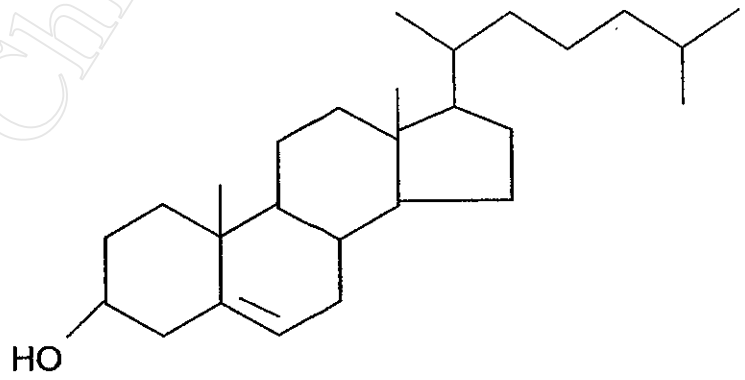
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 โคเลสเตอรอล (Cholesterol)

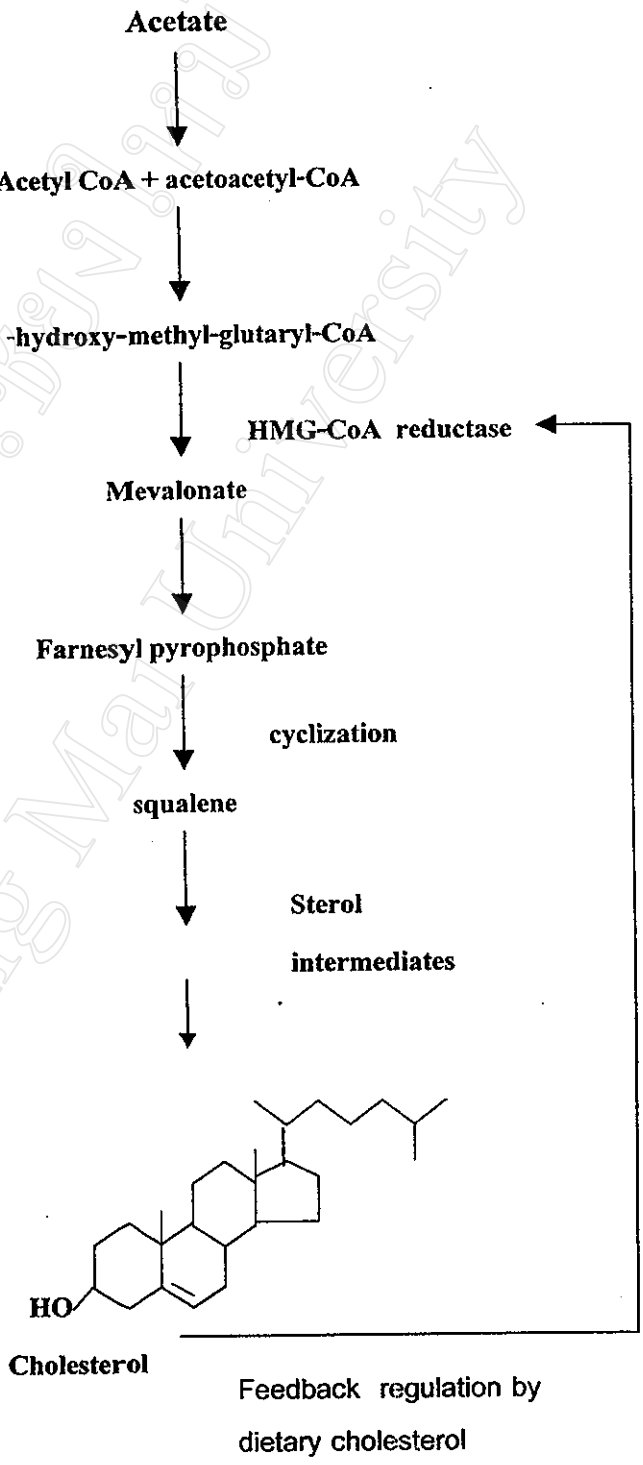
โคเลสเตอรอลจัดอยู่ในกลุ่ม lipids ซึ่งหมายถึงไขมันและสารที่มีลักษณะคล้ายไขมัน โดยเมื่อจำแนกตามโครงสร้างแล้ว โคเลสเตอรอลจะอยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยคาร์บอน 27 อะตอม มีวงแหวน 4 วง เรียกว่า perhydrocyclopentanophenanthrene และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อยู่ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และ 6 (ภาพที่ 2-1) มักพบโคเลสเตอรอลในเนื้อเยื่อและส่วนประกอบอื่นของร่างกายทั้งในคนและสัตว์ เช่นในเลือด ที่เนื้อเยื่อตับ สมอง ประสาท ต่อมหมวกไต (adrenal cortex) ต่อมเพศ (gonad) ไต และผิวหนัง โดยโคเลสเตอรอลที่พบในร่างกายมี 2 ชนิด คือ free cholesterol (ร้อยละ 30) และ esterified cholesterol (ร้อยละ 70) โคเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบของเมมเบรน (membrane) และ myelin sheath รอบๆ เส้นประสาท (nerve axon) นอกจากนี้โคเลสเตอรอลยังเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ เทสทอสเตอโรน (testosterone) และแอนโดรสเตอโรน (androsterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในเพศชาย โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเอสโตรเจน (estrogen) เป็นฮอร์โมนในเพศหญิง นอกจากนั้นโคเลสเตอรอลยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินดี และสามารถเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีที่ทำหน้าที่ emulsify ไขมันในอาหารที่ลำไส้เล็ก (อุษณีย์, 2538)



ภาพที่ 2-1. โครงสร้างของโคเลสเตอรอล (ดัดแปลงจาก Voet and Voet ,1999).

2.2 การสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

ในแต่ละวันร่างกายจะมีการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่ถูกขับออกจากร่างกายประมาณ 2 % และมีอัตราการสร้างโคเลสเตอรอลประมาณ 1 กรัมต่อวัน ทั้งนี้ขึ้นกับการรับประทานอาหารด้วย หากในอาหารที่รับประทานมีโคเลสเตอรอลสูงร่างกายจะสร้างโคเลสเตอรอลเพียง 0.3 กรัมต่อวัน โดยมีตับและลำไส้เล็กเป็นอวัยวะที่สำคัญในการสร้างและเป็นที่เก็บสะสมของโคเลสเตอรอล (Tietz, 1987) การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกายมีขั้นตอนที่สำคัญอยู่ 5 ขั้นตอนได้แก่ การสร้าง mevalonate (C6) การเปลี่ยน mevalonate เป็น isoprenoid (C5) โดยดึง CO_2 ออกจากโมเลกุล การรวม isoprenoid 6 ตัว กลายเป็น squalene (C30) การเปลี่ยนจาก squalene ไปเป็น lanosterol (C30) และการเปลี่ยนรูปจาก lanosterol ไปเป็นโคเลสเตอรอล การสร้าง mevalonate เกิดโดยการรวม acetyl Co A 3 ตัวเข้าด้วยกัน นอกไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และ ที่เนื้อเยื่อของโครโมโซม จะได้ β-hydroxy-β-methylglutaryl-Co A (HMG Co A) แล้วเปลี่ยนเป็น mevalonate โดยเอนไซม์ HMG Co A reductase ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นได้จำกัดและสามารถถูกยับยั้งได้โดยโคเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหาร ขั้นตอนต่อมาเป็นการเปลี่ยน mevalonate ให้เป็น isoprenoid โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phophorylation) ซึ่งได้มาจาก ATP จะทำให้ได้สารต่างๆขึ้น ได้แก่ 5-pyrophosphate, 5-monophosphate และ 5-pyrophosphate-3-monophosphate ซึ่งสารตัวนี้จะสลายตัวได้ง่ายโดยการปล่อยหมู่ฟอสเฟตและคาร์บอกซิลออกไป เกิดสารใหม่คือ 3-isopentenyl pyrophosphate (IPP) และ isomerize ได้เป็น 3,3-dimethylalkyl pyrophosphate (DMAPP) isopentenyl pyrophosphate 4 โมเลกุล และ dimethylalkyl pyrophosphate สองโมเลกุลจะรวมกันเป็นสารตั้งต้นที่ชื่อว่า squalene (C30) หลังจากนั้น squalene จะเปลี่ยนไปเป็น lanosterol โดยใช้ออกซิเจนในโครโมโซม เปลี่ยนรูปเป็นวงแหวน 4 วง (tetracyclic steroid skeletal) และกลายเป็น lanosterol หลังจากนั้น lanosterol จะเปลี่ยนไปเป็นโคเลสเตอรอล โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในโครโมโซม และโปรตีนในไซโตพลาซึม คือ sterol carrier protein (SCP) เป็นตัวนำสารที่จะเกิดจากปฏิกิริยาที่ 1 ไปอีกที่หนึ่ง และมีขั้นตอนต่างๆเช่นการกำจัดหมู่ methyl ออกไป 3 ตัว และในการเปลี่ยน lanosterol เป็นโคเลสเตอรอลนี้ต้องการ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) และออกซิเจน โดยขบวนการทั้งหมดนี้เกิดขึ้นใน endoplasmic reticulum (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2. การสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (อุษณีย์, 2538).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

