บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1. การเป็นสัด และการตั้งท้องของโคนม

2.1.1. รอบการเป็นสัด

การเป็นสัดสามารถตรวจพบได้โดยตรงคือเป็นเวลาที่สัตว์เพศเมียยอมรับการผสม ตารางที่ 2 - 1 แสดงถึงอายุที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (puberty) และระยะเวลารอบการเป็นสัด (oestrus cycle) ของโคนม การตกไข่จะเกิดขึ้นหลังจากแสดงอาการเป็นสัด หลังจากการผสมมดลูกเตรียมพร้อมที่จะให้ตัวอ่อนสามารถฝังตัวได้ โดยได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone, P_4) ที่ผลิตจากคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum, CL) ที่รังไข่ ฮอร์โมน P_4 จะมีระดับสูงกว่าในช่วงแสดงอาการเป็นสัด สำหรับระยะลูเทียล (luteal phase) เป็นช่วงสุดท้ายของรอบการเป็นสัด เป็นระยะที่คาบเกี่ยวระหว่างการกลับเข้าสู่รอบการเป็นสัดอีกครั้ง หรือจะคงสภาพของ CL ไว้ในช่วงที่ผสมติด CL จะมีอายุยาวนานหรือไม่ขึ้นอยู่กับการตั้งท้อง ในโคนมพบว่าถ้าหากมีการตั้งท้อง CL จะคงสภาพไปตลอดการตั้งท้อง ถ้าหากไม่มีการตั้งท้อง CL จะสลายตัวโดยได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟ่า (prostaglandin $F_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) และส่งผลให้ระดับฮอร์โมน P_4 ลดลง หลังการสลายตัวของ CL จะมีการสร้างฟอลลิเคิล (follicle) ฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ (graafian follicle) จะเป็นบริเวณที่มีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen, E_2) ซึ่งมีผลต่อการแสดงอาการเป็นสัด ระยะนี้เรียกว่า follicular phase ซึ่งจะคงสภาพไปจนกระทั่งเกิดการตกไข่ และมีการพัฒนาเป็นคอร์ปัสลูเทียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-1. แสดงอายุที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และระยะเวลารอบการเป็นสัดของโคนม (ดัดแปลงมาจาก Hunter, 1980)

อายุเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (เดือน)	9-13
รอบการเป็นสัด (วัน)	20-21
ระยะลูเทียล (วัน)	17-18
ช่วงแสดงอาการเป็นสัด (ชั่วโมง)	12-26
ระยะเวลาไข่ตก (ชั่วโมง)	10-12 หลังจากแสดงอาการเป็นสัด

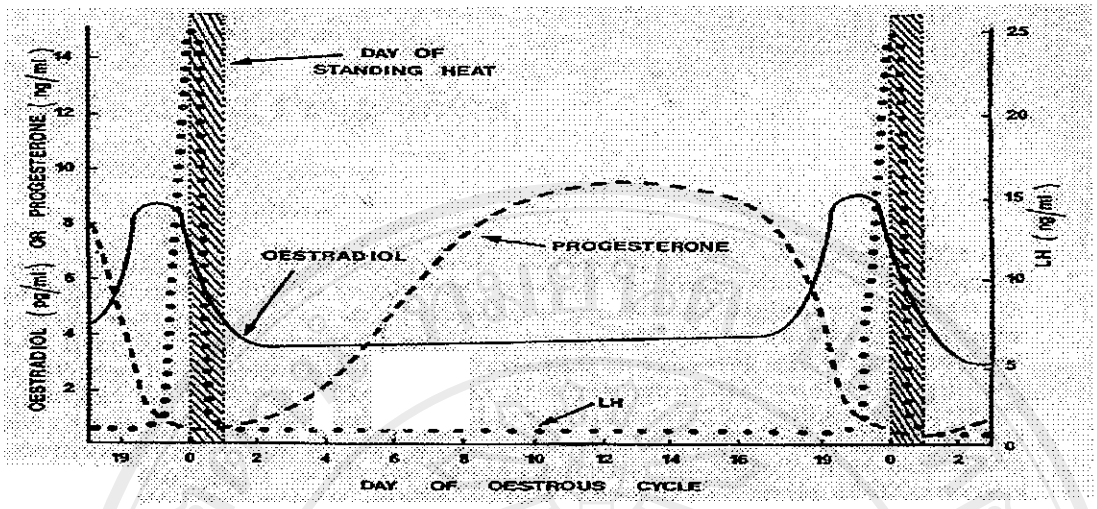
2.1.2. ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัด

ตารางที่ 2-2 แสดงระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในรอบการเป็นสัด รอบการเป็นสัดปกติในโคนมจะอยู่ในช่วง 20 หรือ 21 วัน ระดับฮอร์โมน P_4 ในพลาสม่าจะต่ำกว่า 1 ng/ml ในช่วงเป็นสัด และจะมีระดับต่ำจนกระทั่งวันที่ 5 ของการเป็นสัด ระดับฮอร์โมน P_4 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งวันที่ 16 – 17 มีระดับประมาณ 5.4 ng/ml ในช่วง luteal phase และจะคงระดับสูงสุด 6 - 8 ng/ml จนถึงช่วงสุดท้ายของ luteal phase และจะมีระดับลดต่ำลงในช่วงวันที่ 16 – 19 ในทางตรงกันข้าม ความเข้มข้นของฮอร์โมน E_2 ซึ่งมีอยู่ในระดับพิโคกรัม มีค่าประมาณ 3.6 pg/ml ในช่วง luteal phase ระดับของ E_2 จะยังคงมีระดับต่ำกว่า 10 pg/ml จนกระทั่งถึงก่อนวันที่จะแสดงอาการเป็นสัด จะมีระดับสูงขึ้นถึง 15 – 25 pg/ml เมื่อเป็นสัดและลดลงภายใน 2 – 5 ชั่วโมงในช่วงต้นของการเป็นสัด (ภาพที่ 2-1)

ตารางที่ 2-2. แสดงระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจน ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และลูทินไนซิ่งฮอร์โมนในพลาสม่าในช่วงรอบการเป็นสัดของโค (ดัดแปลงจาก Hunter, 1980)

			ลูทินไนซิ่งฮอร์โมน	
	เอสโตรเจน	โปรเจสเตอโรน	ระดับปกติ	ระดับสูงสุดช่วงไข่ตก
	พก./มล.	นก./มล.	นก./มล.	นก./มล.
โคนม	15-25	6-8	<2.0	10-65

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-1. แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในกระแสเลือดที่เกี่ยวข้องกับรอบการเป็นสัด (Hunter, 1980).

