บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 โคเลสเตอรอล (Cholesterol)

โคเลสเตอรอลเป็นสารในกลุ่มสเตียรอยด์ (steroid) มีโครงสร้างเป็น 4 ring โดยมีส่วนที่เป็นนิวเคลียสคือ cyclopentanoperhydrophenanthrene โคเลสเตอรอลประกอบไปด้วยคาร์บอน 27 อะตอม และมีส่วนที่เป็นโพลาร์ (polar) คือหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่ตำแหน่ง 3 ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติเป็น secondary alcohol และมีพันธะคู่ระหว่าง C 5-6 อีกด้วย

โคเลสเตอรอลพบมากในเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ เป็นสารเริ่มต้นของการสังเคราะห์กรดน้ำดี (bile acid) ฮอร์โมนของต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) และโกแนด (gonad) รวมทั้งวิตามินดีนอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการรักษาโครงสร้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งของเซลล์และภายในเซลล์ การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ทำให้สามารถสร้างเป็นเอสเทอร์ (ester) กับกรดไขมันได้ ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ โคเลสเตอรอลจะอยู่ในรูปอิสระ แต่ในพลาสมา 60-70 % จะเป็นรูปเอสเทอร์โดยมีเอนไซม์ lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) ช่วยนำกรดไขมันจากตำแหน่งที่ 2 ของเลซิทิน (lecithin) ส่วนใหญ่ได้แก่กรดลิโนเลอิค (linoleic acid) มาให้โคเลสเตอรอลกลายเป็น cholesteryl linoleate และพบว่าโคเลสเตอรอลที่ดูดซึมผ่านลำไส้เล็กจะสร้างเป็นเอสเทอร์โดยรวมกับกรดโอเลอิค (oleic acid) แล้วรวมอยู่ในไคโลไมครอน (chylomicrons) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ที่สร้างจากเซลล์ลำไส้แล้วถูกนำต่อไปยังตับ (Voet and Voet, 1995)

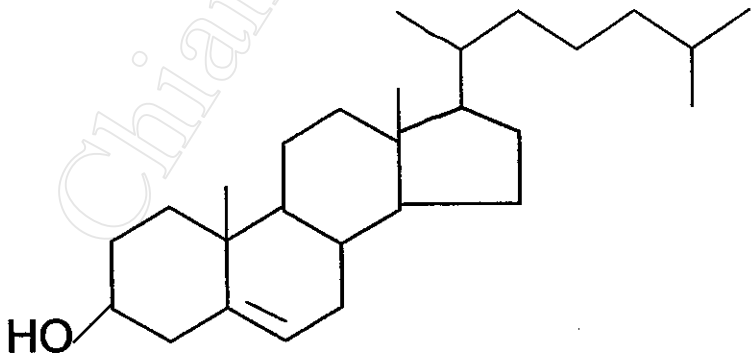

Figure 2-1. Structure of cholesterol (Voet and Voet, 1995).

Table 1. Estimated distribution of the 140 g of cholesterol in 70 kg man (Edward, Wilbert, Howard and John, 1982)

Tissue	Tissue weight, g	Cholesterol	
		Per centage	Weight, g
Alimentary tract	2,500	0.15	3.80
Heart, lungs, kidney, Spleen and blood vessels	2,000	0.25	5.00
Liver	1,700	0.30	5.10
Blood	5,400	0.21	11.30
Muscle	30,000	0.10	30.00
Brain and nervous system	1,600	2.00	32.00
Adrenal glands	12	10.00	1.20
Other glands	100	0.20	0.20
Bone marrow	3,000	0.25	7.50
Connective and adipose tissue, fluids	12,100	0.25	30.20
Skin	4,200	0.30	12.60
Skeleton	7,000	0.01	0.70

2.1.1 การสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Cholesterol biosynthesis)

การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกายเริ่มจากการสังเคราะห์ mevalonate เกิดโดยการรวม acetyl CoA 3 ตัวเข้าด้วยกันนอกไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และที่เนื้อเยื่อของไมโครโซม (microsome) จะได้ β-hydroxy-β-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) ก่อน แล้วเปลี่ยนเป็น mevalonate โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่เกิดได้จำกัดและถูกยับยั้งได้โดยโคเลสเตอรอลจากอาหาร mevalonate จะถูกเปลี่ยนเป็นสารพวก isoprenoid โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) จาก ATP จะได้สารต่าง ๆ คือ 5-monophosphate, 5-pyrophosphate และ 5-pyrophosphate-3-monophosphate ซึ่งสารตัวสุดท้ายนี้จะสลายตัวได้ง่ายมาก โดยปล่อย

หมู่ฟอสเฟต (phosphate) และคาร์บอกซิล (carboxyl) ออกไป ได้สารใหม่คือ 3-isopentenyl pyrophosphate (IPP) และ isomerize ได้เป็น 3,3-dimethylalkyl pyrophosphate (DMAPP) จากนั้น IPPP และ DMAPP จะรวมกันเป็น ceramyl pyrophosphate (C10) ซึ่งจะไปรวมกับ IPPP อีกโมเลกุลหนึ่งได้ farnesyl pyrophosphate (C15) แล้วจึงรวมตัวกันเองอีกครั้งหนึ่ง กลายเป็น squalene (C30) squalene จะเปลี่ยนไปเป็น lanosterol ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องอาศัยออกซิเจนในไมโครโซม มีการเปลี่ยนรูปเป็นวงแหวน โดยจะได้สาร squalene-2, 3-epoxide ก่อน แล้วเอนไซม์ squalene epoxide lanosterol cyclase จะทำให้วงแหวนปิดกลายเป็น lanosterol ขั้นตอนนี้เรียกว่าปฏิกิริยา epoxidation การเปลี่ยน lanosterol ไปเป็น โคเลสเตอรอลมีหลายขั้นตอน โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโครโซมและโปรตีนในไซโตพลาสซึม คือ sterol carrier protein (SCP) เป็นตัวนำสารที่เกิดจากปฏิกิริยาจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง มีการกำจัดหมู่ methyl ออกไป 3 ตัว และเปลี่ยนตำแหน่งของพันธะคู่ (double bond) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดได้ 2 ทาง ทางแรกจะได้ desmosterol เป็นสารระหว่างปฏิกิริยา อีกทางหนึ่งเป็นทางที่เกิดมากมี 7-dehydrocholesterol เป็นสารระหว่างปฏิกิริยา ซึ่งสุดท้าย ทั้ง desmosterol และ 7-dehydrocholesterol จะเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอรอลในที่สุด คาร์บอนอะตอมในโมเลกุลโคเลสเตอรอลได้จากหมู่ methyl และ carboxyl ของอะซิเตท อะตอมของออกซิเจนได้จากโมเลกุลของออกซิเจนในไมโครโซมที่ใช้ในระหว่างปฏิกิริยา epoxidation กระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลเกิดขึ้นในเอนโดพลาสมิกเรทติคูลัม (endoplasmic reticulum)

การสร้างโคเลสเตอรอลระยะแรก เป็นขั้นตอนที่มีความเร็วจำกัด คือการสร้าง mevalonate และถูกยับยั้งได้โดยอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง, 7 α-hydroxycholesterol และ 20 α-hydroxycholesterol สาร 2 ตัวหลังเป็นสารที่เกิดระหว่างปฏิกิริยาการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลไปเป็นน้ำดีและสเตียรอยด์ฮอร์โมน รวมทั้งไลโปโปรตีนที่มีโคเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบ ปฏิกิริยาที่มีอัตราความเร็วจำกัด อีกประการหนึ่งคือ การเปลี่ยน squalene ไปเป็น lanosterol กล่าวคือ การกินอาหารที่มีไขมันสูง ๆ จะเร่งปฏิกิริยาการสร้างโคเลสเตอรอล และขณะอดอาหารจะเกิดการสร้างน้อยลง ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์อาจเพิ่มการสลายตัวของโคเลสเตอรอลได้ ในภาวะที่มีไทรอยด์ฮอร์โมนต่ำ มักเกิดภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงควบคู่กันไปโคเลสเตอรอลถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับ สามารถเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีหรือถูกเอสเทอริไฟด์ (esterified) เป็นโคเลสเตอรอลให้อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยเอนไซม์ acyl-CoA: cholesterol acyl transferase (ACAT) โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ ถูกหลั่งออกมาสู่ระบบหมุนเวียนเลือดในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีน (lipoprotein complex) เรียกว่า very low density lipoprotein

(VLDL) เมื่อ VLDL อยู่ในระบบหมุนเวียนเลือดจะถูกเคลื่อนย้ายไปยังเส้นเลือดฝอยของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันแล้ว VLDL จะถูกเปลี่ยนเป็น intermediate density lipoprotein (IDL) และ low density lipoprotein (LDL) ตามลำดับ (รูปที่ 2-2)

โคเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหารอยู่ในรูป LDL เข้าเซลล์ได้โดยวิธี receptor mediated endocytosis โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ที่อยู่ภายในเซลล์จะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) โดยเอนไซม์ไลโซโซมอลไลเปส (lysosomal lipase) ได้โคเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) หรือถูกเอสเทอริไฟด์อีกครั้งหนึ่งโดยเอนไซม์ ACAT เพื่อเก็บเป็นเม็ดโคเลสเตอรอล (cholesterylester droplet) (รูปที่ 2-3)

อาหารที่มีโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ เป็นองค์ประกอบจะถูกขนย้ายสู่ระบบหมุนเวียนเลือดโดยสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ในลำไส้เรียกว่า ไคโลไมครอน (chylomicrons) เมื่อไคโลไมครอนเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดแล้ว ไตรกลีเซอไรด์จะถูกเคลื่อนย้ายออกไปโดยเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) ได้ไคโลไมครอนเรมแนนท์ (chylomicron remnants) ซึ่งจะจับกับตัวรับอย่างจำเพาะเจาะจงที่ตับ และเข้าสู่ตับโดยวิธี receptor mediated endocytosis โคเลสเตอรอลมีการหมุนเวียนกลับไปมาระหว่างตับและเนื้อเยื่อทั่วไป มี LDL ทำหน้าที่ขนย้ายโคเลสเตอรอลจากตับสู่เนื้อเยื่อทั่วไปและ high density lipoprotein (HDL) ขนย้ายโคเลสเตอรอลกลับมาสู่ตับ โคเลสเตอรอลส่วนเกินจะถูกสะสมในตับและเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี ซึ่งเป็นกลไกป้องกันร่างกายในการสะสมของสารที่ไม่ละลายในน้ำ (water insoluble substance) การได้รับอาหารที่มีไขมันสูงทำให้ในพลาสมามีกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) มาก ตับจะสังเคราะห์ไลโปโปรตีนชนิด VLDL มาก หรือได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะมีผลทำให้โคเลสเตอรอลในตับมาก ดังนั้น ตับจะหยุดการสร้าง LDL receptor เพื่อไม่ให้รับโคเลสเตอรอลจากการย่อยสลาย LDL อีก จึงมีผลทำให้โคเลสเตอรอลในเลือดสูง นำไปสู่การเป็นโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด (artherosclerosis) (Voet and Voet, 1995)

