บทที่ 5
วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

โมเลกุลพาหะ (carrier molecule) ที่ใช้สำหรับการเชื่อมกับโมเลกุลแฮปเทนมีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ BSA และ KLH ซึ่งโมเลกุลพาหะแต่ละตัวมีข้อด้อยแตกต่างกัน KLH มีมวลโมเลกุลมาก ($4.5 \times 10^5 - 1.3 \times 10^7$) จึงทำให้มันตกตะกอนได้ง่ายระหว่างการทำปฏิกิริยาการเชื่อม BSA สามารถละลายได้ง่ายและเป็นโมเลกุลพาหะที่ดี แต่ต้องมีปริมาณมากพอที่จะทำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้ (Harlow และ Lane, 1988) ดังนั้นการเชื่อม pKLH กับ cholesterol-hemisuccinate จึงต้องเขย่า (shake or vortex) ตลอดเวลาขณะเชื่อม

KLH จัดเป็นโปรตีน (Bigmani *et al.*, 1996) แปลกปลอมโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาเป็นโมเลกุลพาหะในการเชื่อมกับโคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท (cholesterol-3-hemisuccinate) และนำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันในไก่ไข่ เพราะ KLH เป็นองค์ประกอบของเลือดปู (*Scylla serrata Rathbun*) (Suvatti, 1967) ซึ่งอยู่ในไฟลัม Arthropoda ส่วนไก่อยู่ในไฟลัม Vertebrata จึงทำให้ KLH ที่เป็นองค์ประกอบของเลือดปูมีศักยภาพ (potential) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อสัตว์ต่างไฟลัมสูง (สาระสมบัติและคณะ, 2530) และในขบวนการเชื่อมสารโมเลกุลเล็กกับโมเลกุลพาหะด้วย glutaraldehyde เป็นการเชื่อมระหว่างกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) กับกลุ่มอะมิโน (amino group) ของโคเลสเตอรอลเฮมิซัคซิเนทและโปรตีน (Harlow และ Lane, 1988; Bodanszky และ Bodanszky, 1994) ดังนั้นในเลือดปูมีโปรตีนอยู่หลายชนิดทำให้ได้แอนติเจนหลายชนิด และมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลอยู่ด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนหลายชนิด (antigen mixture) สามารถที่จะเพิ่มความหลากหลายของแอนติบอดีได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับแอนติเจนที่มีศักยภาพในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่ำ (weak immunogen) (Hammerl *et al.*, 1993)

KLH มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 2.02 ml mg^{-1} cm^{-1} ($\varepsilon_{280\ nm}$= 2.02 ml mg^{-1} cm^{-1}) (Bignami *et al.*, 1996) ดังนั้นตามกฎของ Beer's (เมฆฉาย, 2539) สารละลายที่เตรียมได้จากเลือดปูมี KLH เท่ากับ 0.1319/2.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.065 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารโมเลกุลขนาดเล็กสามารถเชื่อมกับโมเลกุลพาหะ เพื่อให้สารโมเลกุลขนาดเล็กนั้นเปลี่ยนคุณสมบัติจากแฮปเทนกลายเป็นแอนติเจนได้ (สาระสมบัติและคณะ, 2530) เช่น การเชื่อมโมเลกุลของเทสทอสเตอร์โรนกับโมเลกุลของฮิวแมนซีรัมอัลบูมิน (เมฆฉาย, 2539) หรือการเชื่อม

กรดโคลานิก (cholanic acid) กับอัลบูมิน (Klopstock *et al.*,1964) หรือการเชื่อมสเตียรอยด์ฮอร์โมนกับเอนไซม์ฮอร์สเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Yoon *et al.*, 1993) จากการทดลองครั้งนี้ได้เชื่อมโมเลกุลแฮปเทน ได้แก่ โคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท (Mw = 486.64) กับสารโมเลกุลพาหะ ได้แก่ KLH (Mw = 4.5 X 10^5 – 1.3 X 10^7) โดยการใช้สารละลายโปรตีนจากเลือดปู 200 มิลลิลิตร มี KLH 200 X 0.065 / 0.188 หรือ 69.15 มิลลิกรัมหรือ 1.54 X 10^{-4} ถึง 5.32 X 10^{-6} โมล และใช้โคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท 100 มิลลิกรัม หรือ 100/486.64 หรือ 0.205 โมล ฉะนั้นในการเชื่อมโมเลกุลพาหะกับโมเลกุลแฮปเทนมีอัตราส่วนโมลเท่ากับ 1331 : 1 ถึง 38533 : 1 (โมเลกุลแฮปเทน:โมเลกุลพาหะ) แล้วนำมากระตุ้นภูมิคุ้มกันในไก่ไข่อายุ 22 สัปดาห์ ปรากฏว่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่อโคเลสเตอรอลของไก่ไข่ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4-5) แสดงว่า การเชื่อมโมเลกุลขนาดเล็กกับโมเลกุลพาหะในตำแหน่งที่ 3 เป็นผลสำเร็จ ตำแหน่งของการเชื่อมโมเลกุลขนาดเล็กกับโมเลกุลพาหะมีผลต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันตามตำแหน่งต่างๆ ของการเชื่อม (Yoon *et al.*, 1993; Beiser *et al.*, 1959) ดั้งนั้น ในการทดลองครั้งต่อไปควรจะมีการศึกษาถึงตำแหน่งของการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลพาหะกับโคเลสเตอรอลในตำแหน่งอื่นของวงแหวน cyclopentanoperhydrophenanthrene ด้วย

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันขึ้นอยู่กับสัตว์ที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (host), แอดจูแวนท์, ปริมาณของแอนติเจน, บริเวณที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (route of injection) และระยะห่างของการกระตุ้น (injection intervals) ตามตารางที่ 4