2.1.3. การตั้งท้อง

การตั้งท้องเริ่มนับตั้งแต่การปฏิสนธิเสร็จสิ้นจนกระทั่งคลอดลูก (ทัศนีย์, 2540) ตัวอ่อนใช้เวลา 3 – 4 วัน ในท่อนำไข่ก่อนเข้าสู่มดลูก จะเป็นตัวอ่อนระยะ 8 – 16 เซลล์ (morula) การฝังตัวเกิดขึ้นในวันที่ 19 หรือ 20 หลังผสม โดยจะฝังตัวสมบูรณ์ระหว่างวันที่ 35 – 42 ในโคนมความอยู่รอดของตัวอ่อนขึ้นอยู่กับการคงสภาพของ CL ตลอด 200 กว่าวันของการตั้งท้อง มีสัญญาณหลาย ๆ อย่างที่บ่งบอกการตั้งท้อง ไม่ว่าจะเป็นระดับของฮอร์โมน P_4 โปรตีนบางชนิด เช่น α-interferon ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ (Meredith, 1995) โดยสัญญาณเหล่านี้ทำงานผ่านระบบที่เรียกว่า utero – ovarian axis

2.1.4. ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้องในโคนม

อวัยวะที่ควบคุมที่สำคัญที่สุดคือ CL ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมน P_4 ที่ความเข้มข้นประมาณ 10 ng/ml (6 – 15 ng/ml) ซึ่งจะคงระดับนี้ไปตลอดการตั้งท้อง และจะลดลงในช่วง 3 วันก่อนคลอด ในขณะที่ฮอร์โมน E_2 จะถูกขับออกมาในรูป oetrone sulphate ในช่วง 2 วันสุดท้ายก่อนคลอดฮอร์โมนในกลุ่ม corticosteroid จะเพิ่มขึ้น 3 – 4 เท่า ซึ่งจะตรงกันข้ามกับฮอร์โมน P_4 ฮอร์โมนในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สำคัญในขบวนการคลอดลูก การหลั่ง $PGF_{2\alpha}$ จากมดลูกจะเพิ่มขึ้นในช่วงหนึ่งสัปดาห์ก่อนคลอด และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงก่อนคลอด และในช่วงนี้ฮอร์โมน P_4 จะลดลงอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

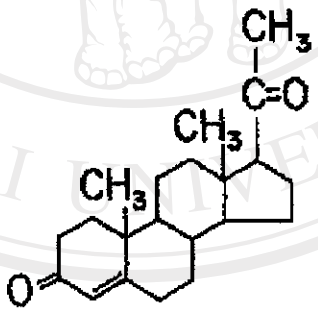
สรุปหน้าที่สำคัญของฮอร์โมน P_4 ในช่วงตั้งท้องได้ดังนี้:

1. ในช่วง 6 – 7 สัปดาห์แรกของการตั้งท้อง P_4 ช่วยกระตุ้นให้ต่อมที่ผนังชั้นในของมดลูกหลั่งสารคัดหลั่งเพื่อช่วยให้ตัวอ่อนที่เพิ่งฝังตัวมีชีวิตอยู่
2. ในช่วงตั้งท้อง P_4 ทำหน้าที่ควบคุม negative feedback ไปยังสมองส่วน hypothalamus และต่อมใต้สมอง เพื่อยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดรโทรปิน (gonadotropin) และป้องกันการหลั่ง LH เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดขบวนการ ovulation
3. P_4 ทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของกล้ามเนื้อมดลูกไม่ให้เกิดการบีบตัว กดการทำงานของฮอร์โมน oxytocin และ prostaglandin และป้องกันการเกิดการหดตัวของมดลูก

จากหน้าที่ที่สำคัญของฮอร์โมน P_4 และระดับของ P_4 ที่สูงในช่วงตั้งท้อง จึงมีผู้ให้ความสนใจกับฮอร์โมน P_4 มาก เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดสภาพการตั้งท้องของโคนม

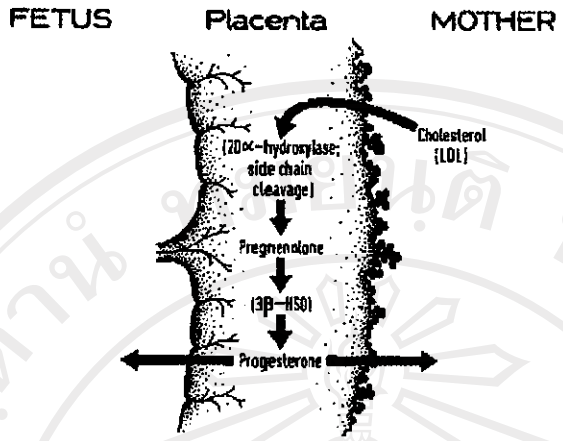
2.2. ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone, P_4)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) มีสูตรโครงสร้างเป็น cyclopentanoperhydrophenanthrene ring (แสดงดังภาพที่ 2-2) มีมวลโมเลกุล 314.45 ดาลตัน แหล่งผลิตที่สำคัญคือ CL ในรังไข่ รกในช่วงตั้งท้อง และต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) ภาพที่ 2 – 3 แสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมน P_4 จากรก



ภาพที่ 2 – 2. แสดงโครงสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Zarrow, 1962).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