ภาวะที่เลือดมีระดับโคเลสเตอรอลสูง (hypercholesterolemia) เป็นผลจากการสร้าง LDL มากเกินไปหรือใช้ LDL น้อยเกินไป เกิดจากสองสาเหตุ ได้แก่ โรคทางพันธุกรรม (dominant genetic defect) เรียกว่า Familial hypercholesterolemia (FH) เกิดจากความบกพร่องของ LDL-receptor จะพบ LDL สูงกว่าปกติถึง 6-10 เท่า ผู้ป่วยด้วยโรค FH ไม่สามารถนำ LDL เข้าเซลล์ ผู้ป่วยโรคนี้จึงมีอาการ atherosclerosis อย่างรุนแรงและมี myocardial infarction ตั้งแต่อายุยังน้อย ถ้าเป็นแบบ heterozygous ซึ่งขาด receptor ประมาณครึ่งหนึ่ง จะพบว่า LDL สูงขึ้นประมาณ 2-4 เท่าของระดับปกติ และการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจจะเกิดขึ้นช้ากว่าแบบ homozygous คือเป็นในช่วงอายุ 30-60 ปี การบริโภคอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะ

ให้ผลคล้ายโรค FH แต่ไม่รุนแรงเท่า โคเลสเตอรอลในกระแสเลือดที่มากเกินไป เข้าสู่เซลล์ตับโดย ไคโลไมครอนเรมแนนท์ (chylomicron remnant) และมีผลกด (depress) การสังเคราะห์ LDL-receptor เป็นเหตุให้ LDL-receptor ที่ผลิตได้ไม่มีประสิทธิภาพ ให้ผลคล้าย FH (รูปที่ 2-4)

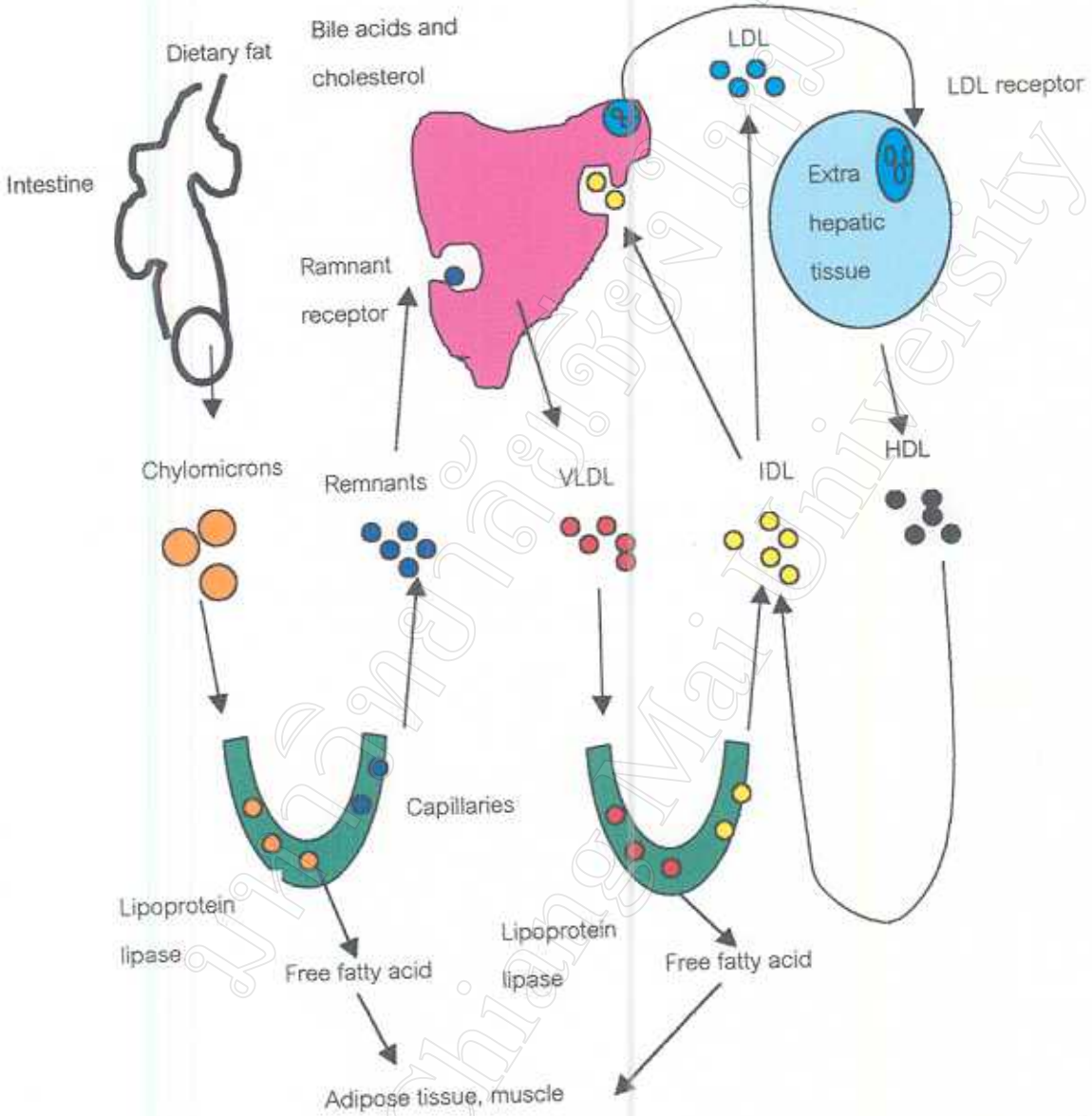

Figure 2-2. Blood cholesterol transportation. Chylomicrons therefore deliver dietary triacylglycerols to muscle and adipose tissue, and dietary cholesterol to the liver. After giving up their triacylglycerols, the very low density lipoproteins (VLDL) remnants, which have also lost some of their apolipoproteins, appear in the circulation first as intermediate density lipoprotein (IDL) and then as low density lipoprotein (LDL) About half of the VLDL, after degradation to IDL and LDL, are taken up by the liver via receptor-mediated endocytosis (Voet and Voet, 1995).

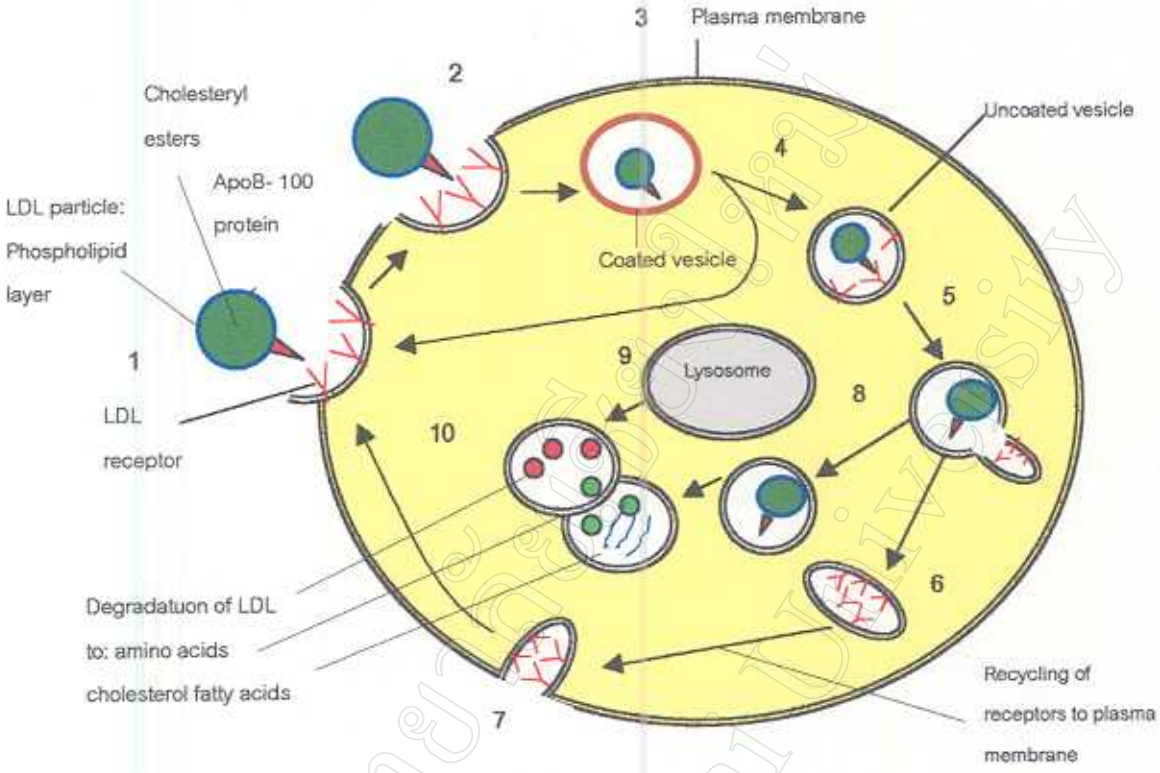

Figure 2-3. Receptor-mediated endocytosis in mammalian cell. LDL receptor is synthesized on the endoplasmic reticulum, processed in the Golgi apparatus, and inserted into the plasma membrane as a component of coated pits. The apolipoprotein B (apoB) component of LDL binds specifically to receptors on the coated pits so that LDL is brought into the cell. Endosomes deliver LDL to lysosomes and recycle LDL receptor to the plasma membrane. Lysosomal degradation of LDL releases cholesterol, whose presence decreases the rate of synthesis of HMG-CoA reductase and LDL receptor while increasing that of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (Voet and Voet, 1995).