โคเลสเตอรอลที่ถูกสังเคราะห์จากตับสามารถเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี (bile acid) หรือถูก esterified เป็นโคเลสเตอรอลใช้อยู่ในรูปของเอสเทอร์โดยเอนไซม์ Acyl-Co A: Cholesterol Acyl Transferase (ACAT) โคเลสเตอรอลที่อยู่ในรูปของเอสเทอร์ จะถูกหลั่งออกมาสู่ระบบหมุนเวียนเลือดในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีน (lypoprotein) ซึ่งจะถูกขนส่งไปตามระบบหมุนเวียนเลือดไปยังเส้นเลือดฝอยของกล้ามเนื้อต่อไปตามลำดับ โคเลสเตอรอลในร่างกายได้มา 2 ทาง คือจากการสังเคราะห์ขึ้นและจากอาหารที่รับประทาน อาหารประเภทเนื้อ ไข่แดง อาหารทะเล และผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ทำจากนมมีส่วนประกอบของโคเลสเตอรอลสูงมากซึ่งโคเลสเตอรอลที่ได้จากอาหารเหล่านี้มักอยู่ในรูปของ cholesterol ester ซึ่งจะถูก hydrolyzed ที่ลำไส้เล็กเป็น free cholesterol ก่อนถูกดูดซึมผ่านชั้น mucosa ที่บริเวณลำไส้เล็ก jejunum แล้วเปลี่ยนกลับเป็น cholesterol ester โดยอาศัยเอนไซม์ cholesterol esterase รวมกันอยู่ในรูปของ chylomicron เข้าสู่กระแสโลหิตผ่านทาง lymphatic system หลังจากดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้ว ในพลาสมา (plasma) นั้น โคเลสเตอรอลจะอยู่ในรูป lipoprotein complex ซึ่งประกอบด้วย cholesterol ester, free cholesterol, triglyceride, phospholipids และ lipoprotein โดยโคเลสเตอรอลที่ถูกดูดซึมอยู่ในรูปของ chylomicron แล้วจะขนส่งสู่ตับอย่างรวดเร็ว ตับจะทำหน้าที่สร้าง very low density lipoprotein (VLDL) และ VLDL จะถูก hydrolyzed เอา triglyceride ออกไปใช้เป็นพลังงานโดยอาศัยเอนไซม์ lipoprotein lipase แล้วเปลี่ยนสภาพเป็น low density lipoprotein (LDL) โคเลสเตอรอลมีการหมุนเวียนกลับไปมาระหว่างตับและเนื้อเยื่อทั่วไปโดยมี LDL ทำหน้าที่ขนย้ายโคเลสเตอรอลจากตับสู่เนื้อเยื่อทั่วไป โดย LDL จะผ่านเข้าสู่เซลล์โดยวิธี receptor mediated endocytosis โคเลสเตอรอล เอสเทอร์ที่อยู่ภายในเซลล์จะถูก hydrolyzed โดยเอนไซม์ไลโซโซมอลไลเปส (lysosomal lipase) ได้โคเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) หรือถูก esterified อีกครั้งโดยเอนไซม์ acyl-co A :cholesterol acyl transferase (ACAT) เพื่อเก็บเป็นโคเลสเตอริลเอสเทอร์ (cholesteryl ester droplet) และยังมี high density lipoprotein (HDL) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการขนย้ายโคเลสเตอรอลกลับมาสู่ตับโดย HDL จะนำเอาโคเลสเตอรอลจากเนื้อเยื่อมาเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอริล เอสเทอร์โดยเอนไซม์ lecithin :cholesterol acyl transferase (LCAT) ดังนั้นจึงจัดได้ว่า HDL คือตัวลดโคเลสเตอรอล

2.3 ไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

ไลโปโปรตีนคือสารเชิงซ้อนที่มีโมเลกุลใหญ่ มีแกน (core) ที่ประกอบด้วยไลปิดประเภทโคเลสเตอรอล เอสเทอร์ และ ไตรกลีเซอไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic lipid core) ส่วนบนผิวของโมเลกุลประกอบด้วยสารที่ละลายน้ำ (hydrophilic surface) ประเภท phospholipid , free cholesterol และโปรตีนที่เรียกว่า apoprotein ไลโปโปรตีนที่พบในพลาสมามีอยู่ 5 ชนิดแตกต่างกันตามส่วนประกอบโครงสร้าง และแหล่งสังเคราะห์ แต่ละชนิดมีหน้าที่ช่วยในการขนส่งไลปิดในร่างกายแตกต่างกัน ไคโลไมครอนจะเป็นตัวพาไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากอาหารและที่สร้างจากเซลล์ลำไส้เล็ก ผ่านเข้ามาทาง lymphatic system และเข้าสู่กระแสเลือดโดยผ่านทาง thoracic duct VLDL จะเป็นพาหะที่สำคัญในการนำไตรกลีเซอไรด์ที่สร้างขึ้นในร่างกาย ซึ่งแหล่งสำคัญที่สร้างไตรกลีเซอไรด์ได้แก่ ตับ LDL จะเป็นตัวพาโคเลสเตอรอลที่ออกมาจากตับไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย และยังพบว่า LDL คือ VLDL ที่ถูกย่อยเอาไตรกลีเซอไรด์ออกไป HDL เป็นไลโปโปรตีนที่สร้างขึ้นที่ตับ บางส่วนสามารถสร้างได้ที่ลำไส้ ทำหน้าที่เป็นตัวนำโคเลสเตอรอลออกจากเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายกลับมายังตับเพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำดีหรือสร้างเป็นสารพวกสเตียรอยด์

ตารางที่1. คุณสมบัติของไลโปโปรตีน

	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
%Triaclglycerols[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

ที่มา : Voet and Voet (1999)

เมื่อรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง ทำให้ในพลาสมามีกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) มาก ตับจะสังเคราะห์ไลโปโปรตีนชนิด VLDL มาก หรือทานอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง จะมีผลทำให้โคเลสเตอรอลในตับมาก ตับจะหยุดการสร้าง LDL recepter เพื่อไม่ให้รับโคเลสเตอรอลจากการย่อยสลาย LDL อีก จึงมีผลทำให้มีปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดสูง

2.4 ผลของโคเลสเตอรอลต่อคนและสัตว์

โคเลสเตอรอลเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และยังมีผลเสียในสัตว์อีกด้วย ปกติแล้วในร่างกายมนุษย์จะมีระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma) ประมาณ 200 mg/dL ขึ้นอยู่กับอายุ และปัจจัยอื่นๆ (Martin, 1981) การมีโคเลสเตอรอลในซีรัมต่ำ (hypocholesterolemia) อาจมีสาเหตุมาจากการได้รับอาหารผิดสัดส่วน หรือการย่อยและดูดซึมที่ลำไส้ผิดปกติ หรือเป็นโรคทางพันธุกรรม เช่นโรค Alpha lipoprotein deficiency (Familial HDL deficiency, Trangier 's disease) เนื่องจากขาดเอนไซม์ apo AI, AII อาจเกิดจากมีการสลายตัวของเอนไซม์ apo A มาก หรือเกิดจากความผิดปกติของยีน (gene) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ apo A ทำให้มีโคเลสเตอรอลในเลือดต่ำ ไตรกลีเซอไรด์สูง HDL ลดลงทำให้มีการตั้งของโคเลสเตอรอลในรูปเอสเทอร์ตามอวัยวะต่างๆ เช่น ต่อมทอนซิล ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ทำให้อวัยวะเหล่านี้มีขนาดโตขึ้นและอาจมีไขมันไปเกาะที่เส้นประสาท ทำให้มีอาการทางประสาทร่วมด้วย ซึ่งโรคนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ด้วย ภาวะการเกิด hypocholesterolemia มักพบในกลุ่มที่เป็นโรค hyperthyroidism, Liver disease with hepato-cellular damage การมีโคเลสเตอรอลต่ำเป็นสาเหตุในการเกิดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งโดย Siemianowicz *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปอดจำนวน 135 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ 39 คน พบว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดมีระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายต่ำ (hypocholesterolemia) และมีระดับไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติ นอกจากนี้แล้ว การมีโคเลสเตอรอลในเลือดต่ำยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรค liver disease, hyperthyroidism (Sassolas and Cartier, 1999) โดยเฉพาะการเกิดโรคตับเรื้อรังเนื่องจากตับเป็นอวัยวะสำคัญในการเกิดเมตาบอลิซึมของโคเลสเตอรอล (D'Arienzo *et al.*, 1998) จากการเปรียบเทียบระหว่างผู้ชายอายุ 46 ปี ที่มีโคเลสเตอรอลสูง (261 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) 39 คน และโคเลสเตอรอลต่ำ (151 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) 19 คน พบว่าระบบภูมิคุ้มกันในกลุ่มคนที่มีโคเลสเตอรอลต่ำมีลิมโฟซัยท์ T cell และ CD8+ น้อยกว่ากลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลสูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Muldoon *et al.*, 1997)

Levy *et al.* (2000) ได้รายงานว่าในผู้ป่วยเซลล์ของระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract)อักเสบเรื้อรัง (chronic inflammatory) จะอยู่ในภาวะมีโคเลสเตอรอลต่ำ และได้ทำการตรวจผู้ป่วยโรคนี้พบว่ามีระดับ LDL ต่ำกว่าปกติ

ถ้าร่างกายมีโคเลสเตอรอลในปริมาณสูงเกินไปโคเลสเตอรอลส่วนเกินนั้นจะถูกสะสมในตับและเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี ซึ่งเป็นกลไกของร่างกายในการป้องกันการสะสมของสารที่ไม่ละลายในน้ำ (water insoluble substance) แต่ถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดโคเลสเตอรอลส่วนเกินออกได้หรือยังมีการสะสมอยู่ในปริมาณมากจะเป็นสาเหตุของโรคต่างๆได้เช่นการเกิดสภาพการอุดตันในหลอดเลือด (atherosclerosis) หรือที่เรียกกันว่า โรคหลอดเลือดแดงแข็งซึ่งเกิดจากการสะสมของโคเลสเตอรอลในปริมาณมากๆมาเกาะอยู่ที่ผนังของหลอดเลือดทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแคบลง แรงดันเลือดสูงขึ้น เนื่องจากมีแคลเซียมมาเกาะที่ผนังหลอดเลือดมากขึ้น ทำให้เส้นเลือดเปราะและขาดความยืดหยุ่น เป็นผลให้ผนังเส้นเลือดแตกได้ง่าย โดยเฉพาะถ้าเกิดเหตุการณ์นี้กับหัวใจ เลือดและออกซิเจนไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจน้อยลงจะทำให้เกิดโรค coronary heart disease (CHD) ผู้ป่วยจะมีอาการเจ็บหน้าอกเป็นๆหายๆ จนเมื่อมีการอุดตันของ coronary artery แล้ว ก็จะทำให้เกิดภาวะ myocardiac infraction กว่า 50 % ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจเกิดจาก CHD มีสาเหตุที่สำคัญจากโรค atherosclerosis (พรทิพย์, 2536)

การมีระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดสูง (hypercholesterolerolemia) นั้นเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุ เช่น อาจเกิดเนื่องจากมีความผิดปกติของเมตาโบลิซึมของโคเลสเตอรอล การเกิดความผิดปกติของ LDL receptor ในเซลล์ทั่วไปโดยจำนวน receptor ลดลงหรือไม่มีเลย หรือมี receptor แต่ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งโรคนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ นอกจากความผิดปกติของระบบภายในร่างกายแล้ว การสูบบุหรี่ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายสูงขึ้น โดยการสูบบุหรี่จะมีผลต่อการทำลายผนังเส้นเลือด ทำให้คราบไขมันมาพอกได้สะดวกขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การสูบบุหรี่มีผลทำให้ HDL ลดลงได้ การขาดการออกกำลังกายหรือในคนที่อ้วนเกินไป น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ไขมันไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้นพร้อมกับ VLDL ในขณะเดียวกัน HDL ลดลง การควบคุมการรับประทานอาหารจะช่วยให้สามารถรักษาระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดไม่ให้สูงจนเกินไปเพราะในอาหารบางชนิดจะมีโคเลสเตอรอลประกอบอยู่ในปริมาณมาก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อกุ้ง ไข่ไก่ นม รวมทั้งอาหารที่มีส่วนประกอบของนมและเนย

ในสัตว์นั้นการมีระดับโคเลสเตอรอลที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดผลดีต่อผลผลิต จากรายงานของ Boleman *et al.* (1998) ได้ทำการแบ่งกลุ่มลูกสุกรระยะแรกคลอดเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง และกลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลในเลือดต่ำ แล้วทำการเสริม

โคเลสเตอรอล 0 และ 0.5 % ในอาหารลูกสุกรโดยในกลุ่มแรก ให้อาหารที่โคเลสเตอรอล 0 % อายุ 1-56 วัน และหลังจากนั้นให้อาหารที่มีโคเลสเตอรอล 0.5 % จนถึงอายุ 24 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 ให้อาหารที่มีโคเลสเตอรอล 0.5 % ในช่วงอายุ 1-28 วัน หลังจากนั้นให้โคเลสเตอรอล 0 % เมื่ออายุ 29-56 วัน และให้โคเลสเตอรอล 0.5 % จนถึงอายุ 24 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่า สุกรกลุ่มแรกที่มีการเสริมโคเลสเตอรอลในอาหาร 0 % แล้วค่อยเสริมโคเลสเตอรอล 0.5 % ลงในอาหารในภายหลังนั้น จะมีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มที่มีการเสริมโคเลสเตอรอลมาโดยตลอด รวมทั้งน้ำหนักตับและน้ำหนักของซีรีบรัม (cerebrum) ก็น้อยกว่าเช่นกัน เนื่องจากโคเลสเตอรอลนั้นเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นมากของซีรีบรัมและยังมีผลต่อการสร้าง myelin sheath อีกด้วย Rothschild and Chanpman (1976) รายงานว่าเพศไม่มีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสุกร แต่สุกรกลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะมีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลต่ำอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