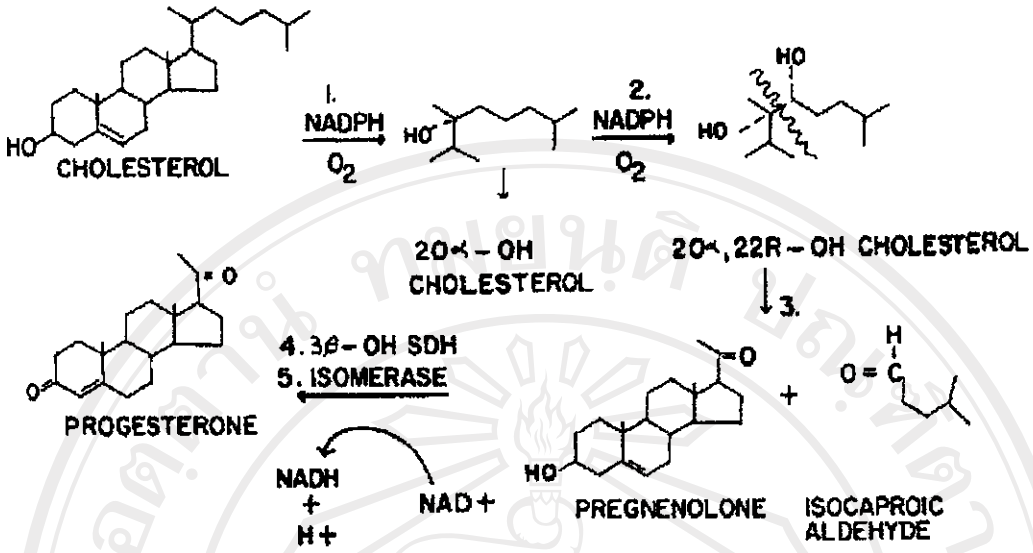


ภาพที่ 2 – 3. แสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยรก (Oakey, 1983).

การสังเคราะห์ฮอร์โมน P_4 มีโคเลสเตอรอลในพลาสม่าเป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 2 – 4) ถึงแม้ว่า CL สามารถสร้างโคเลสเตอรอลได้บางส่วน จากโคเลสเตอรอลจะถูกสังเคราะห์ให้ได้ pregnenolone (P_5) ซึ่งเกิดขึ้นในไมโตรคอนเดียโดยได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนลูทินไนซิ่ง (luteinizing hormone, LH) P_5 เปลี่ยนเป็น P_4 โดยอาศัยเอนไซม์ 3β-hydroxysteroid dehydrogenase ใน endoplasmic reticulum และ isomerase ในไรโบโซม (ribosome) ของรังไข่

ความเข้มข้นของ P_4 ใน CL จะเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงขนาดของ CL ในช่วงรอบการเป็นสัดในโคพบว่า ระดับ P_4 มีค่าเท่ากับ 65 μg/gmCL ในวันที่ 12 และลดลงเป็น 18 μg/gmCL ในวันที่ 20 ระดับของ P_4 ในพลาสม่ามีค่าประมาณ <1 ng/ml ในช่วงเป็นสัดและสูงขึ้นเป็น 5 – 7 ng/ml ในช่วงวันที่ 10 – 16 ของรอบการเป็นสัด (Henricks and Mayer, 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