แอดจูแวนท์ (adjuvant) หรือ สารที่ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองได้ดีขึ้นและนานขึ้น มีหน้าที่สองประการ คือ ประการแรก ป้องกันการสลายตัว (catabolism) อย่างรวดเร็วของแอนติเจนภายในสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการใช้น้ำมันดิน ซึ่งเป็นอิมัลชั่นที่มีน้ำอยู่ในไขมัน (water-in-oil emulsion) หรือสารที่ตกตะกอนในอะลูมิเนียมไฮดร็อกไซด์ (aluminium hydroxide precipitates) ซึ่งแอนติเจนหรืออิมมูโนเจน (immunogen) ถูกดูดซับ (adsorbed) หรือถูกจับ (trapped) ระหว่างการตกตะกอน ส่วนไลโปโซม (liposome) เป็นอิมมูโนเจนที่อยู่บริเวณผิวนอกของชั้นไขมัน (lipid bilayer) ประการที่สอง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ได้ เช่น ลิมโฟไคน์ (lymphokines) จะไปกระตุ้น antigen presenting cells และทำให้เกิดการอักเสบตรงบริเวณที่ฉีด (local inflammatory reaction) สารในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์โดยการฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed bacteria) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides; LPS), ซาโปนิน และ *lipid A* (Roitt *et al.*, 1991)

ดังนั้นควรใช้แอดจูแวนท์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและมีการตอบสนองได้ดีและนานขึ้น

water-in-oil emulsion เป็นอิมัลชั่นที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายแอนติเจนและน้ำมันดินผสม (mineral oil mixture) ในอัตราส่วนผสมที่เท่ากันและมีตัวช่วยที่ทำให้ไขมันละลายในน้ำได้ดีที่เรียกว่า อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) หรือสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) ได้แก่ mannide monooleate (Arlacel A®) ซึ่งจะผสมอยู่ในน้ำมันดินผสมในอัตราส่วนน้ำมันดินต่ออิมัลซิไฟเออร์ เท่ากับ 9 : 1 การผสมกันอย่างสมบูรณ์จะเกิดขึ้นเมื่อแอนติเจนละลายในตัวทำละลายได้ง่าย มีปริมาณน้อยและเติมแอนติเจนทีละน้อย (droplets) ลงใน mineral oil mixture และสามารถทดสอบการผสมกันอย่างสมบูรณ์โดยการหยด emulsion ลงในน้ำเย็นและ emulsion เป็นเม็ดกลมและไม่กระจายตัวในน้ำเย็น (Roitt *et al.*, 1991)

แอดจูแวนท์ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ Freund's adjuvant มี 2 ชนิด ได้แก่ Complete Freund's adjuvant มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์โดยการฆ่าด้วยความร้อน ให้ผลการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ดีและเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง แต่มีข้อด้อยคือทำให้เกิดก้อนเนื้อ (granuloma) เกิดฝีตรงบริเวณที่ฉีด สัตว์เกิดการบวมอักเสบอย่างรุนแรง (สาระสมบัติและคณะ, 2539; Weir, 1978; Harlow และ Lane, 1988) และ Incomplete Freund's adjuvant ไม่มีเชื้อ *M. tuberculosis* แต่กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้คงอยู่นาน (long-life) (Watanabe และ Kumazawa, 1991) ปัจจุบันแอดจูแวนท์ที่นิยมใช้ได้แก่ สารละลายอะลูมิเนียมไฮดร็อกไซด์ที่มีแอนติเจนติดอยู่ เช่น alum precipitate โดยแอดจูแวนท์ชนิดนี้จะไปเพิ่มขนาดของแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะได้

จากการทดลองนี้ได้ใช้น้ำมันดินและสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาณเท่ากัน และมีซาโปนินเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงเป็นแอดจูแวนท์ แต่ไม่มีอิมัลซิไฟเออร์ ปรากฏว่า แอนติบอดี ไตเตอร์ของกลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่มีแอดจูแวนท์นี้สามารถช่วยทำให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก และเมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกันซ้ำ (boosts) หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 2 และ 4 สัปดาห์ ทำให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ยังคงสูงอย่างต่อเนื่อง (สัปดาห์ที่ 6, 8 และ 10) และยังมีแนวโน้มสูงอย่างต่อเนื่อง (plateau) แต่ถ้าใช้น้ำเกลือ (physiological saline) เป็นตัวทำละลายและไม่มีแอดจูแวนท์จะทำให้แอนติบอดีไตเตอร์สูงขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการกระตุ้นครั้งแรก (Weir, 1978) การใช้แอดจูแวนท์ที่ไม่มีอิมัลซิไฟเออร์ จะทำให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดความล่าช้าขณะปฏิบัติงาน เพราะจะต้องมีการผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ทุกครั้งก่อนการฉีด

ส่วนผสมแอนติเจนกับแอดจูแวนท์ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอดจูแวนท์ชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดก้อนเนื้อ (granuloma) และฝีหลังจากการกระตุ้น 2-3 วันโดยการใช้มือสัมผัสบริเวณที่ฉีด ไม่เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังและรุนแรงเหมือน Freund's adjuvants แสดงว่าแอดจูแวนท์ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถใช้ทดแทน Freund's adjuvants ได้อย่างสมบูรณ์ และการทดลองครั้งต่อไปควรจะมีอิมัลซิไฟเออร์ด้วยเพื่อความสะดวกและรวดเร็วของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือเปลี่ยนแอดจูแวนท์ชนิดอื่น เช่น alum precipitate หรือ *lipid A* ในรูปของ liposome

ปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันมากที่สุดไม่สามารถที่จะกำหนดได้ชัดเจน แต่ปริมาณแอนติเจนที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและสัตว์ที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ถ้ามีแอนติเจนมากและมี immunogenicity ที่ดีและไม่ต้องการแอนติบอดีทันทีหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกสามารถที่จะใช้ปริมาณแอนติเจนที่น้อยได้และการกระตุ้นซ้ำครั้งต่อไปก็ใช้ปริมาณของแอนติเจนเท่ากับการกระตุ้นครั้งแรก จะทำให้แอนติบอดีมีการตอบสนองนาน แต่ความเป็นจริงแล้วการกระตุ้นครั้งแรกควรจะใช้ปริมาณแอนติเจนมาก 2-3 เท่าของการกระตุ้นครั้งต่อไป ถ้ามีปริมาณแอนติเจนน้อย (rare antigen) ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นครั้งแรกควรจะน้อยกว่าการกระตุ้นซ้ำครั้งต่อไป ซึ่งในกรณีนี้สามารถที่จะสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าในกรณีแรก (Harlow และ Lane, 1988) จากรายงานของ Gassmann และคณะ (1990) ว่าการกระตุ้นซ้ำด้วยแอนติเจนที่มีปริมาณเท่ากันและปริมาณแอนติเจนทั้งหมดมาก (total volume) จะทำให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูงที่สุด (plateau) ตรวจพบได้เร็วกว่าการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่มีปริมาณทั้งหมดน้อยกว่า (25 *vs* 30 วัน) แต่การตรวจพบแอนติบอดีครั้งแรก (20 วัน) ไม่แตกต่างกัน การกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกด้วยปริมาณแอนติเจนมากและกระตุ้นซ้ำด้วยปริมาณแอนติเจนน้อย (20 และ 10 ไมโครกรัม) จะตรวจพบแอนติบอดีไตเตอร์ได้ช้ากว่าการกระตุ้นครั้งแรกและการกระตุ้นซ้ำด้วยปริมาณแอนติเจนที่เท่ากัน (10, 10 และ 10 ไมโครกรัม) (30 วัน *vs* 20 วัน)

บริเวณที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (route of injection) ขึ้นอยู่กับ ปริมาณของแอนติเจน ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์หรือส่วนประกอบอื่นๆ ที่ฉีดเข้าไปร่วมกับแอนติเจน และระยะเวลาที่แอนติเจนถูกปลดปล่อยเข้าไปในกระแสเลือดหรือน้ำเหลือง บริเวณที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันมีหลายบริเวณ ได้แก่ ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection; *Sc*) ใช้สำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาค (particulate immunogen) มีแอดจูแวนท์หรือไม่มีก็ได้ โดยแอนติเจนสามารถเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่ฉีด แอนติเจนถูกดูดซับ (absorbed) อย่างช้าๆ และการกระตุ้นซ้ำจะทำให้เกิด anaphylactic shock น้อยที่สุด (Weir, 1978) ถ้าแอนติเจนและ Complete Freund's adjuvant มี

ปริมาณมากไม่ควรฉีดเพียงแห่งเดียว จะทำให้เกิดก้อนเนื้อและเกิดฝีได้ง่าย (Harlow และ Lane, 1988) การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection; *im*) แอนติเจนจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ interstitial spaces อย่างช้าๆ เมื่อใช้ร่วมกับ Complete Freund's adjuvant จะให้ผลดีที่สุด มีการสร้างแอนติบอดีอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าไม่มีแอดจูแวนท์จะทำให้แอนติเจนที่ละลายได้ (soluble antigen) ถูกเจือจางและหายไปในที่สุด การฉีดเข้าระหว่างชั้นผิวหนัง (intradermal injection; id) ใช้สำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาคและใช้ร่วมกับแอดจูแวนท์ ให้ผลคล้ายกับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าสู่กระแสเลือด (intravenous; iv) เหมาะสำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาคหรือ alum precipitated ซึ่งแอนติเจนจะเข้าสู่กระแสเลือดได้โดยตรง มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็วและลดลงอย่างรวดเร็ว (not sustained) โดยกระตุ้น reticuloendothelial system ได้แก่ ตับ ปอดและม้าม ซึ่งอาจชักนำให้เกิด pulmonary embolism หรือ lethal anaphylactic shock ไม่ควรใช้กับ Freund's adjuvants หรือสารพิษ ดังนั้นควรจะใช้กับสารละลายบัฟเฟอร์เฉพาะ (physiological buffer and salts) การฉีดเข้าข้อต่อ (intra-articular) เหมาะสำหรับแอนติเจนที่ละลายในน้ำเกลือ ถ้าใช้ water-in-oil emulsion จะไม่เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การฉีดเข้าสู่พังผืดที่เท้า (Foot-pad injection) นิยมใช้กับการทดลอง ถ้าใช้ร่วมกับ Complete Freund's adjuvant จะเกิดบวมพอง (severe swelling) เป็นแผล (ulcer) และเนื้อตาย (necrosis) cholesterol-3-pKLH ที่เตรียมได้เป็นแอนติเจนที่เป็นโปรตีน สามารถละลายได้ในสารละลาย PBS และมีปริมาณมาก การกระตุ้นครั้งแรกใช้แอนติเจน 500 ไมโครกรัมฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถที่จะกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนแบบจำเพาะเจาะจงต่อโคเลสเตอรอลได้และการกระตุ้นซ้ำครั้งที่สองและสามใช้แอนติเจนเท่ากับการกระตุ้นครั้งแรก ฉีดเข้าใต้ผิวหนังเช่นเดียวกันกับครั้งแรก ทำให้แอนติบอดีมีการตอบสนองนานขึ้น (สัปดาห์ที่ 8 และ 10) และยังมีแนวโน้มที่จะสูงอย่างต่อเนื่อง (plateau) โดยไม่เกิดการอักเสบอย่างรุนแรง ไม่เกิดเนื้องอกหรือฝีบริเวณที่ฉีด (หายไปภายใน 2-3 วัน) ดังนั้นควรจะมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลเพียง 2 ครั้งและห่างกัน 4 สัปดาห์ก็เพียงพอสำหรับการตอบสนองต่อแอนติเจน

อายุของสัตว์ทดลองมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สัตว์ที่มีอายุน้อยจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ T-cell dependent ได้ดีกว่าสัตว์ที่มีอายุมาก แต่สัตว์อายุมากจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ T-cell independent ดีกว่าสัตว์ที่มีอายุน้อย (Munns และ Lamont, 1991)

Table 4. Immunogen, animals, routes, dosage, interval injection and adjuvants of immunization

Immunogen	Animal	Route	Dose (mg)	Interval (day)	Adjuvant	Reference
β-lipoprotein	Rabbit	im	22.5	0	Alum	Gero *et al.*, 1959
Brucella abortus	Chicken	iv	1	0,14,28, 42, 56	PBS	Munns and Lamont, 1991
BSA	Chicken	im	2	0,14	CFA	Li *et al.*, 1998
Cholanyl-albumin	Rabbit	3iv, 7im	-	3-4	IFA	Klopstock, 1964
Cholesterol-albumin	Rabbit	1iv, 3im	-	3-4	IFA	Klopstock, 1964
Cholesterol-albumin	Rabbit	im	25	0,7, 14, 21,28,35	-	Bailey *et al.*, 1964
Cholesterol-KLH	Chicken	Sc	0.5	0,14,28	Mineral oil and Saponin	This paper
Cholesterol-rich multilamella	Rat	ip	0.01	0, 2	Lipid A	Dijkstra *et al.*, 1996
Cholesterol-rich multilamella	Mouse	iv	71% mole	0	-	Swartz *et al.*, 1988
Cholesterol-rich multilamella	Mouse	iv	71% mole	0	-	Alving *et al.*, 1996
DNP-BBG	Rabbit	im	5	0	CFA	Engvall and Pearlmann, 1972
E.coli	Cock	iv	10^7org	4	Saline	Malkinson, M., 1965
E.coli	Chicken	im	10^9org	0,14,72	IFA	Shimizu *et al*, 1988
HSA	Rabbit	im	10-30	0	CFA	Engvall and Pearlmann, 1972
Influenza virus	Human	Sc	250 IU	0	Saline	Mathews and Feery, 1978
KLH	Rat	Sc	1	0, 8	Saline	Exon and Talcott, 1995
Maitotoxin-KLH	Mouse	ip	.01-.03	0,14	CFA	Bignami *et al.*, 1996
Murine rotavirus	Chicken	iv	0.01	0	CFA	Yolken *et al.*, 1988
Rabbit-IgG	Sheep	im	-	0	CFA	Engvall and Pearlmann, 1972
SRBC	Chicken	Iv	1	0,14,28, 42, 56	PBS	Munns and Lamont, 1991
T-3-BSA	Rabbit	-	0.1	0	Alum	Beiser *et al.*, 1959
T-3CMO-BSA	Rabbit	id	-	-	CFA	Vaitukaitis *et al.*, 1971
T-3CMO-KLH	Rabbit	Id	-	-	CFA	Vaitukaitis *et al.*, 1971

เอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสของสัตว์พบได้ในน้ำนมเรียกว่า lactoperoxidase สำหรับในพืชมีเกือบทุกชนิด (Maehly, 1950) โดยเฉพาะที่ส่วนเปลือกของพืชตระกูลหัวพบได้มากที่สุด การทดลองนี้จึงได้เตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวไชเท้า (pCRP) มีค่า RZ = 0.45 นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสที่ซื้อมา (Horse Radish Peroxidase; HRP) จาก Sigma ซึ่งมีค่า RZ เท่ากับ 3.04 เป็นผลึกบริสุทธิ์ของเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสที่เตรียมจากหัวฮอร์สแรดิช โดย peroxidase activity ขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่ฮีม (protohemin IX) (Shannon *et al.*, 1966) จากรายงานของ Maehly (1950) รายงานว่า การได้ค่า RZ ต่ำเพราะมีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นในขณะเตรียมเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ (Shannon *et al.*, 1966) Maehly (1950) ได้ตกผลึกเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสด้วยสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ค่า RZ เปลี่ยนจาก 1.4 เป็น 3.0 ดังนั้นควรจะมีตกผลึกของเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสและอิเล็กโตโฟรีซิส (electrophoresis) หรือเทคนิคการกรองด้วยเจล (gel filtration) ก่อนที่จะนำไปใช้งานต่อไป

การหา working titer ของ secondary antibody conjuganted หรือ enzyme-antibody conjugated (EAC) โดยใช้เอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสที่เตรียมได้จากหัวไชเท้าเชื่อมกับแอนติบอดีของกระต่ายที่ต้านซีรัมไก่ (rabbit anti-chicken polyvalent immunoglobulin) ปรากฏว่า ค่า OD ที่วัดได้ต่ำมาก (0.4) อาจเนื่องมาจากอัตราการเสื่อม activity ของเอนไซม์รวดเร็วมาก จากการทดลองในการเตรียม ค่า OD จะลดลงจาก 1.5 เป็น 0.4 ภายในเวลาประมาณ 2 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องมากจาก มีเอนไซม์หลายชนิดอยู่ในสารละลายเดียวกัน อาจมีการทำลายเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสในระหว่างการเก็บ (รูปที่ 4-3) ดังนั้นจึงได้เตรียมการเชื่อมใหม่ ปัญหานี้อาจแก้ไขได้โดยการทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการกรองด้วยเจล (gel filtration) หรือเทคนิคอิเล็กโตโฟรีซิส (electrophoresis)

วิธีการวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยวิธี ELISA เป็นวิธีการที่มีความไวสูง (sensitivity) และสามารถใช้วัดสารปนเปื้อนในอาหารหรือสารแปลกปลอมที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ เช่น สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin), สารพิษ (Bigmani *et al.*, 1996), ยาปฏิชีวนะ, ยาฆ่าแมลง และสารเร่งการเจริญเติบโต (growth promotants) (Exon และ Talcott, 1995) นอกจากนั้น ELISA มีความสัมพันธ์กับวิธีการวัดแอนติบอดีไตเตอร์แบบ passive haemagglutination และ indirect immunofluorescence มากกว่า dye-test และ cross over-linked immunoassay (Balsari *et al.*, 1980) การเคลือบแอนติเจนลงบนไมโครเพลทในรูปโคเลสเตอรอลที่เชื่อมติดกับ KLH ทำให้แอนติเจนเคลือบติดไมโครเพลทได้ดีกว่าการเคลือบด้วยโคเลสเตอรอลที่เป็นผลึก