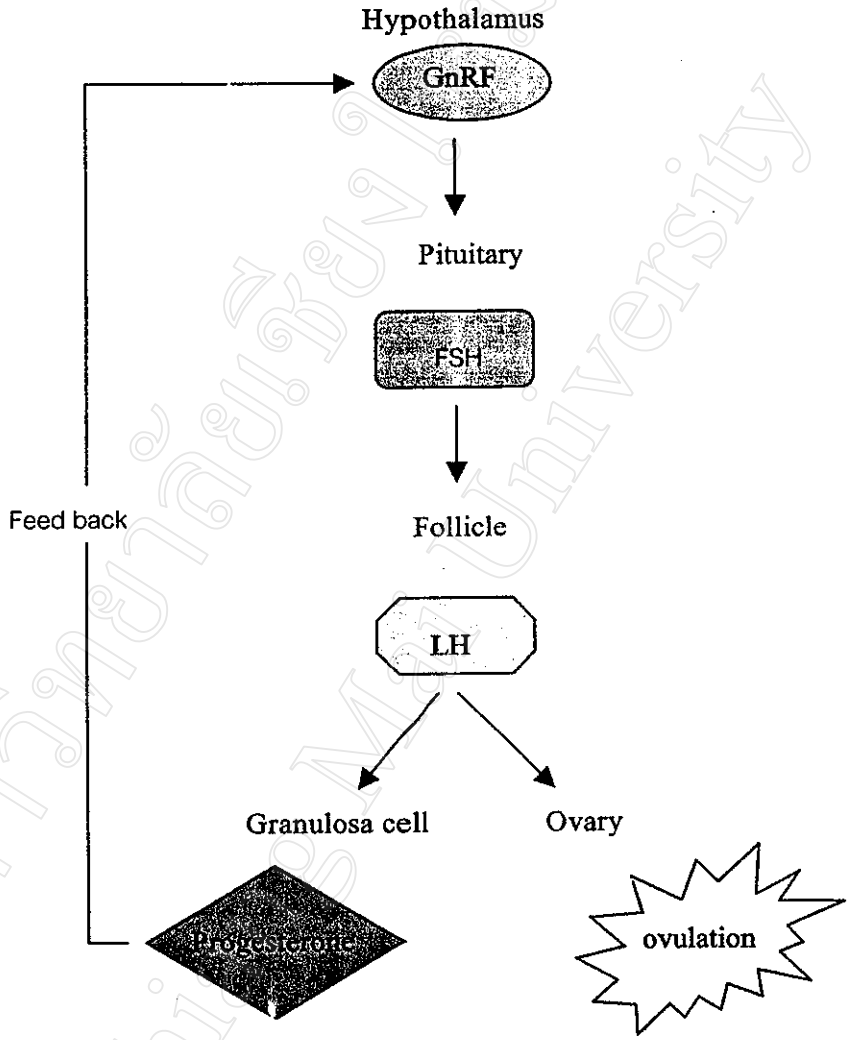
Wise *et al.* (1993) ทำการแบ่งกลุ่มสุกรที่มีโคเลสเตอรอลในเลือดเป็น 3 ระดับ คือ สูง (136 ± 19 mg/dl) ต่ำ (81±30 mg/dl) และ กลุ่มควบคุม (101±17 mg/dl) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์จำนวน 3 รุ่น พบว่าสุกรกลุ่มที่มีระดับโคเลสเตอรอลต่ำจะให้ลูกต่อครอก (litter size) มากกว่ากลุ่มที่ระดับโคเลสเตอรอลสูงและกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.5$) และเมื่อทำการวัดระดับฮอร์โมนในสุกรแต่ละกลุ่มพบว่า สุกรเพศเมียในกลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลต่ำมีฟอลลิคูลาร์ สติมูเลติ้งฮอร์โมน (follicular stimulating hormone, FSH) สูงกว่ากลุ่มที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูง Wise *et al.* (1997) รายงานว่าระดับโคเลสเตอรอลในตัวอ่อนสุกรที่อายุ 104 วันจะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักของตัวอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับระดับโคเลสเตอรอลในตัวอ่อนสุกรในวันที่ 70 ของการตั้งท้อง ตัวอ่อนที่มีน้ำหนักมากจะมีระดับโคเลสเตอรอลสูงว่ากลุ่มที่ตัวอ่อนมีน้ำหนักน้อย ปริมาณโคเลสเตอรอลจะสัมพันธ์กับน้ำหนักของตับและ ในช่วงการเป็นสัด (Estrous cycle) พบว่าสุกรมีระดับโคเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นโดยโคเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับฮอร์โมนเทสทรอสเตอโรนที่เพิ่มขึ้น (Wise and Ford, 1998) และการศึกษาสุกรในกลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลสูง (107.1 mg/dl) ต่ำ (65.5 mg/dl) และ กลุ่มควบคุม (86.5 mg/dl) พบว่าน้ำหนักแรกคลอดของสุกรกลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลสูงจะมากกว่า (1.43-7.10 kg.) กลุ่มที่มีโคเลสเตอรอลต่ำ (1.25-6.25 kg.) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และกลุ่มควบคุมจะมีน้ำหนักแรกคลอดอยู่ในช่วงกลางของทั้งสองกลุ่ม (1.34-6.53 kg.) (Young *et al.*,1993)

ระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายมีการแปรผันไปตามช่วงต่างๆของร่างกายโดยพบว่าโคเลสเตอรอลในวัวพันธุ์ลิมูซีน (limousine) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 8-3 สัปดาห์ ก่อนคลอดและเพิ่มขึ้นในช่วง 2-9 สัปดาห์หลังคลอด (Guedon *et al.*, 1999)

แต่ถ้าสัตว์ที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยไขมันสูงเกินไปอาจเกิดผลเสียต่อประสิทธิภาพในการผลิตได้ ในนกกระทาที่ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ให้มีความทนต่อภาวะ atherosclerosis ได้มีการทดลองในนกกระทาเพศผู้โดยแบ่งเป็น 3 สายคือ unselected controls (CL), high response (HL) และ low response (LL) โดยแบ่งจากระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาและให้อาหารที่เสริมด้วย 0.5% crystalline cholesterol 84 วันพบว่า การวัด atherosclerosis plaque scores ของกลุ่ม HL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.5$) (Siegel and Hammad, 1995) มีความพยายามที่จะลดระดับโคเลสเตอรอลทั้งในตัวสัตว์และผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากสัตว์ การลดระดับโคเลสเตอรอลโดยเสริมกระเทียมผงในอาหารไก่เนื้อ พบว่าการเสริมกระเทียมผงในระดับ 3.0 % ไม่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลงแต่ทำให้โคเลสเตอรอลในพลาสมาและในตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Konjufca *et al.*, 1997) การเสริม Lactobacillus ลงในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ 1.0×10^6 เซลล์/กรัม พบว่ามีโคเลสเตอรอลในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Jin *et al.*, 1998)

2.5 การขนย้ายโภชนะจากกระแสเลือดไปสู่การสร้างไข่

ในสัตว์ปีกเช่น ไก่ เป็ด นกกระทา หรือสัตว์ที่จัดอยู่ในสายพันธุ์ *Avain spp.* เมื่อร่างกายเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีการพัฒนาลักษณะทางเพศที่สอง (secondary sexual characteristic) ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเพศเช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) การพัฒนาทางด้านการสืบพันธุ์ในสัตว์ปีกนั้นประกอบไปด้วยปัจจัยหลายอย่างได้แก่ช่วงความยาววัน (daylength) ความยาววันที่ยาวขึ้นจะกระตุ้นต่อมไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปีน รีลิสซิ่ง แฟคเตอร์ (gonadotropin releasing factor, GnRF) ที่จะไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้สร้างฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติ้งฮอร์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) เพื่อกระตุ้นให้ฟอลลิเคิล (follicle) เกิดการพัฒนาให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและต่อมใต้สมองส่วนหน้ายังสร้างฮอร์โมนลูทีไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) เพื่อทำให้เกิดการตกไข่ (ovulation) และ LH กระตุ้น granulosa cell ให้สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) โดยฮอร์โมนชนิดนี้จะมีหน้าที่ไปยับยั้งไฮโปธาลามัสไม่ให้สร้าง GnRH เพื่อป้องกันไม่ให้มีการสร้าง LH ที่มากเกินไป (ภาพที่ 2-3)

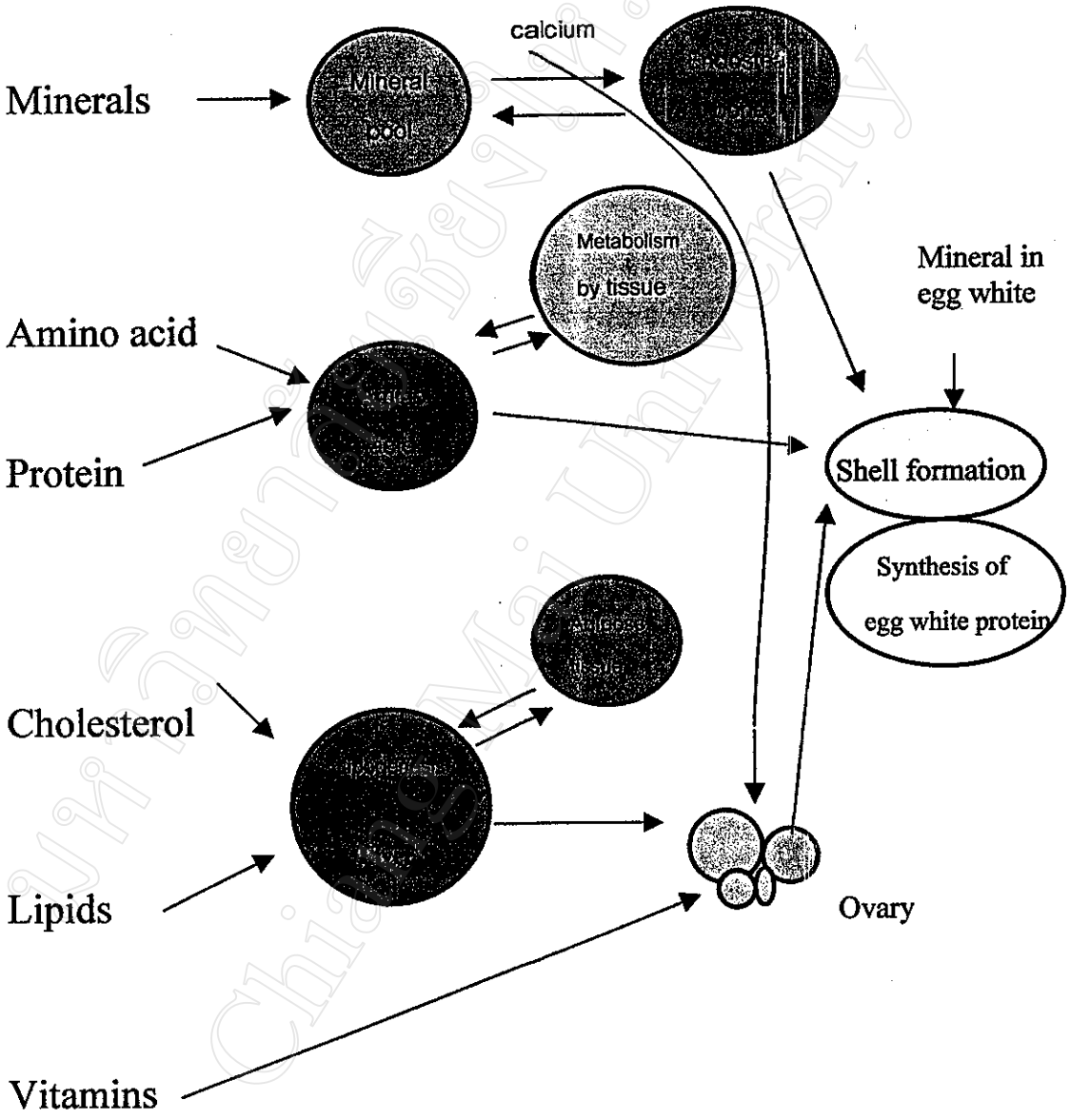


ภาพที่ 2-3. ขั้นตอนการหลั่งฮอร์โมนในการตกไข่ (ดัดแปลงจาก Gilbert and Pearson, 1971).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การสร้างไข่แต่ละฟองจะใช้เวลาประมาณ 25 ชั่วโมงโดยเริ่มจากในรังไข่ที่ประกอบด้วยฟอลลิเคิลจำนวนมาก ซึ่งแต่ละอันมีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-150 ไมโครเมตร ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะเกิดการตกไข่ (ovulation) ลงมายังท่อนำไข่ (oviduct) ในส่วนที่เรียกว่า infundibulum ไข่อยู่บริเวณนี้ประมาณ 15 นาที ไข่ที่ตกลงมาสู่ท่อนำไข่จะถูกหุ้มด้วยอัลบูเมน (albumen) ภายในท่อมีอัลบูเมนอยู่เป็นจำนวนมากจากนั้นไข่จะเคลื่อนที่มายังท่อนำไข่ส่วนที่เรียกว่าแมกนั่ม (magnum) โดยอัลบูเมนนั้นมีลักษณะข้นและเหนียว (gelatinous) หลังจากนั้นจะมีการเติมน้ำเข้าไปส่วนที่เรียกว่า ไข่ขาว (egg-white) ขั้นตอนดังกล่าวนี้ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง ไข่จะถูกส่งไปยังท่อนำไข่ในส่วน isthmus และมีการพอกเปลือกไข่ (shell-membranes) ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง และจากนั้นจึงเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนของ uterus หรือ shell gland ทำให้ไข่มีรูปร่างและมีการหุ้มเปลือกไข่ด้วยไขที่เรียกว่า cuticle ใช้เวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง (ภาพที่ 2-4) (Sturkie, 1986)

ส่วนประกอบของไข่แดงส่วนใหญ่ถูกสร้างโดยตับและอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ได้แก่ FSH และ LH และสเตียรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ เอสโตรเจน ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไข่แดงถูกขนย้ายมาทางกระแสเลือด โดยไขมันและโคเลสเตอรอลในตับถูกขนย้ายในรูปของไลโปโปรตีน ซึ่งตับเก็บไขมันอยู่ในรูปเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) หรือเม็ดไขมันรวมทั้งวิตามินที่ละลายในไขมัน (fat-soluble vitamin) มีการขนย้ายโคเลสเตอรอลประมาณ 220 มิลลิกรัม ส่วนวิตามินที่ละลายน้ำถูกขนส่งโดยตรงจากลำไส้เล็กมายังไข่แดง แร่ธาตุที่อยู่ในไข่แดงอาจอยู่ร่วมกับโปรตีน (mineral bounded protein) ที่เรียกว่า vitellogenin มีอยู่ 2 รูป ได้แก่ lipovitellin และ phosvitin ถูกขนส่งมาในรูปของไลโปโปรตีนด้วยเช่นกัน เมื่อร่างกายได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำหรือไขมันต่ำหรือมีปริมาณของโคเลสเตอรอลหรือไขมันในกระแสเลือดต่ำ อาจส่งผลให้การสะสมไขมันหรือโคเลสเตอรอลในไข่มีระดับต่ำด้วยเช่นกัน (Gilbert and Pearson, 1971) แต่ในทางตรงกันข้ามคือถ้าสัตว์มีโคเลสเตอรอลในร่างกายสูงปริมาณโคเลสเตอรอลที่จะถ่ายทอดมายังไข่ก็จะมีปริมาณสูงด้วย ดังนั้นการมีโคเลสเตอรอลในไข่สูงหรือต่ำยังอาจสามารถทำนายถึงการมีปริมาณโคเลสเตอรอลในร่างกายสัตว์ได้อีกด้วย



ภาพที่ 2-4. ขั้นตอนการส่งผ่านโภชนะต่างๆเข้าสู่ไข่ (ดัดแปลงจาก Sturkie, 1986).

2.6 วิธีการวัดโคเลสเตอรอล

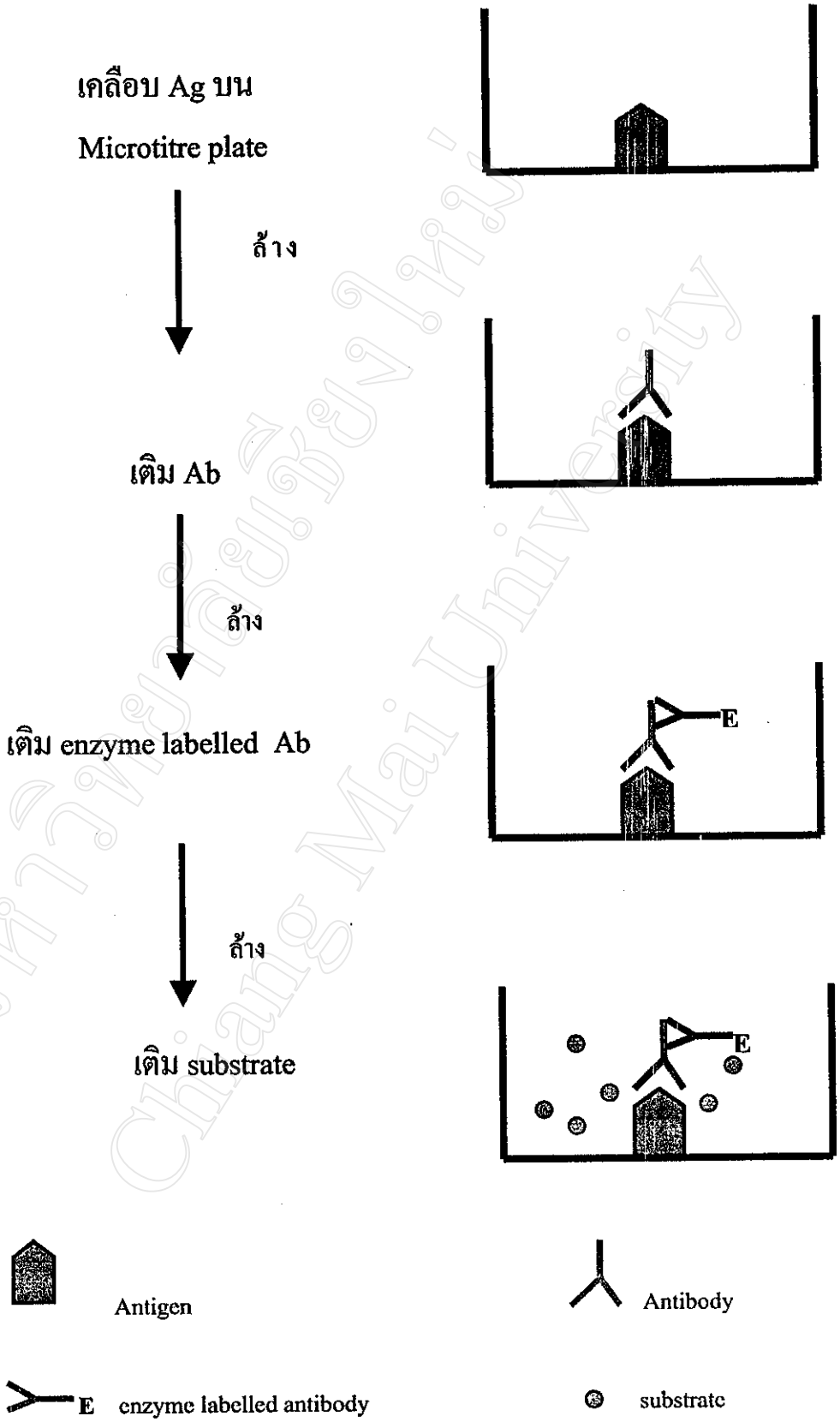
วิธีการวัดโคเลสเตอรอลมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีโดยแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป การวิเคราะห์โดยใช้อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่มีคุณภาพสูงเช่น ก๊าซโครมาโตรกราฟฟี (gas chromatrography) เป็นวิธีที่ค่อนข้างแม่นยำแต่มีราคาสูงเกินไป การวิเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ (enzymatic method) โดยให้ซีรัมโคเลสเตอรอลทำปฏิกิริยาเคมีกับเอนไซม์โดยตรง (Allain *et al.*, 1974) เป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วแต่มีข้อเสียคือค่าที่ได้อาจถูกรบกวนโดยโปรตีน บิริรูบิน (biririubin) วิตามิน A, C, D uric acid และความขุ่นของซีรัม การทำปฏิกิริยากันระหว่างโคเลสเตอรอลและเฟอริค คลอไรด์ (ferric chloride) กรดกำมะถัน (sulfuric acid) และ กรดอะซิติคเข้มข้น (glacial acetic acid) (Zak, 1957) วิธีการดังกล่าวถูกรบกวนจากโปรตีนและสารอื่นๆ ที่สามารถเกิดสีได้เหมือนโคเลสเตอรอล ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงวิธีการโดยการสกัด ต้ม และตกตะกอน เพื่อให้ได้ค่าที่น่าเชื่อถือมากขึ้นแต่ก็เพิ่มความยุ่งยากมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขบวนการ saponification เพื่อ hydrolyzes fatty acid จากโคเลสเตอรอลให้เป็น free cholesterol เท่านั้น ดังนั้นวิธีนี้จึงวัดได้เฉพาะ free cholesterol เท่านั้น (Abell *et al.*, 1951)

2.7 เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา ซึ่งกระทำโดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีติดบนพื้นผิวตัวกลาง (solid-phase) ที่สามารถดูดแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ เช่น โพลีสไตรีน (polystyline) โพลีไวนิล (polyvinyl) เทคนิคนี้ใช้หลักการของปฏิกิริยา 2 ชนิดคือ ปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี และ เอนไซม์กับสับสเตรท (substrate) เทคนิค ELISA มีหลายชนิดแต่ละเทคนิคขึ้นอยู่กับการเลือกใช้งานว่าผู้ใช้ต้องการตรวจสอบแอนติเจน หรือแอนติบอดี เทคนิคที่นิยมใช้งานได้แก่ Indirect method (ภาพที่ 2-5.) มักใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่างๆ Double antibody sandwich method (ภาพที่ 2-6.) ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน และ Compettitive binding method (ภาพที่ 2-7) วิธีการนี้ตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเป็นการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่มีเอนไซม์ติดฉลากอยู่กับแอนติเจนที่มาจากสารละลายมาตรฐานหรือจากตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ เพื่อจะแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่มีปริมาณจำกัด หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกแล้วก็จะวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติมสับสเตรทลงไป แล้วเก็บไว้ในที่เหมาะสมจึงนำมาวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะได้สัดส่วนที่ผกผันกันกับปริมาณแอนติเจนเมื่อต้องการทราบ

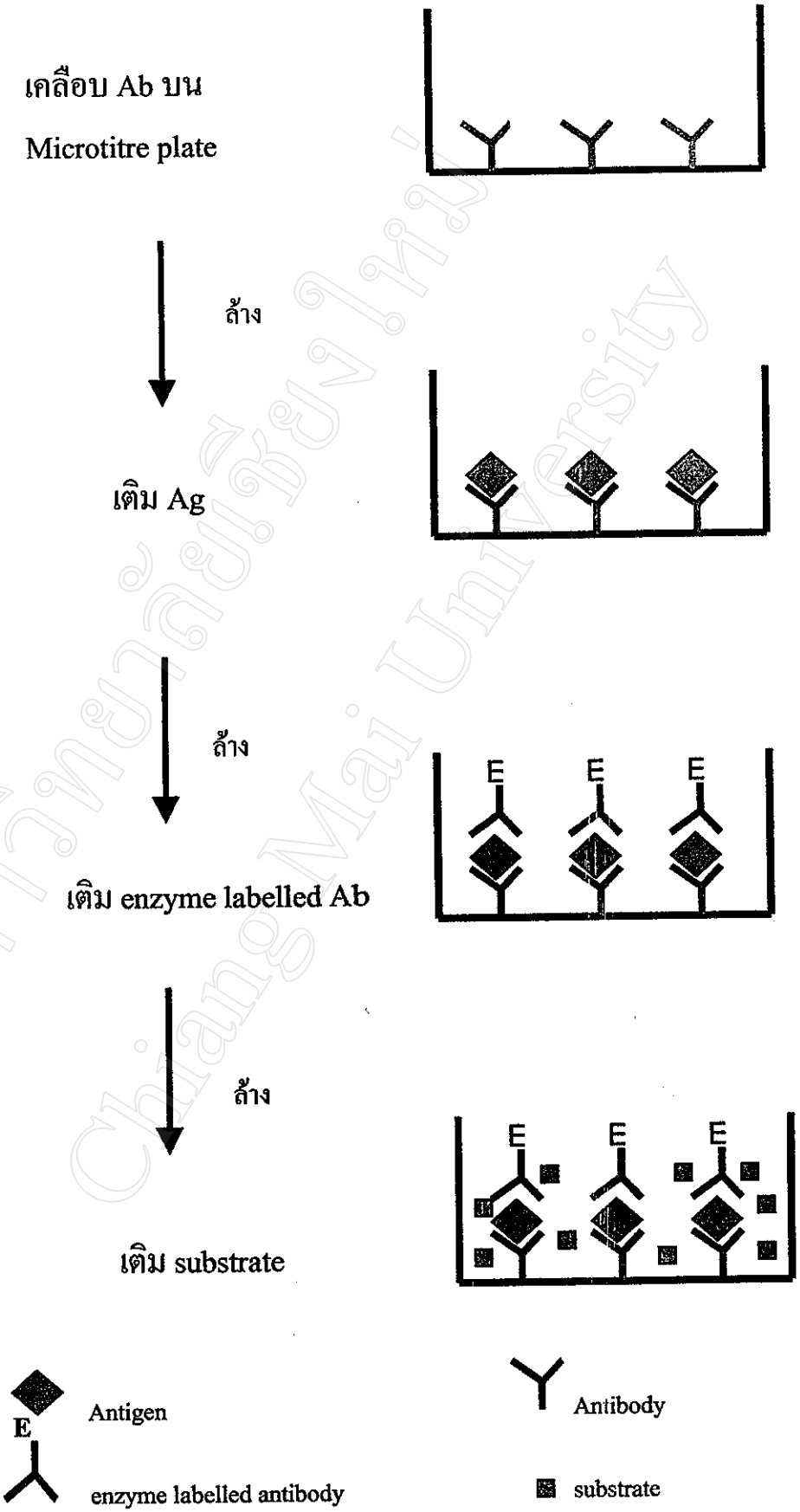
ปริมาณสารก็นำค่าความเข้มข้นของสีของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตราฐาน (Cambell, 1984 ; Catty, 1990; Crowther, 1995)

การทำ ELISA เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการวิจัย โดยเริ่มจากการวิจัยทางการแพทย์ และได้เริ่มมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบไวรัสพืช ELISA เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบไวรัสที่มีปริมาณต่ำมาก ประมาณ 1-10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ใช้ช่วงเวลาในการตรวจสอบตั้งแต่ 6-24 ชั่วโมง สามารถครอบคลุมปริมาณงานได้มาก เป็นร้อยๆตัวอย่างต่อวัน นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจ หาค่าความต่างทางซีรัมวิทยา ต้นทุนในการตรวจสอบด้วย ELISA ไม่สูงมากนัก ตัวอย่างการทดสอบหาแอนติบอดีซึ่งใช้หลักการนี้ได้แก่ การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบ บี โรคหัดเยอรมัน ไวรัส HIV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ ในการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลและองค์ประกอบอื่นๆนั้นมีการนำเทคนิค ELISA มาใช้ ได้แก่การวัดปริมาณไลโปโปรตีนไลเปส ซึ่งวัดค่าได้ละเอียดสุดถึง 9 ไมโครกรัมต่อลิตร (Saito *et al.*, 1998) การวัด cholesterol ester transfer protein ในซีรัมของมนุษย์ ด้วยวิธี sandwich ELISA วัดค่าได้ละเอียดสุด 1.8 $\pm$ 0.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของซีรัม (Kiyohara *et al.*, 1998) การวัดระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลโดย Swartz *et al.* (1988) ได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูด้วยไลโปโซม (liposome) และทำการตรวจแอนติบอดีที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค ELISA และทำการเคลือบพื้นผิวของเพลทชนิดโพลีสไตรีน (polystyrene plates) ด้วย crystalline cholesterol พบว่าแม้จะทำการเจือจาง (dilution) ปริมาณแอนติบอดีในอัตราส่วน 1 : 31,250 ก็ยังสามารถวัดค่าได้ Aniagolu *et al.* (1995) ศึกษาโดยการทำ ELISA เพื่อวัดแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลตามวิธีการกระตุ้นแอนติบอดีของ Swarzt *et al.* (1988) โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ polyvinylidine flouride (PVDF) เป็นพื้นผิวของเพลท กับ เพลทชนิดโพลีสไตรีน พบว่า PVDF สามารถวัดระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้ดีกว่าชนิดโพลีสไตรีน ในการทำ ELISA จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีเพื่อช่วยให้การวัดเป็นไปได้อย่าง แม่นยำ และถูกต้องมากที่สุด โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถนำมาใช้ในเทคนิคนี้ได้เช่นกัน แต่โพลีโคลนอลจะทำปฏิกิริยาต่อแอนติเจนหลายตำแหน่ง จึงมีความสามารถในการจับกับแอนติเจน (affinity) หลายแบบ และโพลีโคลนอลมีข้อเสียคือไม่สามารถทำการผลิตซ้ำอีกเพื่อให้ได้แอนติบอดีชนิดเดิม ดังนั้นเพื่อความละเอียดแน่นอนของสารที่ต้องการตรวจสอบ จึงได้มีการนำโมโนโคลนอลมาใช้ในเทคนิค ELISA



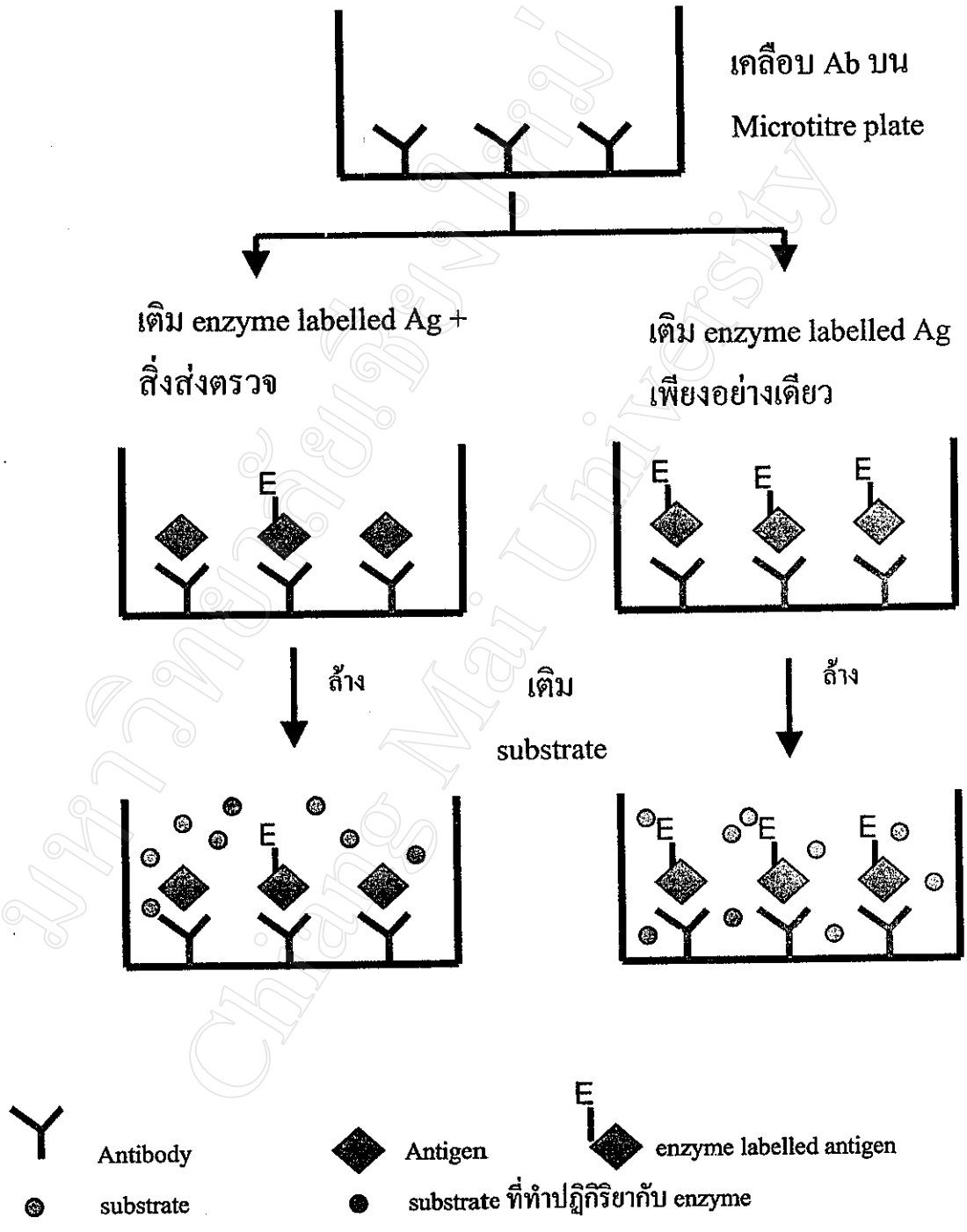
ภาพที่ 2-5. วิธีการ Indirect ELISA method (ดัดแปลงจากอรวดี, 2539).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 2-6. วิธีการ Sandwich ELISA method (ดัดแปลงจากอรวดี, 2539).

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 2-7. วิธีการ Competitive ELISA method (ดัดแปลงจากอรวดี, 2539).

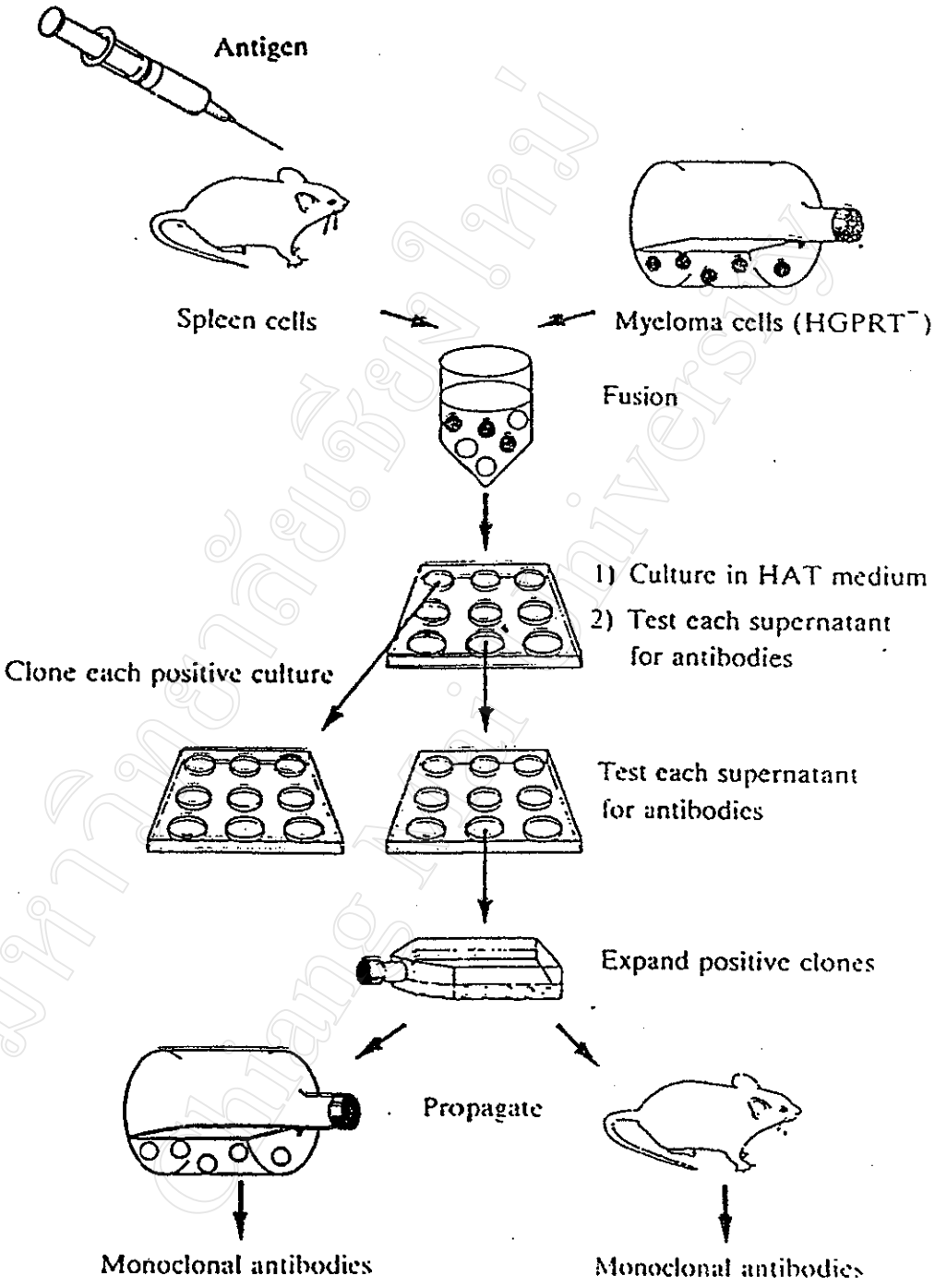
2.8 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Kohler and Miltein (1975) พบวิธีการเตรียมเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะเจาะจงได้และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมากโดยอาศัยหลักการของการเชื่อมระหว่างบีลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดีกับเซลล์ไมอิโลมาซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็ง ผลจากการเชื่อมเซลล์ทั้งสองชนิดทำให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridomas) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงได้ตามต้องการและมีอายุยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมา แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) เพราะสร้างจากเซลล์โคลน (clone) เดียวกัน และมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนสูง

ความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลนั้นอยู่ที่การเตรียมเซลล์ไมอิโลมาให้เติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน selective media เพราะขาดยีน (gene) ที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอ โดย selective media ทั่วไปคือสารละลาย HAT ซึ่งประกอบไปด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine aminopterin จะขัดขวางการสร้างเบส purine และ thymidylate โดยวิธีปกติ (*de nuvo* pathway) ทำให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ต้องเปลี่ยนมาสร้าง nucleotide ทางอ้อม คือ salvage pathway ด้วยการใช้ hypoxanthine ในการสร้างเบส purine โดยใช้เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และสร้าง thymidylate จาก thymidine โดยอาศัยเอนไซม์ thymidine kinase (TK) แต่เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาที่ใช้นั้นไม่มีเอนไซม์ HGPRT และ/หรือ TK ทำให้ไม่สามารถสร้าง nucleotide จาก salvage pathway ได้ จึงตายใน HAT media ในขณะที่เซลล์ไฮบริโดมานั้น อาศัยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากเซลล์ปกติซึ่งก็คือ B-lymphocyte ทำให้สามารถสร้างดีเอ็นเอและเจริญเติบโตได้ (Harlow, 1988)

วิธีการในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มต้นจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองซึ่งอาจใช้หนูถีบจักร (mouse) หนู (rat) ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ หลังจากที่เชื่อว่าสัตว์มีการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาตอบสนองก็ทำการตัดเอาม้าม (spleen) ออกมาทำ cell suspension ซึ่งจะได้ B cell เป็นจำนวนมาก ทำการหลอมเซลล์ (fusion) B cell และ ไมอิโลมาเซลล์ ซึ่งจะได้ เซลล์ไฮบริโดมาออกมา หลังจากนั้นทำการแยกเซลล์ไฮบริโดมาออกจากเซลล์อื่นโดยเลี้ยงใน HAT media 7 -10 วัน เซลล์ที่เหลือรอดจาก selective media นี้คือไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมเซลล์ ตรวจดูการสร้างแอนติบอดีและทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีเพียงเซลล์เดียว เมื่อได้เซลล์ที่ทำการสร้างแอนติบอดีที่ต้องการแล้วทำการเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นโดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณมากๆ (ภาพที่ 2-8) เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้สามารถเก็บในสภาพเยือกแข็งที่ -196 °ซ ในไนโตรเจนเหลวเพื่อนำมาใช้ในภายหลัง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้มีการศึกษาเช่นกัน ได้มีการผลิตโมโนโคลนอลต่อโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ทรานสเฟอร์โปรตีน (cholesterol ester transfer protein , CEPT) เพื่อใช้ในการวัดโปรตีนต่างๆที่ช่วยในการขนส่งโคเลสเตอรอลโดยเทคนิค ELISA (Chang *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 1995) Swartz *et al.* (1988)ได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูด้วยไลโปโซมหลังจากกระตุ้นได้ 3 วันทำการตรวจแอนติบอดีที่เกิดขึ้นและได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในเทคนิค ELISA ทำให้สามารถวัดปริมาณสารที่ต้องการได้ละเอียดและแม่นยำมากขึ้น Kawamura *et al.* (1989) ได้ศึกษาโดยการผลิตโมโนโคลนอลต่อสารพิษ Orchratoxin เพื่อนำมาใช้ในการวัด ปริมาณ Orchratoxin ในเนื้อไก่ พลาสมาของสุกร และ ซีรัมของโค พบว่าสามารถวัดปริมาณสารพิษได้ละเอียดถึง 0.1-1 นาโนกรัมต่อกรัม และในงานผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมน อีสตราไดออลเพื่อใช้วัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลเพื่อตรวจการเป็นสัดในโคนม ซึ่งจากการสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานเพื่อตรวจสอบว่าโมโนโคลนอลที่ผลิตได้สามารถวัดปริมาณอีสตราไดออลได้เท่าใด จากกราฟพบว่า 50 % binding ได้ที่ 8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความไวในการวัดมากและวัดปริมาณฮอร์โมนในระดับต่ำได้ถึง 2.5 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (กนกวรรณ, 2542)



ภาพที่ 2-8. ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ดัดแปลงจากอรวดี, 2539).