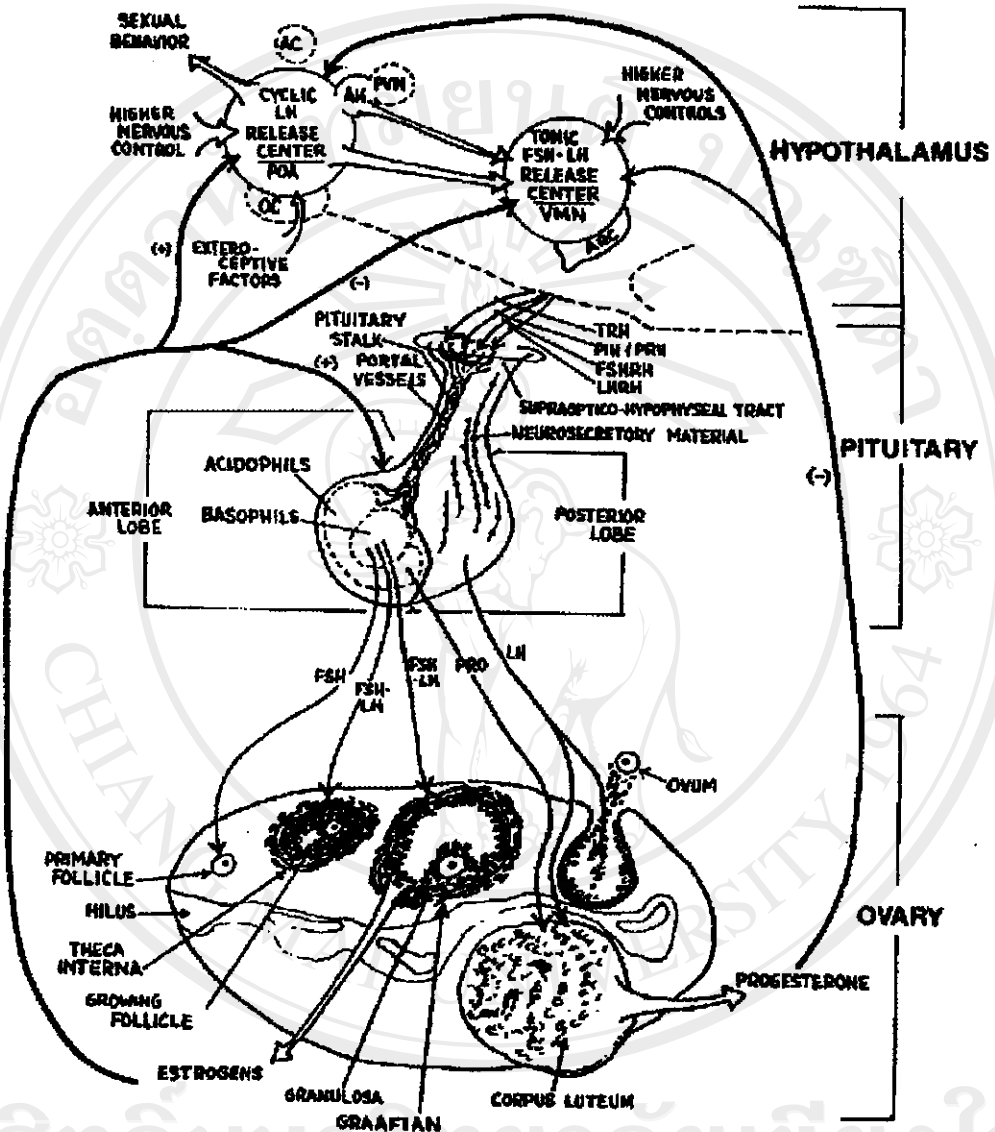


ภาพที่ 2 – 4. แสดงกลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยมีโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น (Henricks and Mayer, 1977).

กลไกควบคุมการทำงานของฮอร์โมน P_4 ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนหลายชนิด ได้แก่ luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) และ prolactin แสดงดังภาพที่ 2 – 5

หน้าที่ของฮอร์โมน P_4 คือ: (1) มีผลต่อการเจริญของต่อมที่ผนังมดลูกชั้นใน (endometrium) (2) กระตุ้นการเจริญของ lubuloalveolar ในต่อมน้ำนม (3) ป้องกันการบีบตัวของมดลูกขณะตั้งท้อง และ (4) ควบคุมการหลั่งของฮอร์โมนโดรนาโดโทรปิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 – 5. แสดงกลไกการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ผ่านกลไก hypothalamo – pituitary axis (Henrick and Mayer, 1977).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3. การวินิจฉัยการตั้งท้องในโคนม

โคนมที่ผ่านระยะ 18 – 24 วันหลังการผสมโดยไม่พบการแสดงอาการเป็นสัด อาจตั้งสมมติฐานว่าโคตัวนั้นตั้งท้อง แต่ข้อสันนิษฐานนี้อาจจะถูกหรือผิดก็เป็นได้ การวินิจฉัยการตั้งท้องที่ถูกต้องแม่นยำมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเหตุผลทางเศรษฐกิจซึ่งการตรวจพบความผิดพลาดในการผสมรวดเร็วเท่าไหร่ มีส่วนช่วยให้มีการผสมใหม่อีกครั้งในเวลาอันรวดเร็ว ความสูญเสียที่เกิดขึ้นก็จะลดลง

2.3.1. การวัดระดับฮอร์โมน P_4

วิธีการที่ใช้วัดระดับ P_4 มีหลายวิธี เช่น เรดิโออิมมูนโนแอสเซ เอนไซม์ลิงค์อิมมูนโน ซอร์เบนท์แอสเซ หรือแม้กระทั่งการติด biosensor ไว้ที่บริเวณถังนม (Claycomb *et al.*, 1998) เวลาที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับฮอร์โมน คือ ประมาณวันที่ 24 หลังผสม โดยปกติการวัดระดับฮอร์โมน P_4 มีความถูกต้องสูงถึง 100 % ในกรณีตรวจหาโคที่ไม่ตั้งท้อง แต่สำหรับโคที่ตั้งท้องมีความแม่นยำเพียง 85 % (Meredith, 1995) สาเหตุเกิดจาก ความผิดพลาดแบบบวก (false-positive results) ซึ่งเกิดได้เนื่องจาก :

1. การตายของตัวอ่อน (early embryonic death) หลังจากผ่านการตรวจสอบไปแล้ว
2. เกิด luteal cyst หรือ corpus luteum ไม่สลาย ซึ่งทำให้ระดับ P_4 สูงแต่โคไม่ตั้งท้อง
3. เกิด silent heat และมีการสร้าง corpus luteum ขึ้นมาจึงเป็นเหตุให้มีระดับ P_4 สูง

สำหรับโคที่ตรวจพบว่าท้องในวันที่ 24 ควรมีการล้วงตรวจเพื่อยืนยันอีกครั้ง การวัดระดับฮอร์โมน P_4 สามารถวัดได้จากหลายแหล่ง เช่น เลือด น้ำนม ปัสสาวะ หรืออุจจาระ แต่ที่นิยมและเก็บตัวอย่างได้ง่ายคือ น้ำนม การเก็บตัวอย่างน้ำนมจะเก็บในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ประมาณวันที่ 21 – 24 หลังผสม ธรรมชาติของน้ำนม และการเก็บรักษาน้ำนมมีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน การเติมสารกันบูด เช่น potassium dichromate ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยรักษาสภาพน้ำนม รวมทั้งควรเก็บนมไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสขึ้นไปในกรณีที่เก็บตัวอย่างไว้นาน นอกจากนั้นช่วงเวลาเก็บตัวอย่างก็มีผลต่อระดับฮอร์โมนเช่นกัน พบว่าการเก็บน้ำนมในช่วงบ่ายมีแนวโน้มว่าจะมีความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 สูงกว่าในช่วงเช้า (Heap *et al.*, 1976)

2.3.2. การตรวจโดยใช้ ultrasonic

เป็นการตรวจโดยอาศัย embryonic vesicle ในมดลูกของโคในช่วงวันที่ 13 – 15 วันหลังผสม โดยใช้ real time B-mode ultrasonic แต่การตรวจต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์ และใช้เครื่องที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความถี่สูงในช่วง 5 หรือ 7.5 MHz จึงจะแม่นยำ และสามารถตรวจการเต้นของหัวใจได้ตั้งแต่วันแรกที่พบตัวอ่อน

