และกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าค่าความเข้มข้นของ NEFA และ BHBA ($P < 0.01$) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในโคกลุ่มคีโตซีสเมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นค่า malondialdehyde (MDA) และ superoxide dismutase (SOD) ในพลาสมา เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในโคกลุ่มคีโตซีส มากกว่าโคกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และผลการการพยากรณ์ปัจจัยที่มีผลต่อค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน พบว่าระดับความเข้มข้นของ NEFA และอินซูลินในเลือด มีความสัมพันธ์แบบพหุคูณต่อค่าดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.037$) ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือด และอินซูลินมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ในโคกลุ่มที่พบคีโตซีส เมื่อเทียบกับโคกลุ่มควบคุม และดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในโคกลุ่มคีโตซีสมากกว่าค่าของโคกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ดังนั้น โคกลุ่มคีโตซีส มีภาวะขาดสมดุลพลังงาน ส่งผลให้ตับเสียหายที่มีผลมาจากความเครียดออกซิเดชัน และทำให้การตอบสนองต่ออินซูลินที่ต่ำลง ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างคีโตซีสและภาวะดื้อต่ออินซูลินจึงเกี่ยวข้องกับการทำงานของตับและความเครียดออกซิเดชัน ที่สามารถทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลิน นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Opsomer et al. (1999) ยังพบว่าภาวะดื้อต่ออินซูลินมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ โดยพบว่าภาวะดื้อต่ออินซูลินเป็นปัจจัยในการเกิดโรคของโรครังไข่บวมน้ำ ในโคนมที่ให้ผลผลิตสูง

การศึกษารังนี้ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของดัชนีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ได้ เนื่องจากพบอุบัติการณ์การเจ็บขาของโคเพียง 1 ใน 30 ตัว เท่านั้น ซึ่งเกิดจากสาเหตุเป็นแผลที่พื้นกบ (sole ulcer) และเป็นอาการของโรคระยะเรื้อรัง ซึ่งไม่ใช่สาเหตุที่เกี่ยวข้องกับอาหารและภาวะดื้อต่ออินซูลินดังกล่าว ดังนั้นการศึกษารังต่อไปควรเพิ่มขนาดประชากรและกลุ่มโคที่พบอาการกีบอึกเสบและเจ็บขามากขึ้นเพื่อให้สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและการเกิดโรคได้

ความสัมพันธ์ระหว่างสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ในเลือด การเกิดสภาวะกีบอึกเสบ และโรคทางเมแทบอลิกในโคนม ภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย การศึกษารังนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ (CML) ภาวะความผิดปกติหลังคลอด ซึ่งอาจเนื่องมาจากการศึกษาในระยะสั้น และมีการจัดการอาหารที่ไม่หลากหลาย โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มีการอาหารที่ใกล้เคียงกัน ประกอบกับอุบัติการณ์การเกิดภาวะความผิดปกติที่ต่ำ ทำให้ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของปัจจัยได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์ระหว่างสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์กับการเกิดโรคในโคนมหลังคลอด ซึ่งโดยทั่วไปโคนมหลังคลอด ได้รับอาหารที่มีแป้งและคาร์โบไฮเดรตในสัดส่วนที่สูง และมีการหมักย่อยอาหารคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่มาก ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์ไขมันระเหยง่ายที่ในกระเพาะหมักสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไพรูวิก ประกอบกับโคหลังคลอดใหม่ต้องการน้ำตาลกลูโคส เพื่อสังเคราะห์น้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้นในช่วงนี้

ทำให้มีการนำเอากรดโพธิ์โอนิกไปสังเคราะห์เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ที่ตับ ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น และมีผลกระทบต่อการหลั่งสารอินซูลินจากตับอ่อน เพื่อดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ในภาวะปกติร่างกายสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินให้สมดุลได้ แต่ในกรณีที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง ตับอ่อนมีการทำงานเพิ่มขึ้นเพื่อหลั่งอินซูลิน ซึ่งในระยะแรกตับอ่อนสามารถชดเชยได้ โดยมีการหลั่งอินซูลินในเลือดเพิ่มสูงขึ้น แต่ในระยะยาวเมื่อตับอ่อนทำงานหนักเป็นเวลานาน ส่งผลทำให้การทำงานของตับอ่อนเสียไป และลดการหลั่งอินซูลิน ประกอบกับเนื้อเยื่อไม่มีตัวรับอินซูลิน ทำให้ไม่สามารถดึงกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เรียกว่า ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งภาวะนี้ส่งผลต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดตามมา (De Laat et al., 2012)

ในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะไปกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์แอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ โดยเกิดจากผลของการเกิดปฏิกิริยาการจับตัวของหมู่ carbonyl group ของน้ำตาลกับกรดอะมิโนของโปรตีน ที่เรียกว่าปฏิกิริยา Glycation หรือ Maillard reaction ได้สารประกอบ Carbonyl-amine ที่มีลักษณะสีน้ำตาล หรือเรียกว่า ปฏิกิริยาสีน้ำตาล หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน (Dehydration reaction) หรือเรียกว่าขั้นตอน Schiff's base ได้เป็นสารกลุ่ม amine และมีการเรียงตัวใหม่ของสารเอมีน ได้สารอินเทอร์มีเดียตของปฏิกิริยา Maillard ที่เรียกว่า Amadori products เช่น Aldoseamine ซึ่งสารกลุ่มนี้จะเปลี่ยนเป็น AGEs ต่อไป นอกจากนั้นในช่วงการเกิดปฏิกิริยา Maillard ยังเกิดการสร้างสารอินเทอร์มีเดียตของน้ำตาลกลูโคส เช่น glucose autooxidation, lipid peroxidation หรือ polyol pathway และสารกลุ่ม glyoxal, methylglyoxal 3-deoxy- glucosone ขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งสารเหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น AGEs ชนิดต่างๆ เช่น สาร Glyoxal เปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น N_ε-(carboxymethyl) lysine (CML) glyoxal-derived lysyl dimer (GOLD) หรือ N_ε-(carboxymethyl) arginine (CMA) ส่วน Methylglyoxal เปลี่ยนเป็น N-(carboxyethyl) lysine (CEL) จากข้อมูลที่ผ่านมาในม้า และหนูที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ (Kerstin et al., 2015) และพบว่าม้าที่แสดงอาการก็บอัสมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการศึกษารั้ดต่อไปควรจัดกลุ่มโคทดลองให้ชัดเจนมากกว่านี้ทั้งในด้าน การจัดการอาหาร ระยะเวลาในการศึกษา

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ อินซูลิน รีซิสแทนท์ และการเกิดสภาวะกิบอีกเสบในโคผสมสาว

5.1.1 ผลการศึกษาที่โดดเด่นในครั้งนี้นี้สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1.1 โคสาวได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 48 ส่งผลให้ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด กรดโพรพิโอนิก และกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) มีผลเหนี่ยวนำให้ค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะหมักลดลง ($P<0.05$) และอยู่ในระดับที่เกิดภาวะความเป็นกรดในกระเพาะหมักชนิดไม่เฉียบพลัน

5.1.1.2 โคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลัง ร้อยละ 48 มีความเข้มข้นของทั้งน้ำตาลกลูโคสและฮอโมนอินซูลินและแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรดักส์ในพลาสมาสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม

5.1.1.3 อาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูงมีผลต่อการตอบสนองของฮอโมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือด โดยพบว่าโคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูงมีอัตราการขจัดน้ำตาลกลูโคสเร็วขึ้น ระยะเวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงครึ่งหนึ่งจากระดับสูงสุดและระยะ เวลาที่น้ำตาลกลูโคสลดลงสู่ระดับเริ่มต้นสั้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลในเลือดพบว่าโคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารทดลองมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้โคสาวกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูงมีความเข้มข้นของอินซูลินที่เวลาก่อนการทดสอบสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.04$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามระดับอินซูลินสูงสุด และผลต่างระหว่างค่าอินซูลินสูงสุดและต่ำสุดของโคทดลองทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สอดคล้องกับพื้นที่ใต้กราฟของอินซูลินทั้งที่เวลา 60 และ 120 นาที หลังการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

5.1.1.4 อาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง มีผลทำให้ภาวะการดื้อต่ออินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.04$) และความไวต่อการตอบสนองต่ออินซูลินมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.02$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคกลุ่มควบคุม

5.1.1.5 โคสาวที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังสูง แสดงอาการกิบอีกเสบ 3 ใน 5 ตัว ในขณะที่โคสาวกลุ่มควบคุมไม่พบอาการของภาวะกิบอีกเสบ โดยที่ระดับน้ำตาลในเลือดและ ความเข้มข้นของฮอโมนอินซูลิน ($R^2=0.789$, $P<0.01$) และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะหมัก ($R^2=0.646$, $P<0.05$) มีความสัมพันธ์ เชิงบวกกับคะแนนภาวะกิบอีกเสบ

5.1.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ถึงผลของการเสริมมันสำปะหลังแช่กรดแลคติกต่อการลดการหลังสารสื่อประสาทได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับแป้งทั้งในกระเพาะหมัก และลำไส้ใหญ่ ระดับ LPS และสารสื่อการอักเสบต่อไป จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าการเสริมมันสำปะหลังแช่กรดแลคติก สามารถป้องกันการเกิดสภาวะ rumen acidosis ในกรณีที่อาหารโคเนื้อมีส่วนของมันสำปะหลังสูง และอาหารหยาบต่ำในสูตรอาหาร

ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงโภชนาที่น้อยได้และการนำไปใช้ประโยชน์ของมันสำปะหลังแช่กรดแลคติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเพิ่มผลผลิตทั้งด้าน การเจริญเติบโต และปริมาณน้ำนมต่อไป และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการแช่กรดแลคติกต่อขบวนการหมักและประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของมันสำปะหลังแช่กรดแลคติกในสัตว์ประเภทอื่นๆ เช่น โคนม และแพะต่อไป

5.2 สรุปและข้อเสนอแนะการทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ ดัชนีอินซูลิน รีซิสแตนซ์ การเกิดสภาวะกักเสบและโรคทางเมแทบอลิกในโครีดนมภายใต้สภาพการให้อาหารในประเทศไทย

ผลการศึกษาที่โดดเด่นในครั้งนี้อาจสรุปได้ว่า ระดับความเข้มข้นของ NEFA และอินซูลินในเลือด มีความสัมพันธ์แบบพหุคูณต่อค่าดัชนีอินซูลิน รีซิสแตนซ์ โดยที่เมื่อค่า NEFA และอินซูลินเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าดัชนีภาวะอินซูลิน รีซิสแตนซ์ ลดลง โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ และภาวะความผิดปกติหลังคลอด