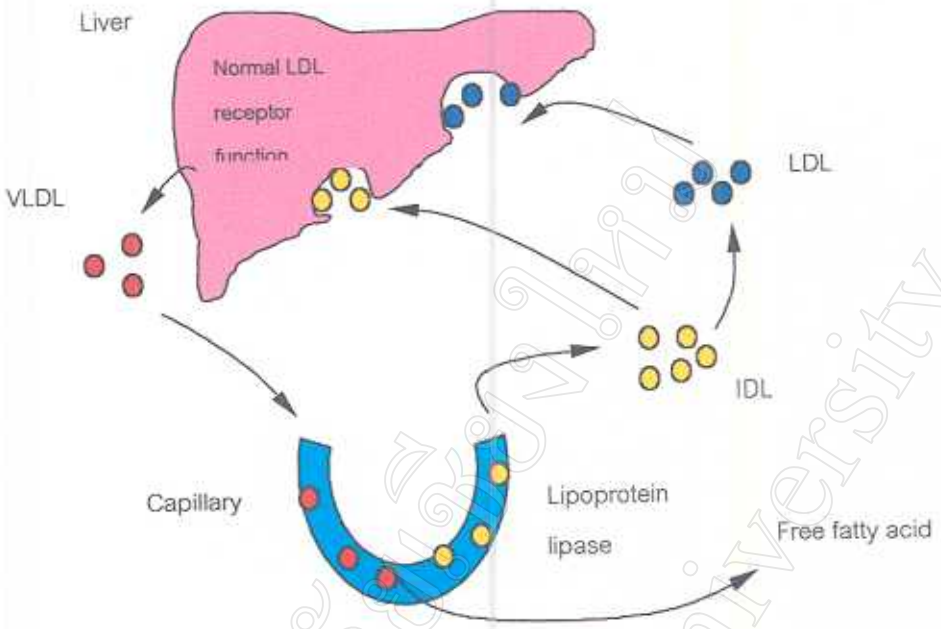

Figure 2-4. Uptake of plasma LDL and control of LDL production by liver LDL receptors.In normal human subjects, VLDL is secreted by the liver and converted to IDL in the capillaries of the peripheral tissues. About half of the plasma IDL particles bind to the LDL receptor and are taken up by the liver. The remainder are converted to LDL at the peripheral tissues (Voet and Voet, 1995).

2.1.2 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

ไลโปโปรตีนประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และโคเลสเตอรอล ถูกหุ้มด้วยอะโปไลโปโปรตีน (apolipoprotein) สามารถกระจายตัวในน้ำและถูกเคลื่อนย้ายในกระแสเลือดโดยการหมุนเวียนในรูปของไลโปโปรตีนประกอบด้วยไตโลไมครอนเป็นตัวขนย้ายไตรกลีเซอร์ไรด์ (triglyceride) และโคเลสเตอรอลที่ได้จากอาหารและที่สร้างจากเซลล์ลำไส้เล็กผ่านเข้ามาทางระบบน้ำเหลืองและเข้าสู่กระแสเลือดโดยผ่านท่อน้ำเหลือง บริเวณทรวงอก (thoracic duct); VLDL เป็นตัวขนย้ายไตรกลีเซอไรด์ที่สร้างขึ้นในร่างกาย; LDL ตัวนำโคเลสเตอรอลที่ออกมาจากตับไปยังส่วนต่าง ๆ ของ ร่างกาย พบว่า LDL มาจาก VLDL ที่ถูกย่อยเอาไตรกลีเซอไรด์ออกไป; HDL เป็นไลโปโปรตีนที่สร้างขึ้นที่ตับและบางส่วนสร้างขึ้นที่ลำไส้ เป็นตัวนำเอาโคเลสเตอรอลออกจากเซลล์เนื้อเยื่อ ต่าง ๆ ทั่วร่างกายกลับมายังตับ

เพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำดี หรือการสร้างสารพวกสเตียรอยด์; IDL ขนย้ายไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ภายในร่างกาย และโคเลสเตอรอลจากตับไปสู่เนื้อเยื่ออื่น ๆ

โคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์จากอาหารที่มีอยู่ในไคโลไมครอนถูกส่งต่อไปยังท่อน้ำเหลืองของลำไส้ก่อนถูกปล่อยออกสู่ท่อน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณทรวงอก ไคโลไมครอนมีที่จับ (binding sites) ในเส้นเลือดฝอยของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในไคโลไมครอนถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ LPL ซึ่งเป็นเอนไซม์ระหว่างเซลล์ (extracellular enzyme) โดยการกระตุ้นของ Apolipoprotein C-II ได้โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และกรดไขมันแล้วถูกเก็บไว้ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ ส่วนไคโลไมครอนที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วจะมีส่วนประกอบของโคเลสเตอรอลในปริมาณที่มากเรียกว่าไคโลไมครอนเรมแนนท์กลับเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดโดยเข้าจับกับที่รับ (receptor site) และถูกนำเข้าสู่เซลล์ตับ

Table 2. Properties of lipoproteins (Voet and Voet, 1995)

	Chylomicrons	VLDL*	IDL	LDL	HDL
Density, g/cm^3	<0.95	<1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
Particle diameter, x10^{-7}	750-12,000	300-800	250-350	180-250	50-120
Particle mass, kD	400,000	10-80,000	5-10,000	2,300	175-360
Protein[a] (%)	1.5-2.5	5-10	15-20	20-25	40-55
Phospholipids[a] (%)	7-9	15-20	22	15-20	20-35
Free cholesterol[a] (%)	1-3	5-10	8	7-10	3-4
Triacylglycerols[b] (%)	84-89	50-65	22	7-10	3-5
Cholesteryl esters[b] (%)	3-5	10-15	30	35-40	12
Major apoprotein	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D,E

[a]Surface components, [b]Core lipids

*VLDL= very low density lipoprotein; IDL= intermediate density lipoprotein; LDL= low density lipoprotein; HDL= high density lipoprotein.

VLDL สังเคราะห์ขึ้นที่ตับทำหน้าที่ขนย้าย ไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ โคเลสเตอรอลและถูกย่อยสลาย (degraded) โดยเอนไซม์ LPL กลายเป็น VLDL remnants หรือ IDL ในระบบหมุนเวียนเลือด การเปลี่ยน VLDL เป็น LDL ทำให้อะโปไลโปโปรตีนทุกตัว (ยกเว้น Apo B-100) จะถูกเคลื่อนย้ายออกและโคเลสเตอรอลที่เหลือถูกเอสเทอริไฟด์โดยเอนไซม์ lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) ซึ่งเอนไซม์นี้จะย้ายกรดไขมันจากคาร์บอนตัวที่สองของเลซิทินไปยังโคเลสเตอรอลได้โคเลสเตอริลเอสเทอร์และ lysolecithin (Drayna *et al.*, 1987; Francone, Gurakar and Fielding, 1989) เซลล์ที่ได้รับโคเลสเตอรอลจากอาหารจะถูกนำผ่านเข้าสู่เซลล์โดยวิธี endocytosis (Brown and Goldstein, 1986) ในรูปของ LDL โดยมี LDL receptor อยู่บริเวณผิวของเซลล์ซึ่งเชื่อมกับ Apo E และ Apo B-100 อย่างจำเพาะเจาะจง LDL receptor อยู่ภายใน coat pits มี carthrin อยู่ภายในอีกชั้นกลายเป็นถุง (vesicle) เมื่อ LDL ทำหน้าที่เป็นลิแกน (ligand) จับกับตัวรับที่จำเพาะเจาะจง (specific receptor) แล้วถูกนำเข้าไปในไลโซโซมเพื่อย่อยสลายอนุภาคของ LDL ได้ remnants receptor ส่วนโคเลสเตอรอลที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ lysosomal lipase ได้โคเลสเตอรอลอิสระ สำหรับโคเลสเตอรอลส่วนเกินที่อยู่ภายในเซลล์ถูกเอสเทอริไฟด์อีกครั้งหนึ่ง เพื่อเก็บไว้ในเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ ACAT เมื่อเกิดการสะสมมากเกินไป จะมีกลไกการป้องกันสองกลไกคือ ระดับโคเลสเตอรอลที่อยู่ภายในเซลล์ระดับสูงจะยับยั้งการสร้าง LDL receptor ทำให้ลดอัตราการเกิด endocytosis และยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลโดยเอนไซม์ HMG Co-A reductase HDL มีหน้าที่ตรงข้ามกับ LDL เนื่องจาก LDL จะนำเอาโคเลสเตอรอลจากเนื้อเยื่อและเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอริลเอสเทอร์ โดยเอนไซม์ที่ชื่อว่า LCAT เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดย Apo A-I

Atherosclerosis เป็นปรากฏการณ์ผนังเส้นเลือดแดงเพิ่มความหนาขึ้นเป็นวิการที่เกิดจากการสะสมไขมันภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ของผนังเส้นเลือดภายในมากเกินไป วิการนี้มีลักษณะหยาบ (fibrous) มีแคลเซียมเกาะ (calcified plaque) ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นเลือดแดงแคบลง และอุดตันในที่สุด เป็นผลให้เลือดแข็งตัว กระแสเลือดจะหยุดไหลทำให้เนื้อเยื่อตาย โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ใน LDL จะสะสมตามเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อขึ้นที่ใต้ผิวหนัง หรือเส้นเอ็นที่เรียกว่า Xanthoma (Robert and Donaldson, 1977) การลดลงของ HDL-C จะเพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อโรคเส้นเลือดแดงของหัวใจ (cardiovascular arteries disease) ดังนั้น การเพิ่ม HDL-C จะเกี่ยวข้องกับการลดอัตราเสี่ยงต่อโรคหัวใจ (Bagatell *et al.*, 1992)

2.1.3 ผลของโคเลสเตอรอลต่อคนและสัตว์

โรคหัวใจ (cardiovascular disease, coronary heart disease, atherosclerosis) นับว่าเป็นปัญหาสำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย ที่มีอุบัติการเกิดขึ้นสูงรองลงจากโรคติดเชื้อ (นันทยาและคณะ, 2523) จากสถิติสาธารณสุขประจำปี 2534 รายงานว่า ทั้งประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคหัวใจจำนวน 31,003 คน คิดเป็นอัตรา 54.7 คนต่อประชากรแสนคน ต่อมาสถิติได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในปี 2539 พบผู้ป่วยโรคหัวใจจำนวน 46,286 คน คิดเป็นอัตรา 77.4 คนต่อประชากรแสนคน ซึ่งนับว่าเป็นอัตราที่สูงมาก ผลการศึกษาพบว่านอกจากการสูบบุหรี่และภาวะความดันเลือดสูงแล้ว 1 ใน 3 สาเหตุใหญ่ของโรคหัวใจมาจากโคเลสเตอรอล (cholesterol) (Stone and McDonald, 1989) โคเลสเตอรอลที่ร่างกายได้รับส่วนใหญ่มาจากอาหาร Ginsberg *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาของคนที่ได้รับอาหารที่มีไขมัน 30 % และเพิ่มไข่ปริมาณ 0 ฟอง (128 มิลลิกรัมโคเลสเตอรอลต่อวัน), 1 ฟอง (283 มิลลิกรัมโคเลสเตอรอลต่อวัน), 2 ฟอง (468 มิลลิกรัมโคเลสเตอรอลต่อวัน) หรือ 4 ฟอง (858 มิลลิกรัมโคเลสเตอรอลต่อวัน) ต่อวันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาเท่ากับ 155, 161, 162 และ 166 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ โคเลสเตอรอลในพลาสมาโดยรวม (plasma total cholesterol) เพิ่มสูงขึ้น 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (คนปกติจะอยู่ระหว่าง 150-200 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์) Schnohr *et al.* (1994) พบว่า การบริโภคไข่ 2 ฟองต่อวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีผลทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาโดยรวมเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 % Roberts, McMurry and Connor (1981) ได้ทดลองในกลุ่มคนสองกลุ่ม กลุ่มแรกได้รับโคเลสเตอรอลจากไข่ทั้งฟอง (415 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) กลุ่มที่สองได้จาก egg substitute (4 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มที่ได้รับไข่ทั้งฟองมีระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ egg substitute อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) มีการหลั่งกรดน้ำดีเพิ่มขึ้น อัตราการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลลดลง การกินอาหารที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูงมีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมมากกว่าผลจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid)