2.3.3 การล้วงตรวจ

การล้วงตรวจสามารถทำได้หลายระยะ การล้วงตรวจเป็นการตรวจความเปลี่ยนแปลงของมดลูก ปีกมดลูก ตัวอ่อน และรก การล้วงตรวจต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะ และความชำนาญ เพื่อที่จะได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ มิฉะนั้นอาจเกิดความผิดพลาดได้

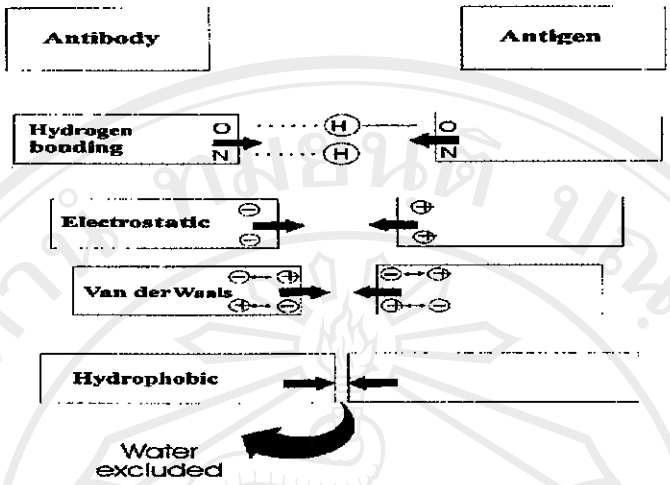
2.4. เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

2.4.1. หลักการของ ELISA

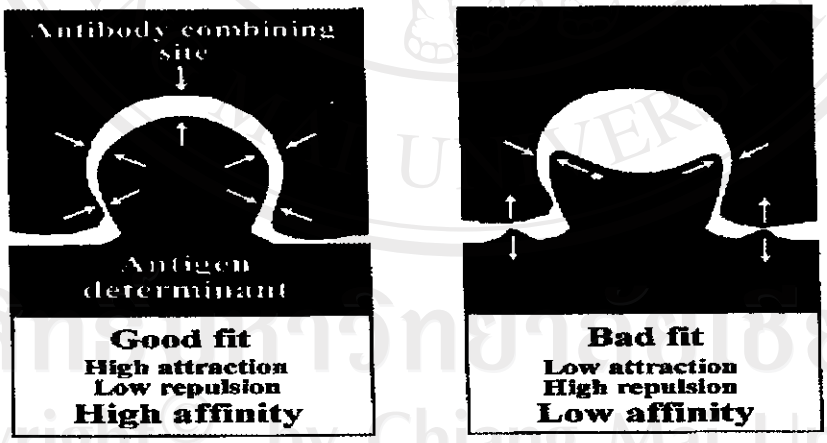
ELISA เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยการติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น (substrate) ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบนั้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังสามารถเก็บไว้ได้นาน ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ผลผลิตที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่าย และชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

พันธะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยปกติเป็นพันธะแบบ noncovalent ระหว่างแอนติเจนและกรดอะมิโนที่บริเวณ binding site (ภาพที่ 2 – 6) แรงที่เกิดขึ้นได้แก่ hydrogen bond, electrostatic และ hydrophobic การที่พันธะมีความแข็งแรงมากที่สุดเกิดขึ้นเนื่องจาก antibody combining site ของแอนติเจนสามารถจับกับ epitope ของแอนติบอดีได้พอดี (best fit) แสดงดังภาพที่ 2 – 7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 – 6. แสดงการเกิดพันธะระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี (Crowther, 2000).



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 – 7. แสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่าง good fit และ bad fit (Crowther, 2000).

ความจำเพาะเจาะจงและความสามารถในการจับกันระหว่างบริเวณของแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจน (epitope หรือ antigen binding site) และส่วนของแอนติเจนที่มีพันธะกับแอนติบบอดี (paratope หรือ antigen determinant) เรียกว่า affinity ในกรณีที่ paratope และ epitope จับกันได้อย่างสมบูรณ์มีผลทำให้มี affinity สูง แอนติบอดี (Antibody; Ab) ที่มี affinity สูงจะสามารถจับกับแอนติเจน(Antigen; Ag) ได้ดี พบว่า Ab ที่มี affinity สูงมักจะเป็น Ab ที่สร้างขึ้นในช่วงท้าย ๆ ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แอนติบอดีที่เลือกใช้ใน ELISA มี 2 แบบคือโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody, PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody, MAb)

PAb เป็นแอนติบอดีที่ได้มาจากการกระตุ้นสัตว์ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ แล้วนำเอาซีรั่มของสัตว์ที่สามารสร้างภูมิคุ้มกันได้มาใช้ แต่เป็นแอนติบอดีที่มีความหลากหลายและมีความจำเพาะเจาะจงสูง – ต่ำ ปนกัน ทำให้ความสามารถในการจับกับแอนติเจนต่างกัน ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA มีการเจือจางแอนติบอดีเพื่อหาความเหมาะสม อาจทำให้ปริมาณของแอนติบอดีที่มี affinity สูงเหลือปริมาณน้อยกว่า affinity ต่ำได้

2.4.2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม (hybridomal cell) ระหว่างเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงเป็นเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte ที่เกิดภายหลังจากระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อแอนติเจนกับเซลล์ไมอิโลมา ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีผู้ให้ความสนใจในการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ใน ELISA การศึกษาของ Claycomb *et al.* (1998) เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง MAb และ PAb ต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน พบว่ากราฟมาตรฐานที่ใช้ MAb ในการวัดจะมีค่า 50 % binding น้อยกว่าค่าที่ได้จากการวัดด้วย PAb ซึ่งถือว่าเป็นคุณสมบัติที่ดี และค่า optical density และ region of interest ที่วัดได้มีค่าสูงกว่า PAb