เนื่องมาจากการศึกษาในระยะสั้น และมีการจัดการอาหารที่ไม่หลากหลาย โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มีการอาหารที่ใกล้เคียงกัน ประกอบกับอุบัติการณ์การเกิดภาวะความผิดปกติโรคที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิกที่ต่ำ ดังนั้นการศึกษารุ่นต่อไปควรเพิ่มจำนวนประชากร ระยะเวลาในการศึกษาให้มากขึ้น และควรมีการจัดกลุ่มโคทดลองให้ชัดเจนทั้งในด้านการจัดการอาหาร สภาพแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

- ชลทิศ อุไรฤกษ์กุล. 2010. อินซูลิน ฮอโมนที่ควบคุมปริมาณน้ำตาล (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.google.co.th/?gws_rd=ssl#q [13 ตุลาคม 2558]
- ชัยเดช อินทร์ชัยศรี, สมชาย จันทรผ่องแสง และ Noordhuizen, J.P.T.M. 2548. สถานะและผลกระทบของความไม่สมดุลของพลังงาน ภาวะความเป็นกรดในกระเพาะรูเมน และการจัดการอาหาร ต่อสมรรถนะด้านระบบสืบพันธุ์ในโคนมฟาร์มเกษตรกรรายย่อยในเมืองไทย. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิตุณน หนูแสน. 2547. การใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแหล่งพลังงานในอาหารชั้นต่อการให้ผลผลิตของโคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://sutir.sut.ac.th>. [15 ตุลาคม 2558]
- บรรจง จงรักษ์วัฒนา. 2554. กรดเกินในกระเพาะ. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://pvlo-pni.dld.go.th>. [10 ตุลาคม 2558]
- ฤทธิชัย พิลายไชย, วลัยลักษณ์ แก้ววงษา, อนันต์ เพชรล้ำ, ยาวพล ชุมพล และวีระชัย ทองดี. 2557. ความสามารถในการย่อยสลายได้ของมันสำปะหลังแช่กรดแลคติกในกระเพาะหมักโดยวิธีถึงในล่อน.วารสารแก่นเกษตร 42:3. หน้า 567-576.
- พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์ และ วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ. 2557. แนวทางลดการเกิดโรคคีโตซิส (Ketosis) โดยใช้โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ของโคนมในช่วงแรกของการให้นม (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://iat.sut.ac.th/2013/animal/research/detail/41> [15 ตุลาคม 2558]
index.php/health/health-system/diabetes/881 [18 ตุลาคม 2558]
- สายลม เกิดประเสริฐ. ม.ป.ป. สำนวณโลกฮอโมน (ออนไลน์). สืบค้นจาก <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/hormone/staff.html> [18 ตุลาคม 2558].
- สิทธิศักดิ์ คำผา. 2548. ผลของระดับการใช้มันสำปะหลัง (มันเส้น) และการเสริมมาเลทต่อประสิทธิภาพการผลิตจุลินทรีย์โปรตีนในรูเมนและผลผลิตน้ำนมในโคนม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2558. Dairy Development Program. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://dairydevelopmentprogram.weebly.com>. [27 พฤศจิกายน 2558]
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- Brown, M.S., Krehbiel, C.R., Galyean, M.L., Remmenga, M.D., Peters, J.P., Hibbard, B., Robinson, J., and Moseley, W.M. 2000. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. J. Anim. Sci. 78: 3155-3168.
- Chagas, L. M., Lucy, M.C., Back, P. J., Blache, D., Lee, J.M., Gore, P.J.S., Sheahan, A.J. and Roche, J.R. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. J. Dairy Sci. 92: 216-222

- Chuang Xu, Shi Shu, Cheng Xia, Bo Wang, Hong-You Zhang and Bao. 2014. Investigation on the Relationship of Insulin Resistance and Ketosis in Dairy Cows. *J Veterinar Sci. Technol* 5: 162.
- Dhar Arti, Kaushik Desai, Jianghai Liu and Lingyun Wu. 2009. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *Journal of Chromatography B*, 877: 1093–1100.
- De Laat, M.A., McGowan, C.M., Sillence, M.N., and Pollitt, C.C. 2010. Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses. *Equine Vet. J.* 42: 129-135
- De Laat, M.A., Kyaw-Tanner, M.T., Sillence, M.N., McGowan, C.M., and Pollitt, C.C. 2012. Advanced glycation endproducts in horses with insulin-induced laminitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145: 395-401.
- Duffield, T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16:231-253.
- Duffield, T., and Plaizier, J.C. 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87: 59–66.
- Emmanuel, D.G.V., Dunn, S.M., and Ametaj, B.N. 2008. Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 606-614.
- Enemark, J.M.D., Jorgensen, R.J., and Kristensen, N.B. 2004. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Veterinary Research Communication* 28: 687–709.
- Garner, H.E., Moore, J.N., Johnson, J.H., Clark, L., Amend, J.F., Tritschler, L.G., Coffmann, J.R., Sprouse, R.F., Hutcheson, D.P., and Salem, C.A. 1978. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine Vet. J.* 10: 249-252.
- Gozho, G.N., Krause, D.O., and Plaizier, J.C. 2007. Ruminant lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 856-866.
- Gozho, G.N., Plaizier, J.C., Krause, D.O., Kennedy, A.D., and Wittenberg, K.M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88: 1399-1403.
- Gozho, G.N., Krause, D.O., and Plaizier, J.C. 2006. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. *J. Dairy Sci.* 89: 4404-4413.
- Greenough, P.R., Bergsten, C., Brizzi, A., and Mülling, C.-K.W. 2007. Bovine laminitis and lameness - A hands on approach. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.