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้มีผู้สนใจศึกษาวิธีการต่าง ๆ ในการลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดกันอย่างมาก Schaefer *et al.* (1995) พบว่าการรับประทานอาหารที่ไขมันต่ำ (15.1 % total fat, 5.0 % saturated fat, 17 mg/1,000 kJ cholesterol) มีผลทำให้ระดับโคเลสเตอรอล LDL-C และ HDL-C ในพลาสมาลดลง 12.5 %, 17.1 % และ 22.8 % ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มคนที่ได้รับอาหารปกติ (35.4 % total fat, 13.8 % saturated fat,

30-35 mg/1,000 kJ cholesterol) Morcos (1997) ได้ทดลองให้น้ำมันปลา (1,800 mg of eicosapentanoic acid (EPA)+ 1,200 mg of docosahexanoic acid (DHA)) และกระเทียมผง 1,200 มิลลิกรัมต่อวัน แก่ผู้มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าระดับโคเลสเตอรอลลดลง 11 % ไตรกลีเซอไรด์ลดลง 34 % และ LDL ลดลง 10 %

นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลจำนวนมากจนมีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดมาก (hypercholesterolemia) สัตว์จะมีผนังหลอดเลือดหนาแข็งตัวและเสียความยืดหยุ่น เนื่องจากมีไขมันและโคเลสเตอรอลมาเกาะเห็นเป็นสีเหลือง (สุรีย์, 2527) ในไก่พบว่าหากปล่อยให้ไก่อ้วนเกินไป นอกจากจะมีผลต่อคุณภาพซากแล้ว ในไก่พ่อแม่พันธุ์ จะทำให้ไข่มีเชื้อของไข่ฟักลดลง อัตราการฟักออกลดลง มีอัตราการตายในระหว่างการไข่เพิ่มขึ้น (วิรัตน์, 2536) ไก่ไข่ที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลประกอบอยู่ มีปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่แดงเพิ่มสูงขึ้น (Weiss *et al.*, 1967) Hermier and Dillon (1992) ได้เสริมโคเลสเตอรอล 2 % ลงในสูตรอาหารไก่พบว่า โคเลสเตอรอลในซีรัมมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นและ VLDL มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นกกระทาที่ได้รับอาหารที่มีไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ และโคเลสเตอรอล 1 % ประกอบอยู่ พบว่า ในระยะเวลา 10 สัปดาห์ มีค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. ของปริมาณโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นจาก 264 $\pm$ 8 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็น 1765 $\pm$ 193 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร พบวิการของโรค atherosclerosis และ พบเนื้อเยื่อตาย เกิดเป็นก้อนเนื้อขึ้นที่ใต้ผิวหนังบริเวณเท้า (hemorrhagic lesions) (Robert and Donaldson, 1977) นกกระทาที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอล 0.5 % เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า นกกระทามีปริมาณโคเลสเตอรอลใน ซีรัมเพิ่มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 แต่ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่แดง ส่วนอัตราการไข่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Hammad, Siegel and Marks, 1996)

การแก้ไขปัญหาดังกล่าวมีอยู่หลายวิธี เช่น การลดปริมาณไขมันในสูตรอาหารลง การคัดเลือกพันธุ์ที่มีความทนต่อภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงและการลดระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายโดยการกระตุ้นให้สัตว์ผลิตแอนติบอดี (antibody) ต่อโคเลสเตอรอลก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีผู้สนใจเป็นอย่างมาก

Oku *et al.* (1993) พบว่า นกกระทาที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ไม่มีโคเลสเตอรอล จะมีขนาดโมเลกุลของ VLDL เล็กกว่ากลุ่มควบคุม Vilchez *et al.* (1992) ได้ลดไขมันในสูตรอาหารนกกระทาลง และทำการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ชนิด

ปาลมิติก (palmitic acid) โอเลอิก (oleic acid) และ ลิโนเลอิก (linoleic acid) พบว่า น้ำหนักตับและน้ำหนักไข่แดงของนกกระทาในกลุ่มทดลองมีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสูตรอาหารปกติ Siegel, Hammand and Marks (1995) ได้คัดเลือกนกกระทาสายพันธุ์ญี่ปุ่น (*Coturnix coturnix japoniga*)ให้มีความทนต่อภาวะ atherosclerosis โดยแบ่งการคัดพันธุ์เป็น 3 สาย คือ unselected controls (CL), high response (HL) และ low response (LL) โดยใช้การตอบสนองต่อฮอร์โมน adrenocorticotropin เป็นเกณฑ์ในการแบ่งสาย จากนั้นให้อาหารที่เสริมด้วย 0.5 % crystalline cholesterol 12 สัปดาห์ พบว่า การวัด atherosclerosis plaque scores ของกลุ่ม LL และ HL เท่ากับ 2.2 และ 3.1 ตามลำดับ ($P<0.5$) ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม LL และ HL ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม CL

2.1.4 แอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล

โคเลสเตอรอลมีขนาด $7.2 \times 5 \times 20 \times 10^{-7}$ มิลลิเมตร ด้านภูมิคุ้มกันวิทยาถือว่าเป็นสารโมเลกุลเล็กโดยตัวมันเองไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (hapten) (Alving and Swartz, 1991) ด้วยเหตุนี้ การเปลี่ยนสภาพของโคเลสเตอรอลให้สามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้ จึงต้องทำให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยการนำมาเชื่อมกับ โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) ตรงตำแหน่งของ polar (3-OH) group ของโคเลสเตอรอล เพื่อทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีคุณสมบัติเป็น immunogenicity หรือแอนติเจน เมื่อนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์ (immunization) จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองนี้เรียกว่า immune response แบ่งออกได้ 2 วิธีคือ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific or native immune response) เกิดขึ้นเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมเป็นครั้งแรกหรือทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response) เกิดขึ้นเมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดแอนติเจนแปลกปลอมนั้นออกไปได้โดยวิธีไม่จำเพาะ ซึ่งแบ่งการตอบสนองออกเป็นสองส่วนคือ humoral immunity (HMI) โดยใช้แอนติบอดีเป็นตัวกำจัดแอนติเจนแปลกปลอมโดยมี B cells และ plasma cells เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญ และ cell mediated immunity (CMI) ตอบสนองโดยการทำหน้าที่ของ T cells เช่น cytolytic T lymphocytes, natural killer cell และ phagocytes การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แบ่งเป็นสามระยะคือ ระยะที่หนึ่ง (cognitive phase) มีการจับกัน (binding) ระหว่างแอนติเจนกับตัวรับที่จำเพาะเจาะจงของลิมโฟซัยท์ที่เจริญเต็มที่ (mature lymphocyte) โดย B lymphocyte จะปล่อยแอนติบอดีออกมาที่ผิวหน้าเซลล์และสามารถจับกับอนุภาค

แปลกปลอม โพลีแซคคาไรด์ หรือไขมันในรูปที่ละลายน้ำได้ ส่วน T lymphocytes มีตัวรับที่ยอมรับลำดับของเปปไทด์สั้น ๆ ของแอนติเจนที่เป็นโปรตีน ระยะที่สอง (activation phase) หลังจากเกิดการเหนี่ยวนำลิมโฟซัยท์ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจง ลิมโฟซัยท์เกิดการแบ่งตัว (proliferation) มีการขยาย (expansion) จำนวนของลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะจงต่อแอนติเจนและขยาย (amplification) การป้องกันให้มากขึ้นและลิมโฟซัยท์จะพัฒนา (differentiate) จากเซลล์ที่มีหน้าที่ยอมรับ (recognition) ไปสู่เซลล์ที่มีหน้าที่กำจัด (elimination) แอนติเจน B lymphocytes เปลี่ยนแปลงจาก antigen-recognizing B lymphocytes เป็น antibody-secreting cells และหลั่งแอนติบอดีเพื่อกำจัดแอนติเจนที่ละลายน้ำ (soluble or extracellular antigen) T lymphocytes บางเซลล์พัฒนาเป็นเซลล์ที่กระตุ้น phagocytes เพื่อกำจัดจุลชีพที่อยู่ระหว่างเซลล์ (extracellular microbes) และ T lymphocytes บางตัวทำหน้าที่โดยตรงในการทำให้เซลล์แตก (lysis) เช่น ไวรัส ในกระบวนการ activation ของลิมโฟซัยท์มีสัญญาณมากระตุ้นอยู่สองชนิดคือ แอนติเจน และ helper cells หรือ accessory cells ระยะสุดท้าย (effector phase) เป็นระยะที่ลิมโฟซัยท์ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ทำหน้าที่กำจัดแอนติเจนโดย effector cell การทำงานต้องมี non-lymphoids cell และกลไกการป้องกันอื่นร่วมด้วย เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดีจะกระตุ้นให้เกิด phagocytosis โดยการกระตุ้นของ neutrophils และ mononuclear phagocytes มีโปรตีนในเลือดที่เรียกว่า complement ช่วยในการทำให้เซลล์แตก และ phagocytosis ของเชื้อจุลชีพ แอนติบอดีชนิดอื่น ๆ กระตุ้น mast cell ให้เกิด degranulation แล้วปล่อย mediator เพื่อต่อสู้กับการติดเชื้อ (infection) และตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute inflamation) T lymphocytes หลั่ง cytokines ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนกระตุ้น phagocytosis และการอักเสบอย่างเฉียบพลัน phagocytes, complement, mast cells, cytokines และ leukocytes ที่ทำให้เกิดการอักเสบทุกตัวล้วนแต่เป็นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสิ้น (Abul, Andrew and Jordan, 1994) Alving and Swartz (1991) ได้ทดลองฉีดแอนติเจน (cholesterol-BSA) ให้แก่กระต่าย และให้อาหารที่เสริมด้วย 1 % โคเลสเตอรอล หลังจากนั้น 15 สัปดาห์พบว่า สัตว์ที่ถูกกระตุ้นจะมีการเพิ่มขึ้นของระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมน้อยกว่ากลุ่มของสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น การวัด atherosclerosis plaque grade (คำนวณเป็น % involvement of aorta surface) มีค่า 30 % ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและ 66 % ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