(crystalline cholesterol) เพราะไมโครเพลทที่ทำด้วย polystyrene ยึดติดกับโปรตีนได้ดีซึ่งสามารถจับกับโปรตีนได้ 300 ng/cm^2 (Harlow และ Lane, 1988) และขึ้นกับชนิดของ polystyrene ด้วย (Kawabata, 1995) การเคลือบทับด้วยเจลาตินที่มีความเข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ เพื่อป้องกันการเกาะของแอนติบอดีบนผิวสัมผัสของ polystyrene (reduced non-specific binding) (Loizou *et al.*, 1985) แอนติบอดีของไก่ที่จับกับโคเลสเตอรอลมีความจำเพาะเจาะจงกับโคเลสเตอรอลที่เชื่อมติดกับ KLH ได้น้อย ยังสามารถจับกับสเตอรอลได้ (Avila *et al.*, 1996) และสเตอรอลที่มีกลุ่ม 3β-hydroxyl (Dijkstra *et al.*,1996) การใช้ polyvalent rabbit anti-chicken antibody ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส ทำให้ความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีของไก่ลดต่ำลง เกิด cross reaction กับโปรตีนชนิดอื่นได้ แต่สามารถลดปัญหานี้ลงได้โดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และล้างหลายๆ ครั้ง (Mezdour *et al.*, 1994)

การวัดความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลจากค่าการดูดกลืนของแสงจะให้ค่าระดับโคเลสเตอรอลในเลือดและไข่แดงของไข่ไก่ที่วัดได้มีค่าสูง (over estimated) กว่าความเป็นจริงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method), โครมาโตกราฟฟีแบบแก๊ส (gas chromatography) และโครมาโตกราฟฟีแบบของเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography) (Jiang *et al.*, 1991) ทั้งนี้วิธีการวัดสี (colorimetric method) ถูกรบกวน (interfere) ด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacyl glycerol) หรือกรดไขมันอิสระที่อยู่ในเลือดหรือไข่แดง (Bohac *et al.*, 1988; Elswyk *et al.*, 1991) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific Liebermann-Burchard acid colorimetric technique) (Bitman และ Wood, 1980) ถึงแม้ว่าการหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีการวัดสีนี้จะมีค่าสูงกว่าความเป็นจริง แต่ในการเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์โคเลสเตอรอล ในการศึกษาได้มีการลดปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระโดยวิธี saponification แล้ว ดังนั้นการวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธีนี้จึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระมีผลต่อการวัดโคเลสเตอรอลไม่มากนัก (Fasce *et al.*, 1972)

หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลด้วย cholesterol-3-pKLH ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม 1678%, 1103% และ 968% ในสัปดาห์ที่ 2 ($P<0.05$), 8 และ 10 ตามลำดับ ($P<0.01$) (รูปที่ 4-5) เมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลครั้งแรก หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุมและลดลงในสัปดาห์ที่ 4 อาจเป็นเพราะการกระตุ้นครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 0 มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล เมื่อได้รับแอนติเจนในครั้งที่สอง

ทำให้แอนติเจนที่กระตุ้นครั้งที่สองนี้ถูกหักล้าง (neutralized) ด้วยฤทธิ์ของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในครั้งแรก จึงทำให้แอนติบอดีที่วัดได้ต่ำ เมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลครั้งที่สาม ระดับแอนติบอดีไตเตอร์จึงสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Abbas *et al.*, 1994) แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีไตเตอร์ของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Alving *et al.*, 1996) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยวิธีนี้สามารถที่จะชักนำ (induced) ให้เกิดแอนติบอดีได้ภายใน 2 สัปดาห์ แต่การใช้ไลโปโซมที่มีโคเลสเตอรอล 71% โมล และมี *lipid A* ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (adjuvant) สามารถชักนำให้เกิดแอนติบอดีไตเตอร์ขึ้นภายใน 3 วันหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก (Swartz *et al.*, 1988) ระดับแอนติบอดีที่วัดได้นี้ดูเหมือนว่า ช่วงระยะเวลาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งที่สอง มีช่วงระยะเวลาสั้นจนเกินไป จึงทำให้การกระตุ้นครั้งที่สองนี้ไปหักล้างฤทธิ์ของแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก การกระตุ้นภูมิคุ้มกันควรจะกระทำเพียง 2 ครั้งห่างกัน 4 สัปดาห์ก็เพียงพอสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน (สาระสมบัติและคณะ, 2530; Abbas *et al.*, 1994; Munns และ Lamont, 1990) การเก็บตัวอย่างเลือดควรจะเก็บทุกๆ สัปดาห์เพื่อติดตามการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างต่อเนื่อง

จากการทดลอง ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะมีระดับโคเลสเตอรอลต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น 57.17% ($P<0.05$), 53.23% ($P<0.01$) และ 30%($P<0.05$) ในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 10 (รูปที่ 4-6) ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของไก่ไข่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลมีปริมาณลดลงเป็น 49.11% และ 62.59% หรือลดลงจาก 96.5 mg/g yolk เป็น 49.1 mg/g yolk และจาก 96.15 mg/g yolk เป็น 35.98 mg/g yolk ในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยผลผลิตไข่ของทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4-9) เช่นเดียวกันกับ Bailey และคณะ (1964) พบว่าปริมาณโคเลสเตอรอลทั้งหมดลดลง 33.53% การทดลองของ Alving และคณะ (1996) รายงานว่า ลดลง 62.5%, 72.5% และ 43.48% ในสัปดาห์ที่ 8, 10 และ 12 หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การทดลองของ Gero และคณะ (1959) พบว่า ลดลง 135.35% ในกระต่ายและ 25.68% ในไก่ไข่ แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ได้รับ cholesterol-3-pKLH แล้วร่างกายมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน แอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลที่ร่างกายของไก่สร้างขึ้น สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด โดยปฏิกิริยา antigen-antibody complex กับ VLDL, LDL และ IDL มากกว่า HDL ที่อยู่ในพลาสมา (Dijkstra *et al.*, 1996) และอยู่ภายใต้การทำงานของ Kupffer cells