- Greenough, P.R., Vermunt, J.J., McKinnon, J.J., Fathy, F.A., Berg, P.A., and Cohen, R.D. 1990. Laminitis-like changes in the claws of feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 31: 202-208.
- Hernandez, J., Benedito J. L., Abuelo A., and Castillo, C. 2014. Ruminal Acidosis in Feedlot: From Etiology to Prevention. *The Scientific World Journal*.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/702572>, 1-8.
- Holtenius, Paul and Holtenius, Kjell. 2007. A model to estimate insulin sensitivity in dairy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49:29, 1-3.
- Hughes, J. 2001. A system for assessing cow cleanliness. In *Pract.* 23: 517-524.
- Ingrid, L. 2015. Subacute ruminal acidosis. (Online). Available:
<http://www.merckvetmanual.com>. [2015 October 25].
- Jeffcott, L.B., Field, J.R., McLean, J.G., and O'Dea, K. 1986. Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Vet. J.* 18: 97-101.
- Kerstin Nowotny, Tobias Jung, Annika Hohn, Daniela Weber, and Tilman Grune. 2015. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5: 194-222.
- Khafipour, E., Krause, D.O., and Plaizier, J.C. 2009. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92: 1060-1070.
- Koster, J., and Opsomer, G. 2013. Insulin resistance in dairy cow. *Vet Clin Food Anim* 29: 299–322.
- Krause, K. M., and Oetzel, G. R. 2005. Inducing Subacute Ruminal Acidosis in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88: 3633-3639.
- Leach, K.A., Logue, D.N., Kempson, S.A., Offer, J.E., Ternent, H.E., and Randalls, J.M. 1997. Claw lesions in dairy cattle: Development of Sole and white line haemorrhages during the first lactation. *Vet. J.* 154: 215-225.
- Leiva, T., Cooke, R.F., Aboin, A.C., Drago, F.L., Gennari, R., and Vasconcelos, J.L.M. 2014. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters in nonlactating dairy cows. *J ANIM SCI.* 92: 775-782.
- Li, S., Khafipour, E., Krause, D.O., Kroeker, A. Rodriguez-Lecompte, L.C., Gozho, G.N., and Plaizier J.C. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 294-303.
- Matthias, J., and Enemark, D. 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnosis aspects of subclinical rumen acidosis: A review. *Veterinarija IR Zootechnarija T.* 20 (42): 1392-2130.

- Moore, R.M., Eades, S.C., and Stokes, A.M., 2004. Evidence for vascular and enzymatic events in the pathophysiology of acute laminitis: which pathway is responsible for initiation of this process in horses? *Equine Vet. J.* 36: 204-209.
- Nocek, J.E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80(5): 1005-1028.
- Norlund, K.V., Garret, E.F., and Oetzel, G.R. 1995. Herd-based ruminocentesis-a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis," *The Compendium X*, vol. 17, pp. 48-56.
- Opsomer, G., Wensing, T., Laevens, H., Coryn, M., and de Kruif, A. 1999. Insulin resistance: The link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 56: 211-222.
- Ossent, P., and Lischer, C. 1998. Bovine laminitis: the lesions and their pathogenesis. *In Pract.* 25: 415-427.
- Pilachai, R., Schonewille, J.Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Vlaeminck, B., Doekes, G., and Hendriks, W.H. 2014. Hydrate sodium calcium aluminosilicate does not reduce rumen lipopolysaccharide concentrations in cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 191: 111-115.
- Pilachai, R., Schonewille, J.T., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., and Hendriks, W.H. 2012. Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. *Livest. Sci.* 150: 135-142.
- Pilachai, R., Thongdee, W., Chumpol, Y., Seesupa, S. and Schonewille, J.T. 2017. Effects of proportion of cassava and lactic acid-treated cassava in rations on rumen pH and plasma lipopolysaccharide-binding protein in beef cattle. *The Thai Journal of Veterinary Medicine.* 47(2): 173-181.
- Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N., and McBride, B.W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176: 21-31.
- Pollit, C.C., Kyaw-Tanner, M., French, K.R., van Esp, A.W., Hendrikz, J.K., and Daradka, M. 2003. Equine laminitis. In: *proc. 49th Ann. Conv. Am. Assoc. of Equine Pract.* Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. (cited from *Nutrient Requirements of Horses*, NRC 2007).
- Rowe, J.B., Lees, M.J., and Pethick, D.W. 1994. Prevention of acidosis and laminitis associated with grain feeding in horses. *J. Nutr.* 124: 2742S-2744S.
- Rukkwamsuk, T., Wensing, T., and Geelen, M.J.H. 1998. Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 81: 2904-2911.

- Stone, W.C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl): E13-E26.
- Tajik, J., and Nazifi, S. 2011. Diagnosis of SubacuteRuminal Acidosis: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences.* 5(2): 80-90.
- Tarlton, J.F., Holah, D.E., Evans, K.M., Jones, S., Pearson, G.R., and Webster, A.J. 2002. Biomechanical and histopathological changes in the support structures of bovine hooves around the time of first calving. *Vet. J.* 163: 196-204.
- Theera Rukkwamsuk, Jenjira Suksiri, Nonthasit Chutiyawawat, Nathakorn Kaewsakhorn and Sunthorn Rungruang. 2008. Relationship between the sodium nitroprusside test for ketone bodies in urine and serum β -Hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42: 457 – 462.
- Thoenfer, M.B., Wattle, O., Pollitt, C.C., French, K.R., and Nielsen, S.S. 2005. Histopathology of oligofructose-induced acute laminitis in heifers. *J. Dairy Sci.* 88: 2774-2782.
- Thornalley, P.J. 1990. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269: 1-11.
- Treiber, K.H., Hess, T.M., Kronfeld, D.S., Boston, R.C., Geor, R., and Harris, P.A. 2005. Insulin resistance and compensation in laminitis-predisposed ponies characterized by the Minimal Model. *Pferdeheilkunde* 21: 91-92.
- Treiber, K.H., Kronfeld, D.S., Hess, T.M., Byrd, B.M., Splan, R.K., and Staniar, W.B. 2006. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228: 1538-1545.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vermunt, J.J., and Greenough, P.R. 1994. Predisposing factors of laminitis in cattle. *Br. Vet. J.* 150: 151-164.
- Webster, A.J.F. 2001. Effects of Housing and Two Forage Diets on the Development of Claw Horn Lesions in Dairy Cows at First Calving and in First Lactation. *Vet. J.* 162: 56-65.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพประกอบการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอาหารที่มีสัดส่วนของแป้งที่ย่อยสลายเร็วในกระเพาะในระดับสูงต่อระดับแอดวานซ์ไกลเคชั่นเอ็นโปรตีนส์ ภาวะอินซูลิน รีซิสแตนท์ และการเกิดสภาวะกีดกันไขมันในโคนมสาว



โคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน



โคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน

ภาพภาคผนวกที่ 1 สัตว์ทดลอง



การสับฟางด้วยสับฟาง



ฟางที่ผ่านการสับ



การร่อนฟาง



การชั่งน้ำหนักเพื่อประกอบสูตรอาหาร

ภาพภาคผนวกที่ 2 การเตรียมส่วนผสมอาหารหยาบ



ส่วนผสมสำหรับอาหารชั้น



คลุกเคล้าส่วนผสมที่ละเอียดก่อนเข้าเครื่องผสม



นำส่วนผสมเข้าเครื่องผสมอาหาร



การเก็บอาหารชั้น

ภาพภาคผนวกที่ 3 การเตรียมส่วนผสมอาหารชั้น



เตรียมแกลบเพื่อรองพื้นคอก



เทพื้นคอก



การปรับพื้นคอก

ภาพภาคผนวกที่ 4 การเตรียมพื้นคอก



การวัดอัตราการเต้นของหัวใจ



การวัดอุณหภูมิ

ภาพภาคผนวกที่ 5 การตรวจสอบสุขภาพเบื้องต้น



การเตรียมเครื่องดูดสุญญากาศ (suction)



ทำการทาเจลหล่อลื่นที่ท่อ stomach tube เพื่อลดการระคายเคือง

ภาพภาคผนวกที่ 6 การเตรียมการดูดของเหลวในกระเพาะหมัก (Rumen fluid)



การสอดท่อ stomach tube ไปยังกระเพาะรูเมน



ทำการดูดน้ำ rumen fluid

ภาพภาคผนวกที่ 7 ขั้นตอนการดูดของเหลวในกระเพาะหมัก (Rumen fluid)



การ calibrate เครื่อง pH meter

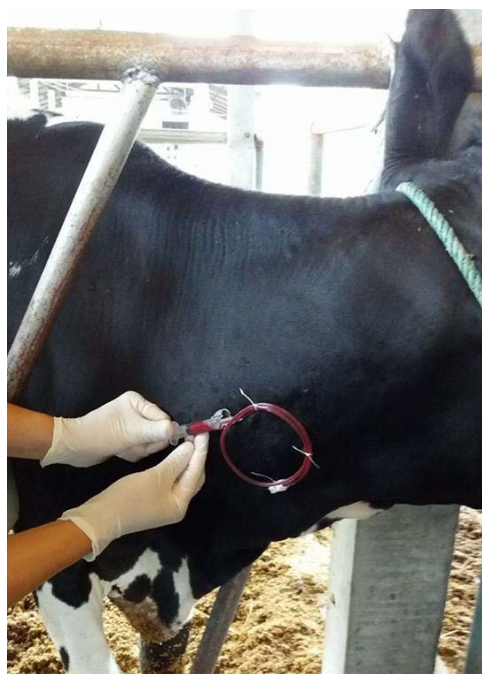


การวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

ภาพภาคผนวกที่ 8 การปรับตั้งค่าเครื่อง pH meter และการวัดค่า pH ของของเหลว
ในกระเพาะหมัก



ใช้ IV catheter เจาะที่หลอดเลือดดำบริเวณต้นคอและทำการเย็บติดกับผิวหนัง



ทำการเย็บติดและยึดให้แน่นด้วยเทปขาว

ภาพภาคผนวกที่ 9 การติดตั้ง IV Catheter เส้นเลือดดำคอ (Jugular vein)



ให้กลูโคสตามปริมาณที่คำนวณตามน้ำหนักตัว



ให้กลูโคสตามปริมาณที่คำนวณตามน้ำหนักตัว

ภาพภาคผนวกที่ 10 การให้กลูโคสทางหลอดเลือดดำผ่าน IV Catheter



การดูดเก็บตัวอย่างเลือดผ่าน IV catheter



การถอด IV catheter

ภาพภาคผนวกที่ 11 การเก็บตัวอย่างเลือดและการถอด IV catheter



นำตัวอย่างเลือดใส่หลอดป้องกันการแข็งตัว



จัดเรียงตัวอย่างเลือดเพื่อรอการปั่นแยกพลาสมา



ทำการแยกพลาสมาและเก็บใส่หลอด eppendorf และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการส่งตรวจ



ภาพภาคผนวกที่ 12 การปั่นแยกพลาสมาและการเก็บรักษาตัวอย่าง

ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอตวานซีไกลเคชั่นเอ็นโปรตักส์ ภาวะดื้อต่ออินซูลิน
การเกิดสภาวะกีดกันและโรคทางเมแทบอลิซึมในโครีดนม ภายใต้สภาพการให้อาหาร
ในประเทศไทย



ภาพภาคผนวกที่ 13 สภาพการเลี้ยงและการจัดการฟาร์มโคนมทดลองทั้ง 5 ฟาร์ม



ภาพภาคผนวกที่ 14 การผสมอาหารระหว่างอาหารชั้น วัตถุดิบอาหารและหญ้าก่อนการให้โคกิน โดย วัตถุดิบอาหารสัตว์ส่วนใหญ่นิยมใช้ กากถั่วเหลือง กากเปียร์ กากแป้งมันสำปะหลัง



ภาพภาคผนวกที่ 15 การให้อาหารโคนมทดลองทั้ง 5 ฟาร์ม โดยให้อาหารผสมระหว่างอาหารข้นและอาหารหยาบโดยส่วนใหญ่เสริมหญ้าเนเปียร์ และมีการจัดหาฟางข้าวให้กินอย่างอิสระ



ภาพภาคผนวกที่ 16 การสังเกตอาการและการบันทึกปัญหาสุขภาพโรคและความผิดปกติทาง
เมแทบอลิซึมตลอดทั้ง 5 ฟาร์ม



ภาพภาคผนวกที่ 17 การประเมินคะแนนความสมบูรณ์ร่างกายโคนม



ภาพภาคผนวกที่ 18 การจัดการกระบวนการรีดนม



ภาพภาคผนวกที่ 19 การตรวจสอบสุขภาพ รักษาโรคโคนมที่พบความผิดปกติทางเมแทบอลิก และการเก็บตัวอย่างเลือดโคนมทดลอง



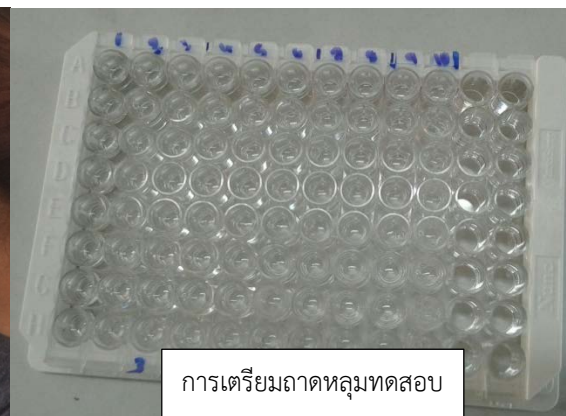
การเตรียมตัวอย่างพลาสมา



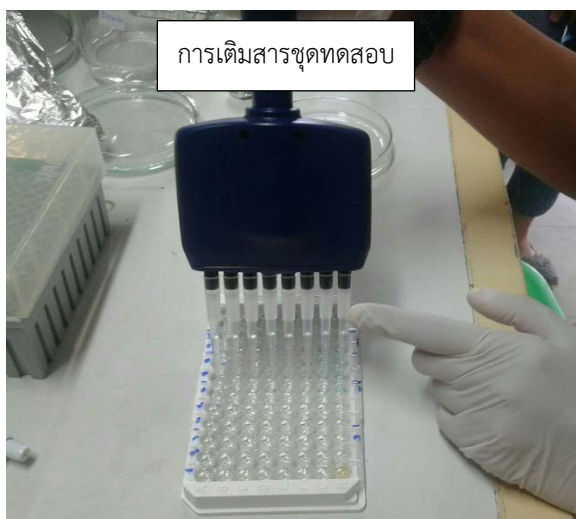
ชุดทดสอบ ELISA สำหรับ NE-carboxymethyl lysine



การเตรียมชุดทดสอบ



การเตรียมภาตหลุมทดสอบ



การเติมสารชุดทดสอบ



การบ่มสารทดสอบ

ภาพภาคผนวกที่ 20 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์การตรวจ ความเข้มข้นของ วิเคราะห์ความเข้มข้นของ AGEs ด้วยชุดทดสอบ ELISA สำหรับ NE-carboxymethyl lysine (CML) (OxiSelect™ HK503, Hycult® Biotechnology, Uden, the Netherland)



ภาพภาคผนวกที่ 21 เครื่อง Microplate Absorbance Reader (BIO- RAD[®] Laboratories, Inc, USA) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.น.สพ.ฤทธิชัย พิล้าไชย
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Rittichai Pilachai
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 4016 00147 705
4. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี
Tel 042-211040 ต่อ 429 Mobile: 081 2621161 E-mail: r.pilachai@gmail.com
6. ประวัติการศึกษา

Degree	Name of Program	Institution	Year of graduation
D.V.M.	Veterinary Medicine	Chulalongkorn University, Thailand	1995
M.Sc.	Theriogenology	Khon Kaen University, Thailand	2005
Ph.D.	Veterinary Medicine	Utrecht University, the Netherlands	2013

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
อาหาร สุขภาพ โคเนื้อ โคนม
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
การทำงานวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
 - 8.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
 - 1) การพัฒนามาตรฐานการผลิตแพะเนื้อเพื่อการส่งออกของเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ อำเภอสรี
เชียงใหม่ จังหวัดหนองคาย
 - 8.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการในระยะ 5 ปีย้อนหลัง
 - 1) ฤทธิชัย พิล้าไชย, อนันต์ เพชรล้ำ, วีระชัย ทองดี และคณาวิทย์ ปะทะโน. 2555. ผลการ
เสริมหัวมันสำปะหลังสดในอาหารโคนมระยะยาวต่อระดับไอโอโซยานิตในพลาสมาและ
น้ำนมและผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงค่าเคมีบางประการในเลือด. สาขาวิชาเทคนิค
การสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
 - 2) ฤทธิชัย พิล้าไชย, วลัยลักษณ์ แก้ววงษา, อนันต์เพชรล้ำ, เยาวพล ชุมพล และวีระชัย
ทองดี. 2556. การศึกษาผลของแป้งมันสำปะหลังแช่กรดแลคติกต่อการอัตราการ
ย่อยสลายในกระเพาะหมักโค. สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
 - 3) ฤทธิชัย พิล้าไชย, เยาวพล ชุมพล และวีระชัย ทองดี. 2556. การศึกษาเปรียบเทียบ
น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์

สุกร. ศูนย์วิจัยและพัฒนาท้องถิ่น บ้านตาด คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

- 4) ฤทธิชัย พิลาไชย, เยาวพล ชุมพล และวีระชัย ทองดี. 2557. ผลของมันสำปะหลังบดแช่กรดแลคติก ตีกรอบขบวนการหมักและค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวในกระเพาะหมักโค. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- 5) ฤทธิชัย พิลาไชย, วีระชัย ทองดี และเยาวพล ชุมพล. 2557. แนวทางการใช้มันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและลดผลกระทบต่อสุขภาพ โคนมและผู้บริโภค. ศูนย์วิจัยและพัฒนาท้องถิ่น บ้านตาด คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- 6) ฤทธิชัย พิลาไชย, พิชรี ผาสุข, ปราณปรียา คำมี และวีระชัย ทองดี. 2559. ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์และผลลัพธ์ทางเศรษฐศาสตร์ของการใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคนม. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

9. เอกสารตีพิมพ์ *Peer-reviewed journals*

9.1 รายชื่อผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เป็นภาษาไทย

- 1) **Rittichai Pilachai**, Sudawan Chuenpreecha, Pranpreya Kummee. 2014. Prevalence of subclinical mastitis and potential risk factors in lactating cows in Udon Thani Province. *KKU Veterinary Journal* 24 (1), 43-56. (In Thai)
- 2) **Rittichai Pilachai**, Walailuck Kaewwongsa, Anan Petlum, Yauvapol Chumpol and Weerachai Thongdee. 2014. Rumen digestibility of lactic acid steeped cassava using nylon bag technique. *Khon Kaen Agriculture Journal* 42 (4), 567-576. (In Thai)
- 3) **Rittichai Pilachai**, Anan Petlum, Weerachai Thongdee and Kanawit Patano. 2012. Effects of prolonged supplementation of raw cassava root on plasma and milk thiocyanate concentrations and its impact on indices of blood parameters in dairy cows. *Udon Thani Rajabhat University Journal of Science and Technology* 1, 119-136. (In Thai)
- 4) **Rittichai Pilachai**, Suneerat Aiumlamai, Weerasak Wongsrikeao and Saksiri Sirisatien. 2006. Effect of GnRH or hCG administration on the 5th day-post insemination regarding serum progesterone concentration and conception rate in lactating cows during hot season. *KKU Veterinary Journal* 16(1), 61-70. (In Thai)

- 5) **Rittichai Pilachai**, Suneerat Aiumlamai, Weerasak Wongsrikeao and Saksiri Sirisatien. 2004. A study on post-insemination administration of GnRH or hCG on serum progesterone concentration and conception rates in dairy heifers during hot season. Journal of Thai Veterinary Medicine Association 55(2), 43-54. (In Thai)

9.2 รายชื่อผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เป็นภาษาต่างประเทศ

- 1) Suvaluk Seesupa, Kwankate Kanistanon, **Rittichai Pilachai** and Suneerat Aiumlama 2016. Prevalence of subclinical laminitis and its effects on reproductive performance in lactating cows in Thailand. Thai Journal Veterinary Medicine 46(1), 109-117. (Impact factor 0.16)
- 2) Yauvapol Chumpol, Weerachai Tongdee and **Rittichai Pilachai**. 2014. Comparative study on commercial semen extenders and storage time on the quality of boar semen. Khon Kaen Agriculture Journal. 42 Suppl. (4), 68-72.

9.3 รายชื่อผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในต่างประเทศ

- 1) **Pilachai, R.**, Schonewille, J.Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Vlaeminck, B., Doekes, G., Hendriks, W.H., 2014. Hydrate sodium calcium aluminosilicate does not reduce rumen lipopolysaccharide concentrations in cows. Animal Feed Science and Technology 191, 111-115. (Impact factor 2.00)
- 2) **Pilachai, R.**, Schonewille, J.Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Hendriks, W.H., 2013. Diet factors and subclinical laminitis score in milking cows of smallholder dairy farms in Thailand. Livestock Science 155, 157-462. (Impact factor 1.17)
- 3) **Pilachai, R.**, Schonewille, J.Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Hendriks, W.H., 2012. Starch source in high concentrate rations does not affect rumen pH, histamine and lipopolysaccharide concentrations in dairy cows. Livestock Science 150, 135-142. (Impact factor 1.17)
- 4) **Pilachai, R.**, Schonewille, J.Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Hendriks, W.H., 2012. The effects of high levels of rumen degradable protein on rumen pH and histamine concentrations in dairy cows. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96, 206-213. (Impact factor 1.41)

10. Contributions to conferences and symposia

- 1) Yauvapol Chumpol, Weerachai Tongdee and **Rittichai Pilachai**. 2014. Comparative study on commercial semen extenders and storage time on the quality of boar semen. In: Proceeding of 6th International Science, Social Sciences, Engineering and Energy Conference 17-19 December, 2014, Prajaktra Design Hotel, Udon Thani, Thailand. (Oral presentation)
- 2) Kummee, P., Khongmak, K., Namchai, P., Satsomnuek, W., **Pilachai, R** and Chuenpreecha., S. 2014. Antimicrobial Resistant among *Escherichia coli* isolated from chicken and pig. In: Proceeding of 15th Khon Kaen Veterinary Annual International Conference, 24-25 April, 2014. (Poster presentation)
- 3) **Pilachai, R.**, Kummee, P and Chuenpreecha, S. 2014. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy cows in Udon Thani of Thailand. In: Proceeding of 15th Khon Kaen Veterinary Annual International Conference, 24-25 April, 2014. (Oral & poster presentation)
- 4) **Pilachai R.**, Petlum, A., Kaewwongsa, W., Thongdee W. and Thaseesang, T. 2012. Effect of lactic acid steeped cassava meal and cassava pulp on *in situ* dry matter degradation kinetics. In: Proceeding of the 1st international conference on Animal Nutrition and Environment 2012, Khon Kaen, Thailand. pp. 203-206. (Poster presentation)
- 5) **R. Pilachai**, S. Budpraserd, S. Chumnanbungkae and N. Parakun. 2011. Effect of substituting ground corn with cassava starch on rumen pH and blood parameters in dairy cows. The Third International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries, Nakhon Ratchasima, Thailand. (Oral presentation)
- 6) **Rittichai Pilachai**, Thomas Schonewille, Chaiyapas Thamrongyoswittayakul, Suneerat Aiumlamai, Chalong Wachirapakorn, Henk Everts, Marieke Mullaert and Wouter Hendriks. 2011. In vitro efficacy of adsorbents in trapping lipopolysaccharides from rumen fluid of dairy cows. International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN; One Health Concept, 2011, Khon Kaen, Thailand. (Oral presentation)
- 7) **R. Pilachai**, J. Th. Schonewille, A. Chaiyotwittayakun, S. Aiumlamai, C. Wachirapakorn, H. Everts and W. H. Hendriks. 2010. The Effect of Variable Proportions Rapid Degradable Carbohydrate on Rumen pH and Endotoxin Concentrations in Dairy Cows. 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conference 2010, Bangkok, Thailand. (Oral presentation)

- 8) **R. Pilachai**, J. Th. Schonewille, A. Chaiyotwittayakun, S. Aiumlamai, C. Wachirapakorn, H. Everts and W. H. Hendriks. 2010. Replacement of cassava chips by corn meal does not alter rumen pH and rumen lipopolysaccharides in dairy cows fed high concentrate diets. *International Conference on Production diseases in Farm Animals (ICPD) 2010*, Ghent, Belgium. (Poster presentation)
- 9) **R. Pilachai**, J. T. Schonewille, A. Chaiyotwittayakun, S. Aiumlamai, C. Wachirapakorn, H. Everts, and W. H. Hendriks. 2009. The Effects of High Levels of Rumen Degradable Protein on Rumen Fermentation and Rumen Histamine Concentrations in Dairy Cows. *XLth International Symposium on Ruminant Physiology – Clermont Ferrand, France. 6-9 September 2009*. (Poster presentation)
- 10) **Pilachai, R.**, Schonewille, J.Th., Chaiyotwittayakun, A., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Seesupa, S., Everts, H., Hendriks, W.H., 2009. Feeding pattern risk factors for subclinical laminitis of milking cows in small holder dairy farm, Thailand. *The 35th Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference*. Procongress Co. Ltd., Bangkok, Thailand, pp. 577-581. (Poster presentation)
- 11) **Rittichai Pilachai** and Uthai Parinyasutinun. 2001. Synchronization of estrus and fertility rate in dairy cow by luprostiol injection via vulvosubmucosal. *KKU. Animal Agricultural Seminar for 2001*, 26-27 January 2001. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. pp. 260-269. (Oral presentation)