ตัวที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีนอกจากแอนติเจน (antigen) หรือ immunogen แล้วยังต้องอาศัยสารบางชนิดที่ให้พร้อมกับ immunogen แล้วจะทำให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ immunogen นั้นเพิ่มขึ้นกว่าการให้เข้าไปตามลำพัง สารเหล่านี้เรียก แอดจูแวนท์ (adjuvant) โดยแอดจูแวนท์หรือสารช่วยกระตุ้นนี้ จะทำหน้าที่ปล่อย immunogen ออกไปอย่างช้า ๆ ทำให้อยู่ได้นานขึ้นและกระตุ้นอย่างต่อเนื่องต่อเซลล์ลิมโฟซัยท์ (lymphocyte) และ แมคโครฟาจ (macrophage) สารช่วยกระตุ้นมีหลายชนิดที่ใช้บ่อยในสัตว์ทดลองได้แก่ Freund's complete adjuvant (FCA), ซาโปนิน (saponin) และไลโปโซม (liposome) รวมถึงการใช้ endotoxin จากแบคทีเรีย, lipopolysaccharide (LPS) และสารสังเคราะห์ muramyldipeptide เป็นต้น (อรวดี, 2539) ได้มีงานที่ใช้สารช่วยกระตุ้นเข้ามาช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้นโดยการฉีดแอนติเจนที่ เชื่อม etiocholenic acid และ cholesterol succinate กับ nonliposomal poly lysine complex โดยมี Freund's complete adjuvant (FCA) เป็นสารช่วยกระตุ้น ตรวจสอบผลการกระตุ้นด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) และ Passive hemagglutination พบว่า anti-etiocholinic acid serum จะจำเพาะต่อ โคเลสเตอรอลที่มี 3-OH group ใน A-ring และ anti-cholesterol succinate serum จะจำเพาะต่อ โคเลสเตอรอลที่มี hydrocarbon chain ใน D-ring (Sato *et al.*, 1976) FCA ประกอบด้วย water-in-oil emulsion และ killed *Mycobacterium tuberculosis* หรือ *M. butyricum*, BCG (attenuated Mycobacterium) *Corybacterium parvum* และ *Bardetella pertussis* สารเหล่านี้ นอกจากทำหน้าที่ในการปล่อยแอนติเจนออกมาช้า ๆ แล้วยังกระตุ้น T cell และ แมคโครฟาจอีกด้วย (อรวดี, 2539) Spalding and Heath (1991) ทดลองใช้ DEAE-dextran เป็นสารช่วยกระตุ้นร่วมกับการให้วัคซีนเชื้อตาย *Staphylococcus aureus* ในไก่ พบว่า กลุ่มที่มีหรือไม่มีสารช่วยกระตุ้น มีระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างกัน Katz *et al.* (1994) พบว่า การใช้ dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) เป็นสารช่วยกระตุ้น ร่วมกับการให้วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus vaccines) ในไก่ สามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่าการใช้ FCA เป็นสารช่วยกระตุ้น โดย DDA จะไปกระตุ้นการทำงานของระบบ humoral immunity และ cell mediated immunity Erhard *et al.* (1997) ได้ใช้ไลโปเปปไทด์ (lipopeptide) ชนิด Pam3Cys-Ser-(Lys)4(PCSL) เป็นสารช่วยกระตุ้นร่วมกับการให้วัคซีนป้องกันโรคลำไส้อักเสบติดต่อในไก่ พบว่าระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารช่วยกระตุ้นชนิด FCA Freund's incomplete adjuvant (FIA) และกลุ่มที่ได้รับวัคซีนอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ไม่พบ

ความแตกต่างของปริมาณ Immunoglobulin Y (IgY) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ FCA เป็นสารช่วยกระตุ้น

2.2 การขนย้ายโภชนะจากกระแสเลือดไปยังไข่

สัตว์จำพวก *Avain spp.* เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ (maturity) ร่างกายจะมีการพัฒนาลักษณะทางเพศที่สอง (secondary sexual characteristic) ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน (oestrogen) ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาทางด้านการสืบพันธุ์ได้แก่ช่วงความยาววัน (daylength) ความยาววันที่ยาวขึ้นจะไปกระตุ้นต่อมไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง แฟคเตอร์ (gonadotropin releasing factor, GnRF) กระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้สร้างฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) กระตุ้นให้กระเปาะไข่ (follicle) เกิดการพัฒนาให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและสร้างฮอร์โมนลูทิไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) เพื่อทำให้เกิดการตกไข่ (ovulation) และ LH กระตุ้น granulosa cell ให้สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งโปรเจสเตอโรนนี้จะไปยับยั้งไฮโปธาลามัสไม่ให้สร้าง GnRH เพื่อป้องกัน LH ที่มากเกินไป (รูปที่ 2-5)

การสร้างไข่แต่ละฟองใช้เวลาประมาณ 25 ชั่วโมงโดยสร้างเป็นลำดับขั้น เริ่มจากในรังไข่ที่ประกอบด้วยกระเปาะไข่ จำนวนมาก กระเปาะไข่แต่ละอันมีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-150 ไมโครเมตร กระเปาะไข่ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 35 มิลลิเมตร มีน้ำหนัก 0.08 ถึง 18 กรัม เกิดการตกไข่ (ovulation) ลงมายังท่อนำไข่ (oviduct) ในส่วนที่เรียกว่า infundibulum จะอยู่บริเวณนี้ประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นกระเปาะไข่ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะตกลงมายัง infundibulum อีก กระเปาะไข่ที่ตกลงมาสู่ท่อนำไข่จะถูกหุ้มด้วยอัลบูเมน (albumen) ทันที การสะสมอัลบูเมนจะมากที่สุดในท่อนำไข่ในส่วนที่เรียกว่า magnum อัลบูเมนมีลักษณะข้นและเหนียว (gelatinous) จากนั้นจะมีการเติมน้ำเข้าไป เรียกว่า ไข่ขาว (egg-white) ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง ไข่จะถูกส่งไปยังท่อนำไข่ในส่วน isthmus มีการพอกส่วนของเปลือกไข่ (shell-membranes) ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่ส่วนของ uterus หรือ shell gland ทำให้ไข่มีรูปร่างและมีการหุ้มเปลือกไข่ด้วยไขที่เรียกว่า cuticle ใช้เวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง (รูปที่ 2-6) (Sturkie, 1986)

ส่วนประกอบของไข่แดงส่วนใหญ่ถูกสร้างโดยตับและอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ได้แก่ FSH และ LH และสเตียรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ เอสโตรเจน ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไข่แดงถูกขนย้ายมาทางกระแสเลือด โดยไขมันและโคเลสเตอรอลในตับ

ถูกขนย้ายในรูปของไลโปโปรตีน ซึ่งตับเก็บไขมันอยู่ในรูปเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) หรือเม็ดไขมันรวมทั้งวิตามินที่ละลายในไขมันด้วย (fat–soluble vitamin) มีการขนย้ายโคเลสเตอรอลประมาณ 220 มิลลิกรัม ส่วนวิตามินที่ละลายน้ำถูกขนส่งโดยตรงจากลำไส้เล็กมายังกระเปาะไข่ แร่ธาตุที่อยู่ในไข่แดงอาจอยู่ร่วมกับโปรตีน (mineral bounded protein) ที่เรียกว่า vitellogenin มีอยู่ 2 รูป ได้แก่ lipovitellin และ phosvitin ถูกขนส่งมาในรูปของไลโปโปรตีนด้วยเช่นกัน เมื่อร่างกายได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำหรือไขมันต่ำหรือมีปริมาณโคเลสเตอรอลหรือไขมันในกระแสเลือดต่ำ อาจส่งผลให้การสะสมไขมันหรือโคเลสเตอรอลในไข่มีระดับต่ำด้วยเช่นกัน (Gilbert and Pearson, 1971) ดังนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในไข่คือ ปริมาณโคเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหาร ปริมาณโคเลสเตอรอลที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้น ปริมาณของไลโปโปรตีนที่ใช้เป็นตัวขนส่งโคเลสเตอรอล

แอนติบอดีที่ร่างกายผลิตขึ้นสามารถผ่านไปยังไข่แดงได้ ในรูปของ Immunoglobulin G (IgG) หรือ Immunoglobulin Y (IgY) โดยการผ่านทาง follicular epithelium ของรังไข่ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส ทนค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ได้นานถึง 30 นาที โดยยังคงคุณสมบัติของ IgY อยู่ IgY ที่ได้นี้เมื่อผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร สามารถจับกับโคเลสเตอรอลที่มากับอาหาร ทำให้โคเลสเตอรอลไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งเป็นทางหนึ่งที่ผู้บริโภคจะได้รับจากอาหารที่ได้จากการกระตุ้นแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล ไข่หนึ่งฟองจะมี IgY ประมาณ 83.2 ถึง 105.4 มิลลิกรัมต่อกรัมไข่แดง และไข่แดงจะมี activity ของแอนติบอดีสูงกว่าซีรัมในวันที่ 14-70 หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Sturkie, 1986)