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.3. วิธีการ sandwich ELISA

เป็นวิธี ELISA ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนได้โดยตรง โดยจะเคลือบเพลทด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนชนิดนั้น ๆ หลังจากผ่านขบวนการล้าง และ blocking ซึ่งเป็นการป้องกัน nonspecific binding แล้ว จึงเติมแอนติเจนที่ต้องการตรวจ ล้าง และเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ล้าง และเติมสารตั้งต้นเพื่อพัฒนาให้เกิดสี ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ 492 นาโนเมตร จะเป็นค่าที่นำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณแอนติเจนที่ต้องการ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ปริมาณมาก แสดงว่ามีปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างมาก หลักการของวิธี sandwich ELISA แสดงดังภาพที่ 2 – 8

2.4.4. วิธีการ indirect sandwich ELISA

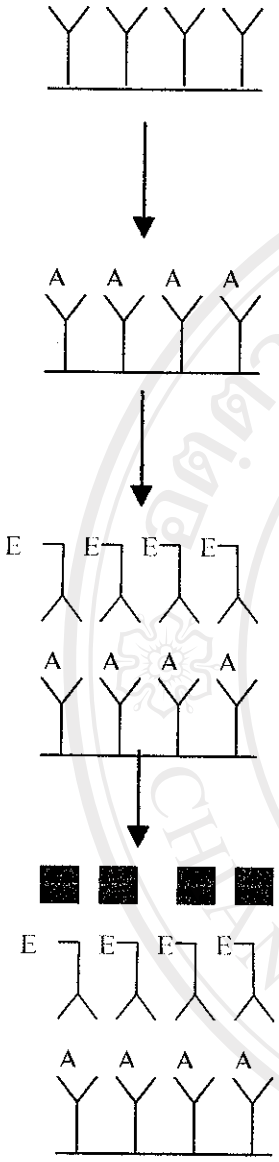
เป็นหนึ่งในวิธีการ ELISA แบบ heterogeneous ELISA ซึ่งมีประโยชน์มากคือ สารตัวใดตัวหนึ่ง (Ag/Ab) สามารถยึดติดกับเพลทได้ เมื่อสารตัวหนึ่งเกาะติดกับเพลท ดังนั้นสารอีกตัวหนึ่งจะจับกับสารที่เคลือบเพลท ทำให้ส่วนที่ไม่สามารถเกาะติดได้จะหลุดออกไปจากขบวนการล้าง และผลที่ได้จากขบวนการนี้สามารถสังเกตได้จากสีของปฏิกิริยาซึ่งดูได้ด้วยตาหรือวัดค่าจากเครื่อง ELISA reader

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี ELISA แบบ indirect sandwich ELISA โดยมีหลักการดังนี้คือ เคลือบเพลทด้วยซีรั่มกระต่ายด้วยอัตราเจือจางที่เหมาะสม เติม blocking reagent ซึ่งมีคุณสมบัติป้องกัน nonspecific binding ที่อาจเกิดขึ้น เติมน้ำนมโคที่ต้องการตรวจ เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ P_4 (capture antibody) ซึ่งเป็นแอนติบอดีจากสัตว์ต่างสปีชีส์กับแอนติบอดีที่ใช้เคลือบเพลท เติมแอนติบอดีต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถสลับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งและตัวที่สองได้ โดยเปลี่ยนเพียงแอนติบอดีตัวที่สามเท่านั้น ให้เหมาะสมกับแอนติบอดีตัวที่สอง แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของวิธีนี้คือแอนติเจนต้องมี epitope อย่างน้อยหนึ่งอันในแต่ละข้าง หลักการของวิธี indirect sandwich ELISA แสดงดังภาพที่ 2 - 9

2.4.5. Strip ELISA test kit

เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ในฟาร์ม ให้ความสะดวก และรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธี ELISA ปกติ Nebel (1988) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับชุดตรวจสอบฮอร์โมน P_4 ในน้ำนม (on-farm milk progesterone tests) ซึ่งมีอยู่หลายบริษัทที่ผลิตโดยอาศัยเทคนิค ELISA เพื่อใช้ในการตรวจวัด ซึ่งแต่ละบริษัทจะมีขั้นตอน ระยะเวลาและลักษณะของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบต่างกัน รูปแบบของชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้มีอยู่หลายแบบ เช่นในรูปแบบของ microplate แผ่น strip หรือ dip stick เป็นต้น หลายการศึกษาได้มีการพัฒนาวิธีที่จะสามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยาของวิธี ELISA และเพื่อนำไปใช้ในภาคสนามได้โดยพัฒนาพื้นผิวที่ใช้สำหรับยึดแอนติเจน หรือแอนติบอดี (solid phase) อาทิเช่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



Coat plate with rabbit serum

100 µl/well

Incubate 4°C for 16 – 18 hrs.

Wash 3 times

Add 1.5 % BSA 200 µl/well

Incubate 37 °C for 2 hrs.

Add sample 100 µl/well

Incubate 37 °C for 1 hrs.

Wash 3 times

Add monoclonal antibody labeled horseradish peroxidase

Incubate 37 °C for 1 hrs.

Wash 5 times

Add OPD substrate

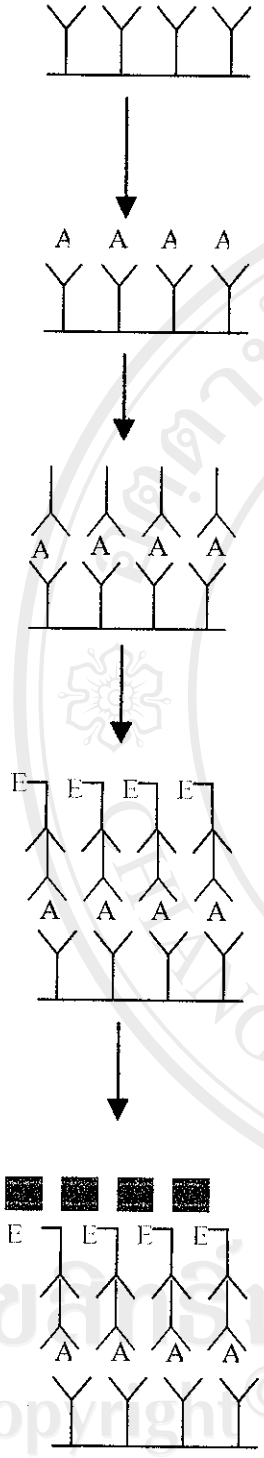
Incubate room temperature for 15 mins. in dark place

Add 4 N H_2SO_4

ELISA Reader at 492 nm

ภาพที่ 2 –8. แสดงหลักการของวิธี sandwich ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



Coat plate with rabbit serum

Incubate 4°C for 16 – 18 hrs.