หรือ spleenic macrophages (Travis, 1993; Ordovas, 1994) หลังจากเกิดปฏิกิริยา antigen-antibody complex แล้วจะไปกระตุ้นให้คอมพลีเมนต์ (complement) สร้างตัวรับ (C3b receptor) แล้ว LDL ถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดย macrophage (Alving และ Wassef, 1999) หรือแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลนี้ไปยับยั้งการเคลื่อนย้ายไขมันระหว่างไลโปโปรตีนชนิดต่างๆ (Yen *et al.*, 1989) หรือแอนติบอดีที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นมา ผ่านไปยัง follicular epithelium ของรังไข่ (Patterson *et al.*, 1962)

เมื่อไก่ไข่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอายุมากขึ้น ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดจะสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากขบวนการสังเคราะห์โคเลสเตรอลในร่างกาย (Siegel *et al.*, 1995) ในขณะเดียวกันไข่ก็มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของไข่แดง (Wayne *et al.*, 1973) แต่สัดส่วนของการเพิ่มปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าการเพิ่มน้ำหนักของไข่ จึงทำให้ระดับโคเลสเตอรอลค่อนข้างคงที่ (Jiang และ Sim, 1991)

จากรูปที่ 5-1 หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลด้วย cholesterol-3-pKLH ในสัปดาห์ที่ 2 ปรากฏว่า แอนติบอดีไตเตอร์สูงขึ้น ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดต่ำลงเนื่องมาจากแอนติบอดีที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นมีฤทธิ์หักล้างโคเลสเตอรอลที่อยู่ในร่างกายในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีน ในสัปดาห์ที่ 4 แอนตอบอดีไตเตอร์ของทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีระดับแอนติบอดีลดลงเนื่องมาจากแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นในครั้งแรก (สัปดาห์ที่ 0) มีฤทธิ์หักล้างแอนติเจนที่กระตุ้นในครั้งที่สอง จึงทำให้แอนติบอดีไตเตอร์ในสัปดาห์ที่ 4 ลดลงแต่ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดมีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและระดับโคเลสเตอรอลในไข่มีแนวโน้มลดต่ำลง ในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 แอนติบอดีสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เพราะเกิดจากการกระตุ้นซ้ำในครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 4) ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดต่ำลงและระดับโคเลสเตอรอลในไข่ลดลง ($P<0.05$) เนื่องจากแอนติบอดีที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นมามีฤทธิ์หักล้างโคเลสเตอรอลในเลือดให้โคเลสเตอรอลในเลือดลดลง มีผลต่อการส่งผ่านโคเลสเตอรอลในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีนมายังรังไข่น้อยลง จึงทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในไข่ลดน้อยลงตามด้วยและระดับแอนติบอดีไตเตอร์มีความสัมพันธ์ (correlate) กับระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ($P<0.05$)

จากรูปที่ 5-1 จะเห็นได้ว่า ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดจะค่อยๆ ลดลง และมีแนวโน้มเพิ่มสูงมากขึ้น เนื่องมาจากร่างกายสูญเสียโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดหลังจากถูกแทรกแซงด้วยแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นมาต้านโคเลสเตอรอล จึงทำให้ระดับโคเลสเตอรอลลดต่ำลง ร่างกายจำเป็นต้องสร้างโคเลสเตอรอลจากตับขึ้นมาทดแทนในส่วนที่สูญเสียไป (Siegel *et al.*, 1995)

และนอกจากนี้ยังสูญเสียโคเลสเตอรอลในรูปของไข่แดงด้วย ไก่จึงจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลขึ้นมาทดแทนในปริมาณที่สูง เพื่อที่จะทดแทนโคเลสเตอรอลที่สูญเสียทั้งสองทาง เพื่อรักษา homeostasis ไว้นั่นเอง จากรูปที่ 5-2 แสดงความแตกต่างระหว่างระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลกับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับโคเลสเตอรอลระดับโคเลสเตอรอลของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 นั้น มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองสัปดาห์ แสดงว่า โดยความเป็นจริงแล้ว ถึงแม้ว่าในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 ระดับโคเลสเตอรอลมีแนวโน้มสูงขึ้น แต่ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลยังมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ดังนั้น โคเลสเตอรอลน่าจะเป็นตัวส่งข่าว (messenger) ตัวหนึ่งของร่างกาย ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ HMG Co A reductase จากเซลล์ตับ ควบคุมการสังเคราะห์ LDL-receptor ที่เซลล์ตับและควบคุมการขนย้ายโคเลสเตอรอลจากกระแสเลือดไปยังรังไข่ และตัวโคเลสเตอรอลเองยังจัดเป็นข่าว (message) อีกด้วย ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้น ระยะเวลา และ ความจำเพาะเจาะจง (พงษ์เพียจันทร์, 2538) เมื่อโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดมีความเข้มข้นสูงจะทำให้การไหลเวียนของเลือดลดต่ำลง เกิด plaque formation บริเวณผนังด้านในของเส้นเลือด ผนังเส้นเลือดขาดความยืดหยุ่น เส้นผ่านศูนย์กลางของผนังภายในเส้นเลือดลดลง ทำให้ความดันของเลือดสูงขึ้น แต่เมื่อโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดมีความเข้มข้นต่ำ จะทำให้ร่างกายของสัตว์มีการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลของระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายโดยการสร้างโคเลสเตอรอลเพิ่มมากขึ้น ตับสะสมโคเลสเตอรอลเพิ่มมากขึ้นและลดการขับ (excrete) โคเลสเตอรอลให้น้อยลง เวลาจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดและการขับทิ้งของโคเลสเตอรอล โดยความเข้มข้นโคเลสเตอรอลจะลดต่ำลงก่อนความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในไข่แดง และความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดจะเพิ่มขึ้นก่อนความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในไข่แดง ดูเหมือนว่าสัตว์จะพยายามรักษาระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดให้คงที่มากที่สุดเพื่อให้ตัวมันเองรอด (survival) ก่อนที่จะรักษาเผ่าพันธุ์