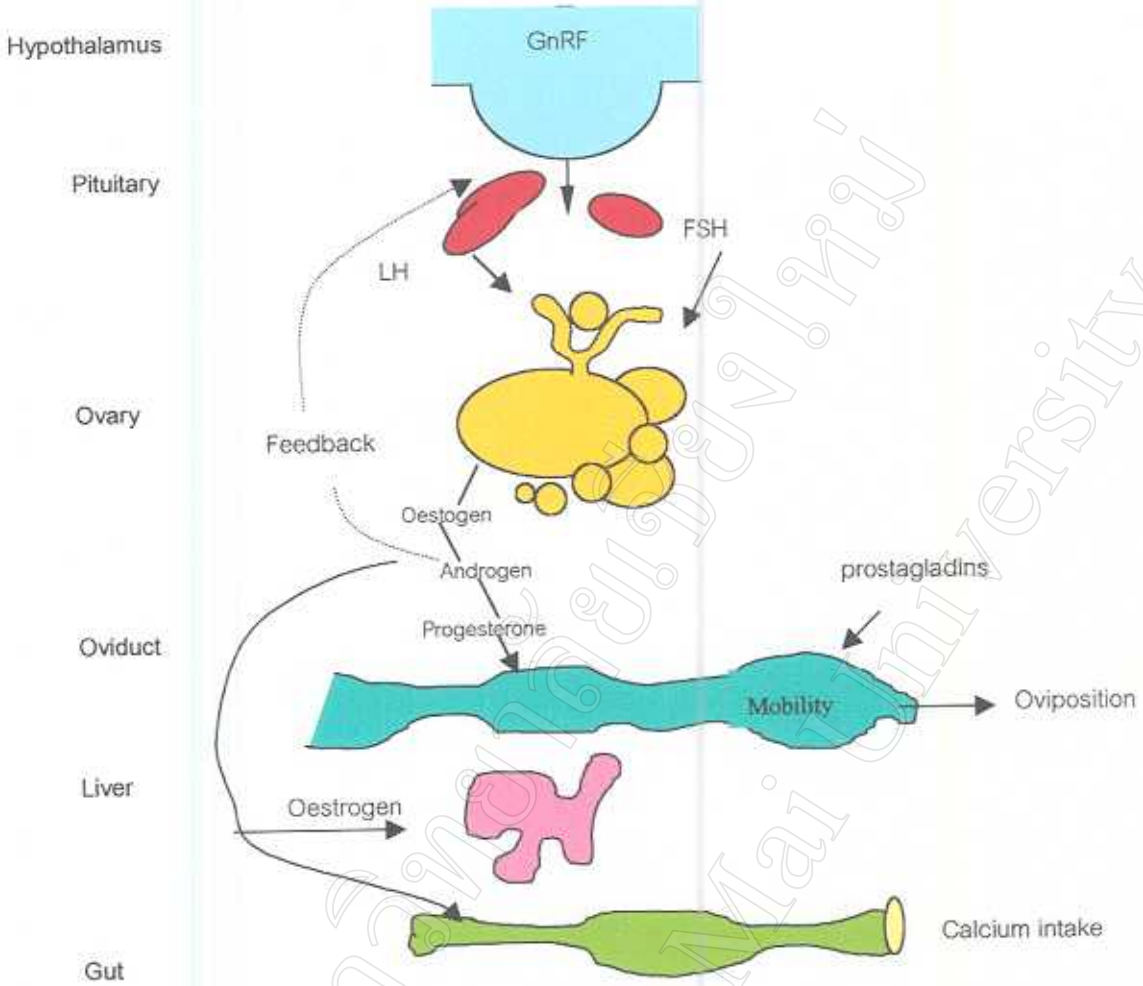

Figure 2-5. Schematic diagram of the major endocrinological interrelationships in the control of ovarian and oviductal function. Gonadotropin releasing factors (GnRF) bring about release of pituitary gonadotropinswhich, in turn, cause a general rise in steroid production by the ovary. The steady rise in circulating oestrogen ultimately depresses the plasma levels of luteinizing hormone (LH) at a time which coincides with the first ovulation. Changes in calcium uptake mechanisms in the gut (oestrogens), formation of the endosteal bone (androgens and oestrogens), growth and differentiation of the oviduct (androgens, oestrogens and progesterone). Follicular maturation on follicle stimulating hormone (FSH), LH acts on the granulosa cells causing an increased output of progesterone. This hormone has the positive feed-back effect, via the hypothalamus, of reinforcing the stimulus for LH release and the interaction of the two hormones culminates in ovulatory surge of LH of short duration. (Gilbert and Pearson, 1971).

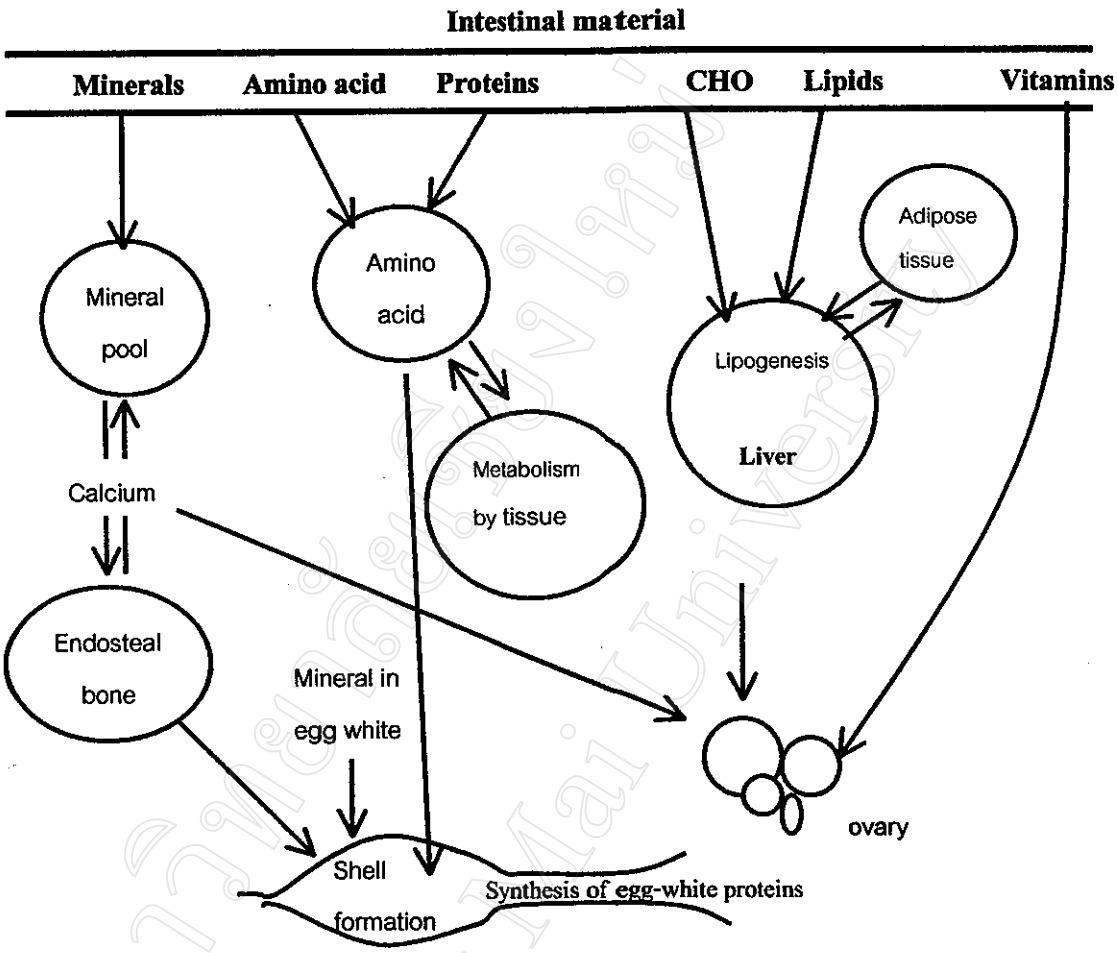

Figure 2-6. Schematic diagram of the major nutritional influences on the formation of an egg. Calcium from mineral pool and endosteal bone were used to form egg shell and egg white. Protein and amino acid metabolite were synthesized to egg white proteins in oviduct and lipoproteins in liver. Lipogenesis used carbohydrate and lipids to form yolk and lipoprotein. Fat-soluble vitamins maybe transported dissolved in yolk lipoprotein. Water-soluble vitamins may be transported dissolved in the water present in the yolk. Products from every pathway will accumulate to ovary (Gilbert and Pearson, 1971).

2.3 ซาโปนิน (Saponin)

ซาโปนิน จากพืชตระกูล *Quillaja saponaria* เป็นอีกตัวหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เป็นสารช่วยกระตุ้น เป็นสารกลุ่มที่มีโครงสร้างไม่แน่นอน จัดเป็นโมเลกุลของ titerpenoid, steroid หรือ steroidal glycoalkaloid ที่จับกับ chain ของน้ำตาลเพียงหนึ่ง chain หรือมากกว่า (Santos *et al.*, 1997) ซึ่งเป็น colloidal glycosides สูตรทั่วไป คือ $C_nH_{2n-8}O_{10}$ เราจะพบซาโปนินได้ในพืช ในทางการค้าจะมีการสกัดเอาซาโปนินจากหญ้า Yucca หรือ Quillaja เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์ (Habermehl and Busam, 1986) ซาโปนินสามารถทำให้ morphology ของเซลล์เปลี่ยนแปลง และจัดเป็น humoral and cellular immunomodulators (Santos *et al.*, 1997) โดยพบว่าโครงสร้างในส่วนที่เป็นกลุ่มคาร์บอกซิลของโมเลกุลน้ำตาลเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของ B-lymphocytes และ T-lymphocytes (Soltysik *et al.*, 1995) ซาโปนินยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ class I major histocompatibility complex (MHC) และ cytotoxic T-lymphocyte (CTL)

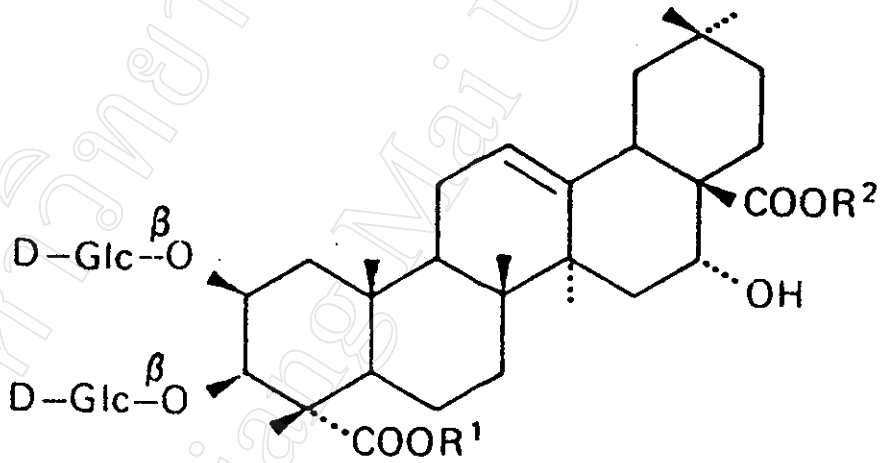

Figure 2-7. Structure of saponin (Habermehl and Busam, 1986).

Gomez, Criado and Ferreiros (1998) ได้มีการศึกษาการผลิตวัคซีนต่อโรคไข้สมองอักเสบในเด็กโดยทำการผลิตแอนติซีรัมต่อ ferric binding protein antigen (FbpA) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อ *Neisseria meningitidis* 3 strains คือ GLD, P000 และ HG7 ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคไข้สมองอักเสบ โดยใช้สารช่วยกระตุ้น 4 ชนิดคือ aluminium hydroxide, Freund's, ซาโปนิน และ Ribi adjuvant system (RAS) ส่วนกลุ่มควบคุมจะให้เฉพาะ phosphate buffer

saline (PBS) เท่านั้น และวัดระดับแอนติบอดีต่อ FbpA พบว่า กลุ่มที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดคือ กลุ่มที่ใช้ ซาโปนิน และ RAS กลุ่มที่ใช้ Freund's และกลุ่มควบคุมมีระดับแอนติบอดีเท่ากัน ส่วนกลุ่มที่ใช้ aluminium hydroxide พบว่าไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน Santos *et al.* (1997) ได้ศึกษาถึงระดับที่เหมาะสมและปลอดภัยในการใช้ซาโปนินจากแหล่งต่าง ๆ เป็นสารช่วยกระตุ้นในการให้วัคซีนป้องกันโรค leishmaniasis ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leishmania donovani* ที่ทำให้เกิดอาการทางผิวหนัง โพรงจมูก คอหอย พบมากในประเทศอินเดีย โดยให้แอนติซีรัมที่เรียกว่า fucose-mannose ligand (FML antigen) พบว่าระดับซาโปนินที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับแอนติบอดีของกลุ่มที่ใช้ซาโปนินและ Freund's ใกล้เคียงกันและอยู่ในระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุม Atkinson *et al.* (1996) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธีป้อนให้กินโดยให้ ovalbumin ในหนูแรท (rat) ที่ระดับต่างๆ และใช้ ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้น พบว่าหนูจะเริ่มสร้างภูมิคุ้มกันที่ 2.5 มิลลิกรัม ovalbumin ($P<0.01$)

2.4 ไลโปโซม (Liposome)

ไลโปโซม คือ อนุภาคหรือถุงกลม ๆ ขนาดเล็กของสารไขมันละลายในน้ำ ซึ่งสารไขมันนี้เกิดจากโมเลกุลของไขมันโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารไขมันประเภทฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ไขมันประเภทนี้ จะมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน จากคุณสมบัตินี้เองทำให้โมเลกุลของไขมันประเภทนี้ (ฟอสโฟลิปิด) ละลายน้ำ ได้โดยการจัดเรียงตัวให้ส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ในขณะเดียวกันจะเอาส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลพวกเดียวกัน มีลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันเรียงซ้อนกันเป็น 2 ชั้น โดยอยู่ในรูปเป็นโครงสร้างของผนังสองชั้น (double layer) ซึ่งอาจมีผนังสองชั้นซ้อนกันมากกว่าหนึ่งชั้น มีชั้นของสารละลายน้ำกั้นอยู่ระหว่างผนังสองชั้น (aqueous phase) และจัดเป็นไลโปโซมประเภทมัลทิลาเมลลา (multilamellar) หรืออาจเป็นไลโปโซมที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียวและจัดเป็นไลโปโซมประเภทยูนิลาเมลลา (unilamellar)

2.4.1 ประเภทของไลโปโซม

ไลโปโซม มีส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิดคล้ายคลึงกับผนังเซลล์ แต่ต่างจากผนังเซลล์คือ ไลโปโซมอาจมีผนัง 2 ชั้นของไขมันมากกว่า 1 ชั้นได้ ระยะห่างระหว่างผนังสองชั้นคือ ชั้นน้ำนั้นจะเกิดจากแรงต่าง ๆ คือ แรงแวนเดอร์วาล (Van der Waal forces) แรงต้านจากประจุ (electrostatic repulsion) และแรงจากปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) ที่เกิดขึ้นระหว่างชั้น

ของผนังสองชั้นของไลโปโซม (อรัญญา, 2539) ความกว้างหรือระยะห่างหรือปริมาตรของชั้นน้ำที่อยู่ระหว่างผนังสองชั้นจะเพิ่มขึ้นได้โดยการใช้โมเลกุลที่มีประจุเติมเป็นส่วนผสมของผนังไลโปโซมดังได้กล่าวมาแล้ว จากขนาด โครงสร้าง และจำนวนชั้นของผนังสองชั้นทำให้สามารถแบ่งไลโปโซมเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้เป็น 3 ประเภทคือ

ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (large multilamellar vesicle, LMV) เป็นไลโปโซมที่มีขนาดใหญ่มีผนังสองชั้นหลายชั้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-35 ไมครอน ปริมาตรที่ถูกกักเก็บในชั้นน้ำประมาณ 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมของไขมัน และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารหรือยาในชั้นน้ำ 5-15% สามารถเตรียมโดยวิธีการใช้มือเขย่า (handshaken) หรือการใช้เครื่องเขย่า (mechanical stirring) ในการเตรียมต้องให้อุณหภูมิขณะเตรียมสูงกว่าอุณหภูมิทรานซิชัน (transition temperature, Tc) ของส่วนประกอบไขมัน อุณหภูมิทรานซิชันคือ อุณหภูมิที่ฟอสโฟลิปิดมีการเปลี่ยนสภาพจากเจลหรือของแข็งไปเป็นสภาพของเหลว อุณหภูมิทรานซิชันเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของไขมันฟอสโฟลิปิดแต่ละตัว

ไลโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (small unilamellar vesicles, SUV) เป็นไลโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียวมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-1 ไมครอน มีปริมาตรที่ถูกกักเก็บในชั้นน้ำเท่ากับ 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมของไขมัน และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารหรือยาในชั้นน้ำ 0.5-1% สามารถเตรียมโดยวิธีเอทธานอล อินเจคชัน (ethanol injection) ที่อุณหภูมิสูง ๆ หรือวิธี ไดอะไลซิส (dialysis) และยังสามารถเตรียมได้จากการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิทรานซิชันของไลโปโซมเพื่อทำลาย LMV ให้เป็น SUV หลังจากผ่านกระบวนการใช้คลื่นเสียงสูงแล้ว จะต้องทิ้งให้ไลโปโซมฟักหรือบ่มตัว (incubate) ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิทรานซิชันระยะหนึ่ง โดยเรียกกระบวนการนี้ว่า การพองตัว (swelling)

ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเป็นชั้นเดียว (large unilamellar vesicles, LUV) เป็นไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเป็นชั้นเดียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-10 ไมครอน มีปริมาตรที่ถูกกักเก็บในชั้นน้ำเท่ากับ 14 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัมของไขมัน และมีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารหรือยาในชั้นน้ำ 35-65% มีปริมาตรในชั้นน้ำมากกว่า LMV ถึง 10 เท่า สามารถเตรียมโดยวิธีรีเวอร์สเฟสอิวาปอเรชัน (Reverse phase evaporation) หรือ อีเทอร์ เวปอไรซ์เซชัน (Ether vaporization) ดังรายงานโดย อรัญญา, 2539

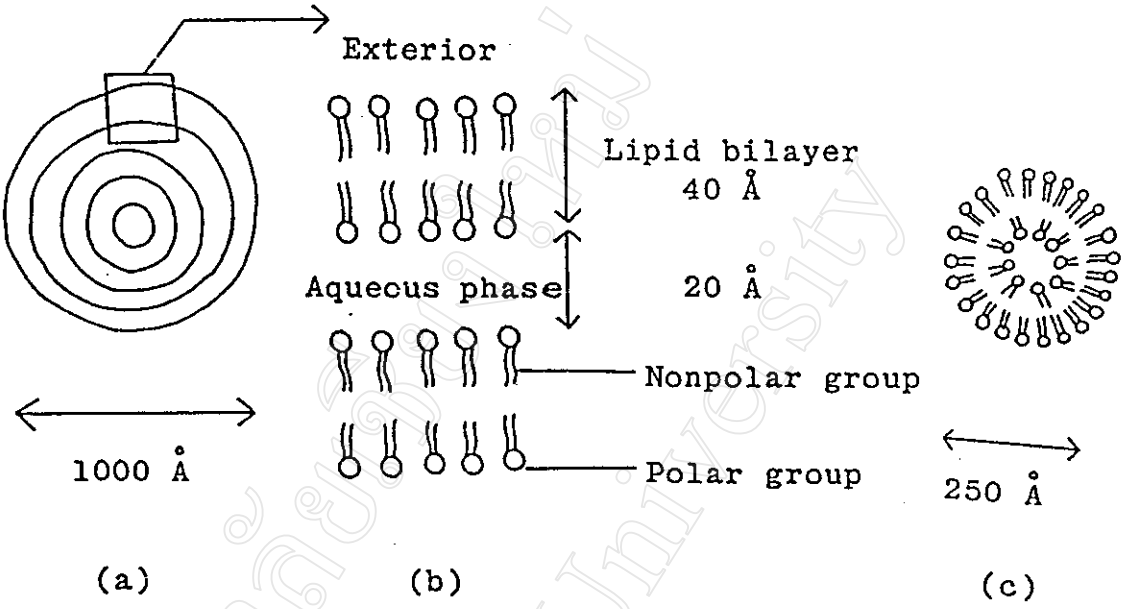

Figure 2-8. Structure of liposome: (a) Multilamellar (b) Double layer of liposome and (c) Unilamellar (อรัญญา, 2539).

2.4.2 ปฏิกิริยาระหว่างไลโปโซมกับเซลล์

หลังจากที่ไลโปโซมเข้าสู่ร่างกายแล้ว บางส่วนของสารหรือตัวยาที่ถูกกักอยู่ภายในจะสามารถผ่านออกจากไลโปโซมได้ในระหว่างเดินทางไปสู่เซลล์ สารหรือตัวยาส่วนใหญ่ที่ถูกกักเก็บอยู่ในไลโปโซมจะถูกปล่อยออกมาทีหลังจากที่ไลโปโซมนั้นทำปฏิกิริยากับเซลล์แล้ว ได้มีการแบ่งกลไกของปฏิกิริยาระหว่างไลโปโซมและเซลล์ในร่างกายออกเป็น 4 ประเภท ซึ่งได้แก่ ปฏิกิริยาการเกาะติด (adsorption) ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนส่วนประกอบไขมัน (lipid transfer หรือ reciprocal transfer) กระบวนการกิน (endocytosis) และกระบวนการรวมตัว (fusion)

ในกระบวนการเกาะติดนั้น ไลโปโซมจะจับกับผิวของผนังเซลล์โดยไม่มีการกินไลโปโซมเข้าไป แรงที่ใช้ในการเกาะติดหรือจับอาจเป็นแรงที่ไม่จำเพาะเจาะจง เช่น แรงระหว่างประจุ (electrostatic) หรือแรงไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หรืออาจจับกันด้วยแรงจำเพาะเจาะจง เช่น แรงระหว่างตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์กับสารภูมิคุ้มกันบนผิวไลโปโซม เป็นต้น สำหรับกระบวนการ

กินนั้น ไลโปโซมจะถูกกินเข้าไปในเซลล์ แล้วถูกไลโซโซม (lysosome) ปล่อยน้ำย่อยออกมาย่อยผนังไลโปโซมทำให้เกิดการปล่อยสารหรือยาที่เก็บกักไว้ในไลโปโซมจะถูกปล่อยเข้าสู่ ไซโตปลาสซึมของเซลล์ในที่สุด ส่วนกระบวนการรวมตัวนั้น ผนังสองชั้นของไขมันของไลโปโซมจะหลอมรวมกับผนังเซลล์พร้อม ๆ กับการปล่อยสารที่เก็บกักออกมา ในกรณีของไลโปโซมประเภทมัลทิลาเมลลานั้น หลังจากที่เกิดกระบวนการหลอมรวมตัวแล้วชั้นไขมันของไลโปโซมยังไม่แตกสลายหมด ดังนั้น จะเห็นว่า การหลอมรวมตัวจะเป็นการนำไลโปโซมเข้าเซลล์คล้ายกับกระบวนการกิน ส่วนกลไกสุดท้ายซึ่งคือกระบวนการแลกเปลี่ยนชั้นไขมันระหว่างผนังเซลล์และผนังไลโปโซม รูปที่ 2-9 ได้แสดงกลไกที่เป็นไปได้ของไลโปโซมประเภทยูนิลาเมลลาและมัลทิลาเมลลาในเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดแก้ว

ใน รูปที่ 2-9 เลขที่ 1 ถึง 5 เป็นกลไกรูปแบบการรวมตัวระหว่างผนังของไลโปโซมและผนังเซลล์ แล้วทำให้มีการปล่อยสารหรือยาที่เก็บกักไว้เข้าสู่เซลล์ได้ ในเลขที่ 2 ถึง 5 เป็นการรวมตัวของไขมันของยูนิลาเมลลาไลโปโซมกับผนังเซลล์ ในเลขที่ 1 เป็นกรณีของไลโปโซมประเภทมัลทิลาเมลลา การหลอมรวมตัวของไขมันชั้นนอกสุดของมัลทิลาเมลลาไลโปโซมจะเป็นการนำไลโปโซมทั้งอันเข้าไปในเซลล์ ซึ่งต่อไปจะเป็นการหลอมรวมตัวกับไลโซโซม แล้วถูกทำลายด้วยน้ำย่อยในไลโซโซม ทำให้สารหรือยาที่ถูกกักไว้ถูกปล่อยออกมาได้ ชั้นไขมันของไลโปโซมที่อยู่บนผนังเซลล์อันเป็นผลจากขั้นตอนเลขที่ 1 นั้น อาจถูกกินโดยเซลล์หรืออาจยังคงอยู่บนผนังเซลล์ ในขั้นตอนหมายเลข 5 เป็นขั้นตอนที่เป็นไปได้ขั้นตอนหนึ่งของกลไกรวมตัว กล่าวคือ ไลโปโซมจะถูกนำเข้าไปในเซลล์โดยการกิน (endocytosis) เสียก่อน จากนั้นจึงมีการรวมตัวระหว่างชั้นไขมันของไลโปโซมและผนังแวคคูโอ (endocytic vacuole) และจากการรวมตัวนี้ ทำให้สารหรือยาที่เก็บกักไว้ในไลโปโซมถูกปล่อยออกมาในไซโตปลาสซึม ไลโปโซมในแวคคูโอนี้อาจไม่เกิดการรวมตัวกัน แต่อาจถูกเอนไซม์จากไลโซโซมย่อยต่อไปได้ในขั้นตอนเลขที่ 6 และ 7 เป็นกระบวนการที่เซลล์กินไลโปโซมประเภทยูนิลาเมลลา (เลขที่ 6) และประเภทมัลทิลาเมลลา (เลขที่ 7) และจะตามด้วยกระบวนการรวมตัวกันระหว่างผนังของไลโปโซมหรือผนังของแวคคูโอกับไลโปโซม เอนไซม์ไลเปส (lipase) จากไลโซโซมจะย่อยผนังชั้นไขมันแล้วทำให้สารหรือยาที่กักเก็บอยู่ภายในถูกปลดปล่อยออกมา จากนั้นสารหรือยาที่ถูกปล่อยออกมาจะสามารถซึมผ่านผนังของแวคคูโอเข้าสู่ไซโตปลาสซึมของเซลล์ต่อไป ในขั้นตอนเลขที่ 8 เป็นปฏิกิริยาการเกาะติดของไลโปโซมบนผิวเซลล์โดยไม่มีการกินไลโปโซมเข้าไป ส่วนในขั้นตอนเลขที่ 9 เป็นการแสดงกลไกเกาะติดที่มีการปล่อยสารหรือยาที่กักไว้ออกมา ซึ่งยานี้จะซึมเข้าเซลล์ด้วยกระบวนการแพร่แบบกสานติ์ (passive

diffusion) สำหรับ ขั้นตอนเลขที่ 10 คือกลไกการแลกเปลี่ยนส่วนประกอบไขมันระหว่างไลโปโซมที่เกาะติดบนผิวเซลล์และไขมันบนผนังเซลล์ โดยขบวนการแพร่แบบแลกเปลี่ยน (exchange diffusion) เชื่อว่ากระบวนการแลกเปลี่ยนไขมันนี้ เกิดขึ้นโดยความช่วยเหลือของโปรตีนที่มีอยู่บนผิวเซลล์ หรือโปรตีนในสารละลายที่เซลล์อยู่ ทั้งนี้กลไกการแลกเปลี่ยนส่วนประกอบของไขมันนี้อาจเกิดจากมีการสร้างโครงสร้างของไขมันในส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ที่จะทำให้ชั้นไขมันของ ไลโปโซมซึ่งอยู่ในสภาพไม่คงตัว สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนประกอบไขมันกับผนังเซลล์ได้ง่ายหลังจากเกาะติดผนังเซลล์ (อรัญญา, 2539)

มักนิยมใช้ไลโปโซมในงานผลิตวัคซีนจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดหรือโปรตีนและเปปไทด์ต่าง ๆ (Alving and Swartz, 1991) ไลโปโซมสามารถป้องกันการติดเชื้อและสามารถกระตุ้น humoural หรือ cellular immunity ได้ดี (Gregoriadis and Allison, 1994; Alving and Swartz, 1991) รวมถึงมีการใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล Swartz *et al.* (1987) ได้เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีในกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโซม 71 % (อัตราส่วนของ cholesterol/dimyristoyl phosphatidylcholine([Myr_2]PtdCho) = 2.5:1) และที่ 43 % (อัตราส่วนของ cholesterol/ [Myr_2]PtdCho = 0.75:1) โดยการใช้เทคนิค monoclonal antibody และวัด % trapped glucose released พบว่า % trapped glucose released ที่การใช้ 71 % สูงกว่าที่ 43 % การวัด trapped glucose released เกิดจากการทำงานของระบบ complement มีผลทำลายผนังของไลโปโซมเป็นผลให้กลูโคสที่ถูกกักเก็บอยู่ในไลโปโซมรั่วไหลออกมา หากมีการทำงานของระบบ complement มาก ก็จะมี % trapped glucose released สูง เมื่อนำซีรัมในสัปดาห์ที่ 14 หลังการกระตุ้นมาหาระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลพบว่ามีระดับแอนติบอดีสูงกว่าสัปดาห์ก่อนการกระตุ้น ($P<0.03$) และระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Alving *et al.*, 1996) Roger *et al.* (1985) ได้ทดลองในหนูแรท โดยใช้พิษงู (Nigerian *Echis carinatus*) ที่ระดับต่างๆ และใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้น ให้โดยการฉีดเข้าเส้นเลือด พบว่าสามารถตอบสนองได้ดีที่สุดเมื่อใช้พิษงู 200 ไมโครกรัม และ 1 มิลลิกรัมโดยการป้อนให้กิน พบว่า หนูสามารถสร้างภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อพิษงูได้ดี โดยไม่มีความเป็นพิษเกิดขึ้น แสดงว่า พิษงูไม่ถูกทำลายแม้ให้โดยการกินในรูปที่เก็บกักไว้ในไลโปโซม

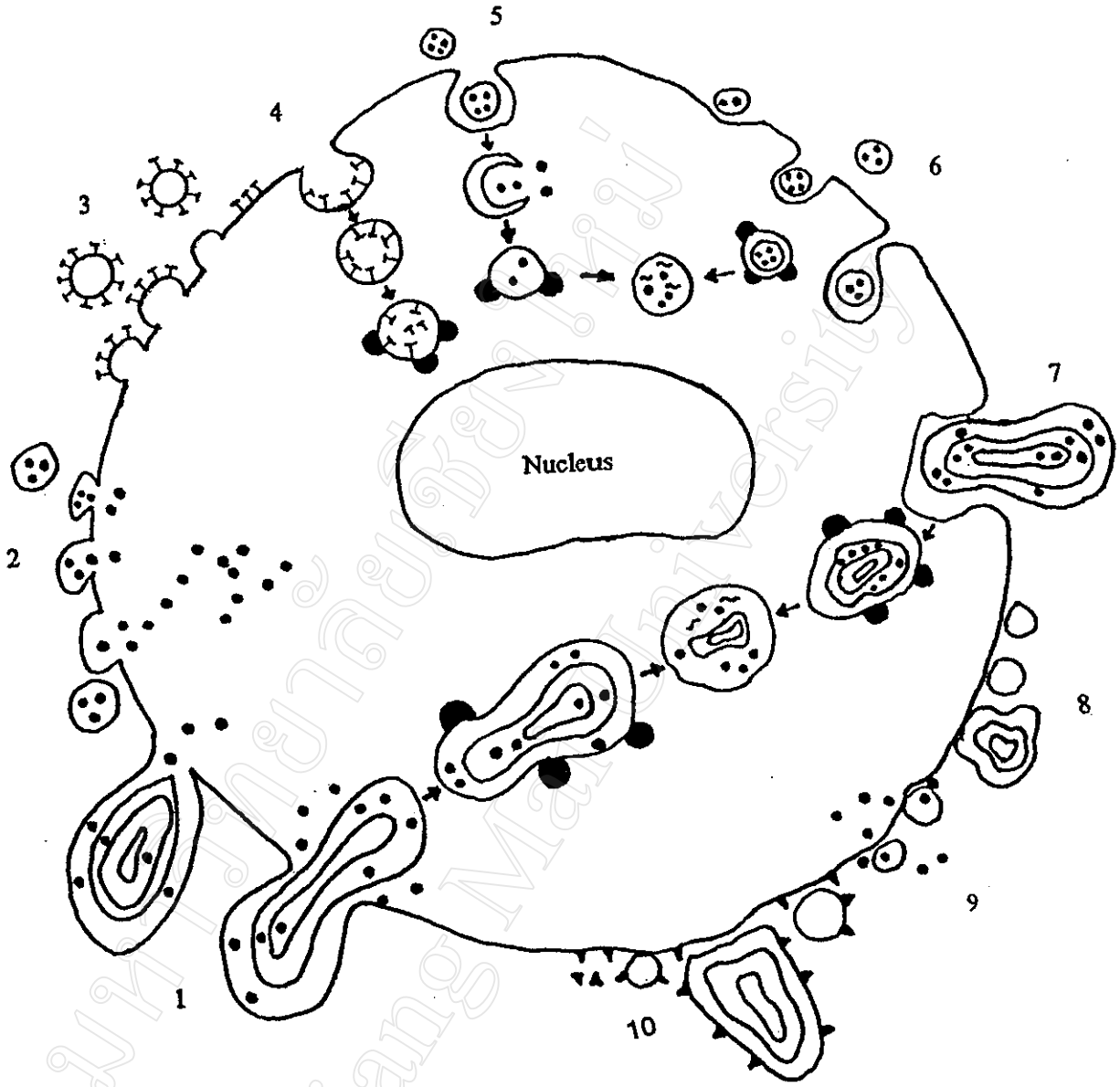

Figure 2-9. Mechanism of liposome degradation: ◯ = Small Unilamellar Vesicle, SUV; (◯) = Multilamellar Vesicle, MLV; ● = immunogen; ● = lysosomal lipase; T = double layer of liposome; ▲= lipid composition of liposome and cell; No.1-5 fusion; No. 6-7 endocytosis of SUV and MLV; No. 8-9 adsorption; No.10 reciprocal transfer lipid (อรัญญา, 2539).