Wash 3 times

Add 1.5 % BSA 200 µl/well

Incubate 37 °C for 2 hrs.

Add sample

Incubate 37 °C for 1 hrs.

Wash 3 times

Add monoclonal antibody

Incubate 37 °C for 1 hrs.

Wash 3 times

Add goat anti mouse labeled horseradish peroxidase

Incubate 37 °C for 1 hrs.

Wash 5 times

Add OPD substrate

Incubate room temperature for 15 mins. in dark place

Add 4 N H_2SO_4

ELISA Reader at 492 nm

ภาพที่ 2 – 9. แสดงหลักการของวิธี indirect sandwich ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาของ Barbosa *et al.* (2000a) ได้ใช้กระดาษกรองชนิด plasticized ที่เคลือบด้วย polyvinyl alcohol glutaraldehyde เป็น solid phase เปรียบเทียบกับการใช้ microplate พบว่าความไวของปฏิกิริยาสูงกว่าในกลุ่มที่ใช้ microplate ชนิด polyvinyl chloride และช่วยลดโอกาสการเกิดผล false positive ได้ด้วย และการศึกษาของ Barbosa *et al.* (2000b) ที่ใช้กระดาษ cellulose acetate เป็น solid phase ซึ่งให้ค่าความไวของปฏิกิริยาดีกว่ากลุ่มที่ใช้ polyvinyl chloride microplate จากข้อมูลดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการนำเอากระดาษมาใช้เป็น solid phase เพื่อพัฒนาไปเป็น strip ELISA test kit ต่อไป

2.5. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์

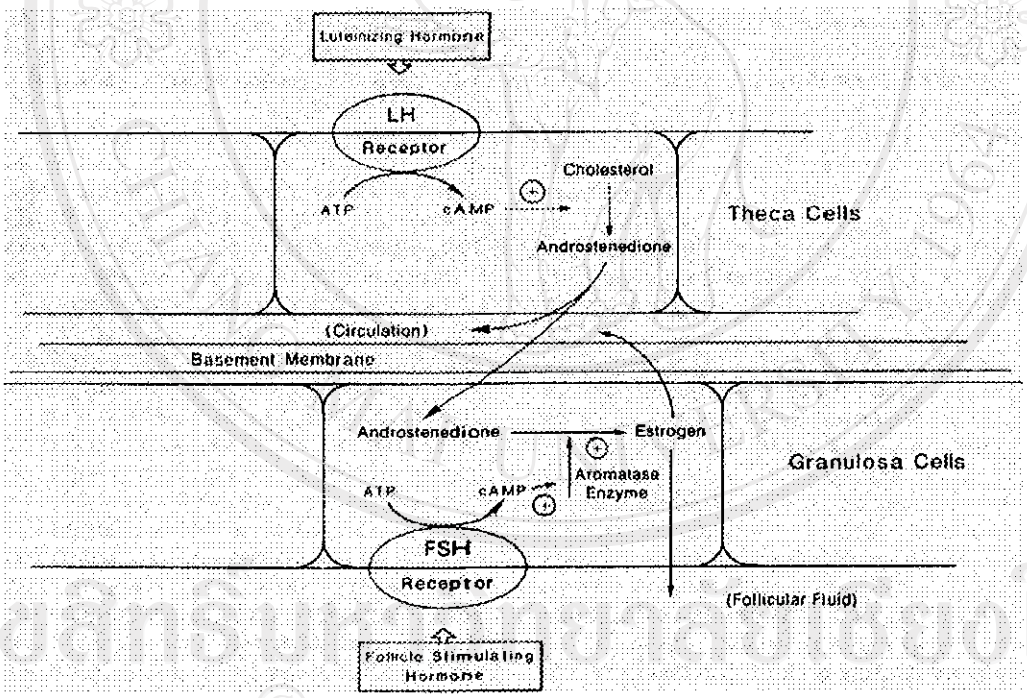
2.5.1. ปัจจัยเนื่องจากผลผลิตน้ำนม

ในกลุ่มโคนมที่ให้ผลผลิตสูงมักจะประสบปัญหาเนื่องจากความผิดปกติของสมดุลพลังงาน (negative energy balance) หลังคลอด เนื่องจากต้องการพลังงานทั้งในการผลิตน้ำนมและเพื่อดำรงชีพจึงต้องใช้พลังงานมาก ฮอร์โมนและเมตาบอไลท์ต่าง ๆ ต้องการสารอาหารมาใช้ในขบวนการเปลี่ยนแปลงสัญญาณต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบสืบพันธุ์โดยผ่านการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (hypothalamo pituitary axis) การศึกษาของ Reist *et al.* (2003) ทำการศึกษาในกลุ่มโคที่ให้ผลผลิตสูงพบว่า ความสมดุลของพลังงาน (energy balance) มีผลต่อโอกาสการผสมติด โดยในกลุ่มที่มี high energy balance ในการผสมครั้งแรกจะมีโอกาสผสมติดมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ energy balance หลังคลอดมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์โดยมีอิทธิพลต่อการทำงานของรังไข่และฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ เช่น LH และ GnRH เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hooijer *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าโคในกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูงจะมีโอกาสเสี่ยงการเกิด cystic ovarian มากกว่ากลุ่มที่ให้ผลผลิตต่ำกว่า ซึ่งในกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูงจะมีปัญหาเกี่ยวกับ negative energy balance แต่ในการศึกษาของ Rabiee *et al.* (2002) พบว่าความสามารถในการให้น้ำนมต่างกันไม่มีผลต่อระดับของฮอร์โมน P_4 ในพลาสม่า น้ำนม และอุจจาระ ซึ่งอาจเป็นไปได้มากที่ปัจจัยเนื่องจากผลผลิตน้ำนมอาจมีผลต่อการผลิตฮอร์โมนน้อยกว่าปัจจัย อื่น ๆ เช่น ปัจจัยเนื่องจากอาหาร หรือสภาพภูมิอากาศ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2.ปัจจัยเนื่องจากสภาพภูมิอากาศ