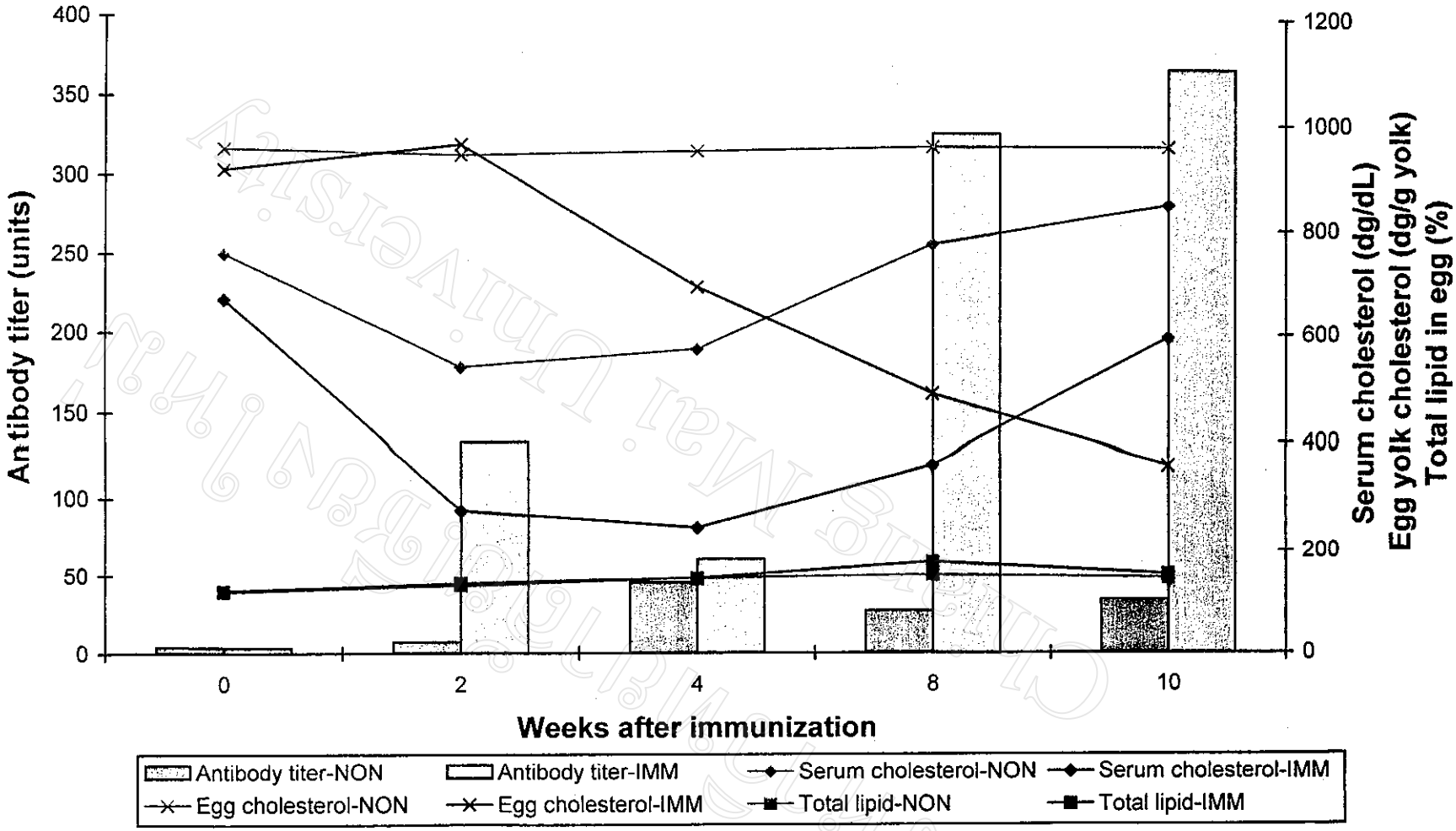

Figure 5-1. Comparison of antibody titer with serum cholesterol, egg yolk cholesterol and total lipids in IMM and NON.

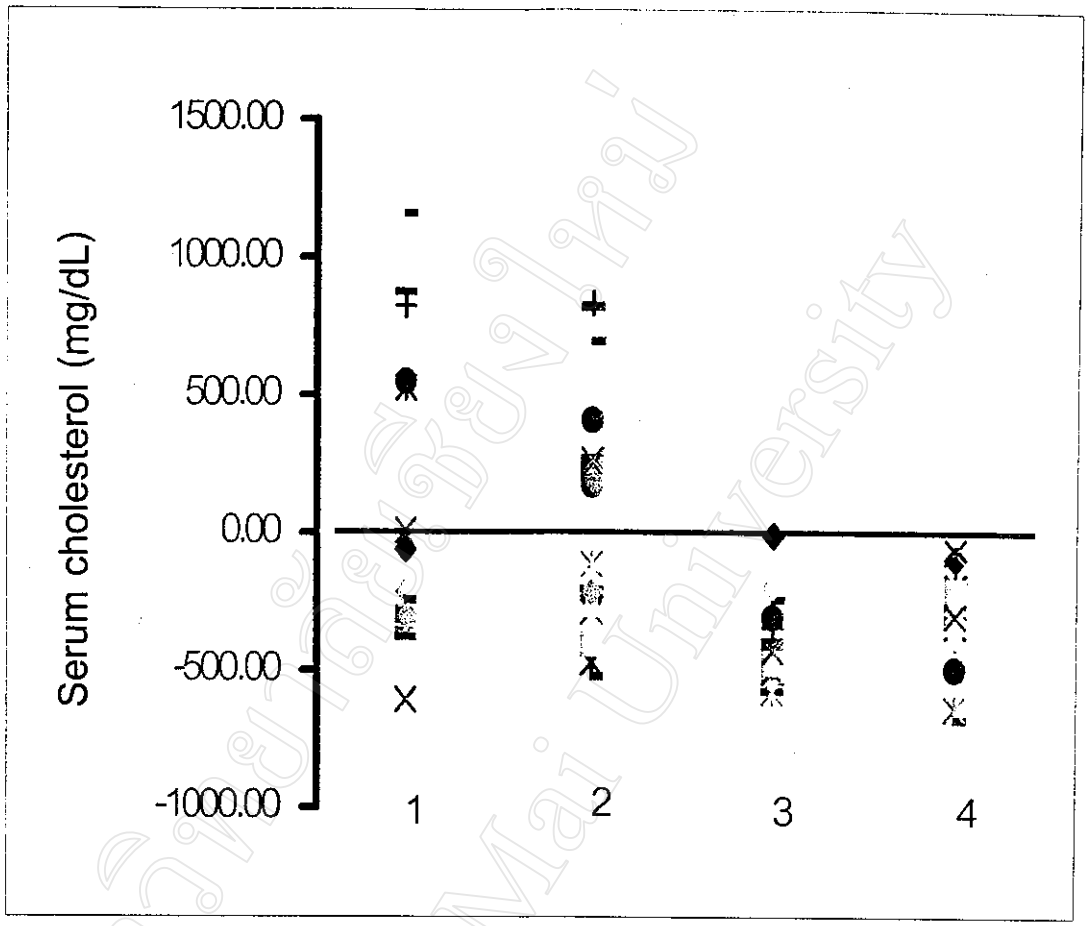

Figure 5-2. Distribution of individual serum cholesterol level in laying hens.

1 = serum cholesterol individual level of NON – average serum cholesterol level of non-immunized at 8th week.

2 = serum cholesterol individual level of NON – average serum cholesterol level of non-immunized at 10th week.

3 = serum cholesterol individual level of IMM – average serum cholesterol level of non-immunized at 8th week.

4 = serum cholesterol individual level of IMM – average serum cholesterol level of non-immunized at 10th week.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

สรุปผลการทดลอง

1 เตรียมโปรตีน partial purified of Keyhole limpet hemocyanin จากเลือดปู (*Scylla serrata Rathbun*) ได้ 0.065 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2 หา working titer ของ secondary antibody conjugated หรือ enzyme-antibody conjugated ได้เท่ากับ 1:2

3 สมการทำนายปริมาณโคเลสเตอรอล โคเลสเตอรอล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ $5.577 \times A_{560} + 0.066$

4 เชื่อมโคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนทกับ pKLH ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ของโคเลส-เตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท

5 เมื่อกระตุ้นไก่ด้วยโคเลสเตอรอล -3- pKLH ในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4 มีการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาตอบสนองต่อโคเลสเตอรอล ในสัปดาห์ที่ 2, 8 และ 10 [75 $\pm$ 70 หน่วย *vs* 1334 $\pm$ 2183 หน่วย ($P<0.05$), 273 $\pm$ 844 หน่วย *vs* 3285 $\pm$ 1459 หน่วย ($P<0.01$) และ 345 $\pm$ 914 หน่วย *vs* 3685 $\pm$ 1262 หน่วย ($P<0.01$) ตามลำดับ]

6 ระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดของไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอ-รอลต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 10 [572.01 $\pm$ 573.75 mg/dL *vs* 245.57 $\pm$ 75.83 mg/dL ($P<0.05$), 774.00 $\pm$ 512.58 mg/dL *vs* 362.00 $\pm$ 176.86 mg/dL ($P<0.01$)และ 850.20 $\pm$ 430.18 mg/dL *vs* 595.80 $\pm$ 227.33 mg/dL($P<0.05$) ตามลำดับ]

7 ระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงของไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 (96.50 $\pm$ 20.52 mg/g yolk *vs* 49.11 $\pm$ 11.98 mg/g yolk และ 96.15 $\pm$ 28.49 mg/g yolk *vs* 35.98 $\pm$ 17.76 mg/g yolk ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

8 เตรียมเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสจากหัวไชเท้า (Chinese Radish Peroxidase) ได้ฮีมมีความเข้มข้น 24.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดส 155.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า RZ = 0.45

9 เปอร์เซ็นต์ไขมันในไข่แดงของไข่ไก่ของทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$)

10 เปอร์เซ็นต์ไข่ของไก่ทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$)

11 น้ำหนักตัวไก่เนื้อของทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$)

12 น้ำหนักตับสดของไก่เนื้อทั้งสองกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ข้อเสนอแนะ

1 การฉีดแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายสัตว์ทดลองควรฉีดเพียง 2 ครั้งก็เพียงพอสำหรับการตอบสนองต่อแอนติเจนได้

2 การวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล ควรจะใช้วิธีเอนไซม์ (enzymatic method) ซึ่งมีความเที่ยงตรง (precision) มากกว่าวิธีการวัดสี และมีราคาไม่แพงมากนักเมื่อเทียบกับโครมาโตกราฟฟีแบบแก๊สและโครมาโตกราฟฟีแบบของเหลวความดันสูง

3 polyvalent rabbit anti-chicken serum ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสนั้นมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) และความสามารถจับกัน (affinity) ต่ำ ควรจะใช้ monoclonal antibody ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงและความสามารถจับกันสูง

4 เอนไซม์เปอร์อ๊อกซิเดสที่ใช้ในการทดลองมีศักยภาพต่ำ มีค่า RZ ต่ำ ควรจะใช้เอนไซม์ที่มีค่า RZ สูงกว่านี้ (มากกว่า 3) โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) หรือเทคนิคการกรองด้วยเจล (gel filtration)

5 การเก็บตัวอย่างเลือดและไข่ควรจะเก็บทุกสัปดาห์ เพราะจะได้ติดตามการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันและการเปลี่ยนแปลงของโคเลสเตอรอลในไข่และเลือดได้

6 การเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลโคเลสเตอรอลกับโมเลกุลพาหะควรเชื่อมกันในตำแหน่งอื่นๆ ของวงแหวน cyclopentanoperhydrophenanthrene

7 แอดจูแวนท์ที่ใช้ควรจะมีอิมัลซิไฟเออร์หรือสเตบิไลเซอร์อยู่ด้วย เพราะหลังจากที่ทำให้แอนติเจนกับน้ำมันดินและซาโปนินผสมกันได้ดีแล้วนำไปกระตุ้นสัตว์ทดลองแล้วทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาทีจะทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันดิน

8 ควรจะมีการหาปริมาณสารประกอบไลโปโปรตีนเชิงซ้อน HDL, LDL, VLDL และ IDL ทั้งในกระแสเลือดและไข่แดง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University