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน–ชื้น ซึ่งต้องเผชิญกับปัญหาที่เกิดขึ้นเนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่ค่อนข้างร้อนจึงมักประสบกับสภาพที่เรียกว่า heat stress (HS) บ่อยครั้ง HS เป็นสภาวะที่สัตว์ไม่สามารถทนกับสภาพอุณหภูมิสูงของสิ่งแวดล้อมทำให้สมรรถภาพในการผลิตของสัตว์เปลี่ยนแปลง ในสภาพอุณหภูมิสูง (hyperthermia) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรง และทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผิดปกติไปจากลักษณะทางพันธุกรรมปกติ (Dobson and Smith, 2000) จากการศึกษาของ Wolfenson *et al.* (1997) ซึ่งศึกษาผลของฤดูกาลและการได้รับ HS อย่างเฉียบพลันต่อความสามารถของ dominant follicles ในการผลิตฮอร์โมนต่าง ๆ พบว่า follicle มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนเปลี่ยนไป ฮอร์โมน E_2 มีปริมาณลดลงเนื่องจากการผลิตสารตั้งต้น androstenedione ลดลงใน theca cell และความเข้มข้นของเอนไซม์ aromatase ลดลง แต่มีผลต่อ granulosa cell น้อย (กลไกแสดงดังภาพที่ 2-10)



ภาพที่ 2 – 10. แสดงกลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนใน theca และ granulosa cell ที่บริเวณรังไข่ (Yen and Jaffe, 1986).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของ P_4 ลดลงในช่วงฤดูร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงฤดูหนาว ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิสูงกดการสังเคราะห์ P_4 ภายใต้สภาพอากาศร้อนทำให้ฟอลลิเคิลเจริญช้า และมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็น CL ล่าช้าไปด้วย (Wolfenson *et al.*, 2002) การศึกษาของ Badinga *et al.* (1993) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ aromatase ใน granulosa cell ลดลง และความเข้มข้นของ E_2 ใน follicular fluid ในวันที่ 8 ของรอบการเป็นสัดลดลง การศึกษาผลกระทบของ HS ต่อ CL อาจศึกษาโดยวัดปริมาณฮอร์โมน P_4 แต่ความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 ในพลาสม่าไม่ได้ขึ้นอยู่เฉพาะกับปริมาณการผลิตโดย CL แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการหลั่งฮอร์โมนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด ระดับ P_4 จากต่อม adrenal ขบวนการเมตาบอลิซึมที่ตับ ความเข้มข้นของเลือด ระดับความรุนแรงของความร้อน สภาพความเครียดเนื่องจากความร้อนเฉียบพลันหรือเรื้อรัง อายุโค จำนวน lactation และคุณภาพอาหารที่ได้รับ บางรายงานพบว่าระดับ P_4 ลดลงในช่วง HS (Wolfenson *et al.*, 1988) แต่บางรายงานพบว่า P_4 ไม่เปลี่ยนแปลง (Wise *et al.*, 1988) ในกลุ่มแม่โค (Wilson *et al.*, 1998b) และโคสาว (Wilson *et al.*, 1998a and Trout *et al.*, 1998) Younas *et al.* (1993) พบว่าการหลั่ง P_4 ในช่วง luteal phase เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีพัดลมช่วยระบายความร้อนในช่วงฤดูร้อน การศึกษาผลเนื่องจากฤดูกาล พบว่าในช่วงฤดูร้อนระดับ P_4 จะลดลงโดยไม่ได้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ CL (Howell *et al.*, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Jonsson *et al.* (1997) การลดลงของระดับฮอร์โมน P_4 เป็นผลเนื่องมาจากการได้รับความร้อนมากเกินไป โดยเฉพาะในกลุ่ม HS แบบเรื้อรัง และจะเพิ่มขึ้นในโคกลุ่มที่ได้รับ HS แบบฉับพลัน การที่โคได้รับ HS ในช่วงฤดูร้อนเป็นระยะเวลานานมีผลต่อการผลิตฮอร์โมน P_4 ส่งผลให้การพัฒนาของ follicle ผิดปกติทำให้เกิดความผิดปกติของรังไข่และเกิดการตายของตัวอ่อน (Ahmad *et al.*, 1995; อ้างโดย Wolfenson *et al.*, 2000) และมีผลต่อการเปลี่ยนสภาพจากฟอลลิเคิลเป็นคอร์ปัสลูเทียม และถ้าหาก P_4 มีระดับต่ำในช่วงหลังผสมจะเพิ่มโอกาสการสูญเสียตัวอ่อนได้ ผลของ HS ต่อการหลั่ง gonadotrophin hormone เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) โดย LH pulse จะลดลงในช่วงต้นของรอบการเป็นสัด (Wise *et al.*, 1988) และอาจส่งผลต่อการพัฒนา CL ผลเนื่องจาก HS เป็นดัชนีที่ช่วยให้ผู้เลี้ยงโคนมต้องเอาใจใส่โคนมให้มากขึ้นโดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อนโดยการเพิ่มการระบายอากาศภายในโรงเรียน หรือติดเครื่องพ่นน้ำ (sprinkler) เพื่อเพิ่มความเย็นให้แก่ตัวโคซึ่งจะเป็นผลดีต่อโคนม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved