บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

โคเลสเตอรอล (Cholesterol)

โคเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของสัตว์ และมีปริมาณน้อยภายในเซลล์ มีโครงสร้างหลักคือ cyclopentanoperhydrophenanthrene ring ที่มีหมู่ไฮดรอกซี่ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นขั้วที่อ่อนในตำแหน่งที่สามของวงแหวน (รูปที่ 2-1) และทำให้โคเลสเตอรอลมีความแข็ง (rigidity) กว่าไขมันชนิดอื่นที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ โคเลสเตอรอลมีมากในส่วนพลาสมา (blood plasma) ในรูปของไลโปโปรตีน (lipoprotein) และประมาณ 70% ของโคเลสเตอรอลถูกเอสเทอริไฟด์ (esterified) ด้วยกรดไขมันที่มีสายยาว กลายเป็นโคเลสเตอรอลที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ (cholesteryl ester)

โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นของสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormones) ซึ่งเป็นฮอร์โมนควบคุมหน้าที่ทางสรีรวิทยา (physiological function) รวมถึงการพัฒนาการทางเพศ (reproductive development) และเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต พืชมีสเตอรอล (sterol) อยู่ในรูปของ sigmasterol และ sitosterol ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ แตกต่างกันตรง aliphatic side chain ส่วนเชื้อราเซลล์เดียวและเห็ดรา (yeast and fungi) มี ergosterol เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ

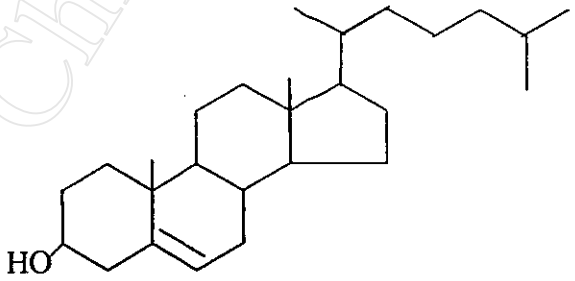

Figure 2-1. Structure of cholesterol (Voet and Voet, 1995).

การสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Cholesterol Biosynthesis)

ทุกๆ อะตอมของคาร์บอนของโคเลสเตอรอลมาจากอะซีเตต (acetate) ซึ่ง Bloch (1973, อ้างอิงโดย Voet and Voet, 1995) เป็นผู้เสนอว่าอะซีเตตจะเปลี่ยนเป็นหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) ที่มีคาร์บอนห้าอะตอม เป็นโครงสร้างหลัก (carbon skeletal) ของไอโซพรีนและรวม (condense) กันกลายเป็นสควอลีน (squalene) ที่เป็นเส้นตรง เกิดการหัก พับ (folding) และเกิดเป็นวงแหวน (cyclization) สี่วงกลายเป็นโคเลสเตอรอล

Acetyl Co A เปลี่ยนเป็นไอโซพรีน โดยการสร้าง Hydroxymethylglutaryl Co A (HMG Co A) HMG Co A เป็นสารตัวกลางของ isopentanyl pyrophosphate และ dimethylallyl pyrophosphate ในขบวนการเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางนี้มีเอนไซม์ที่ชื่อว่า Hydroxymethylglutaryl Co A reductase (HMG Co A reductase) ควบคุมอัตราความเร็วของปฏิกิริยา (rate-determining step) ของขบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (Mistry *et al.*, 1981) isopentanyl pyrophosphate สี่โมเลกุลและ dimethylallyl pyrophosphate สองโมเลกุลรวมกันเป็นสารตั้งต้นของโคเลสเตอรอลที่ชื่อว่า สควอลีน ถูกทำให้เป็นวงแหวนสี่วง (tetracyclic steroid skeletal) กลายเป็นลาโนสเตอรอล (lanosterol) และลาโนสเตอรอลเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอรอลซึ่งต้องการ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) และออกซิเจน ขบวนการทั้งหมดนี้เกิดขึ้นในเอนโดพลาสมิกเรทติคูลัม (endoplasmic reticulum)

โคเลสเตอรอลถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับ สามารถเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี (bile acid) หรือถูกเอสเทอริไฟด์เป็นโคเลสเตอรอลให้อยู่ในรูปเอสเทอร์โดยเอนไซม์ acyl-CoA:cholesterol acyl transferase (ACAT) โคเลสเตอรอลที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ ถูกหลั่งออกมาสู่ระบบหมุนเวียนเลือดในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีน (lipoprotein complex) เรียกว่า very-low density lipoprotein (VLDL) เมื่อ VLDL อยู่ในระบบหมุนเวียนเลือด ส่วนประกอบของ VLDL เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols) และอะโปไลโปโปรตีน (apolipoprotein) จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังเส้นเลือดฝอย (capillaries) ของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันแล้ว VLDL ถูกเปลี่ยนเป็น Intermediate density lipoprotein (IDL) และ Low density lipoprotein (LDL) ตามลำดับ (รูปที่ 2-2)

โคเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหารที่อยู่ในรูป LDL จะเข้าเซลล์โดยวิธี receptor mediated endocytosis โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ที่อยู่ภายในเซลล์จะถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) โดยเอนไซม์ไลโซโซมอลไลเปส (lysosomal lipase) ได้โคเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) หรือถูกเอส-

เทอริไฟด์อีกครั้งหนึ่ง โดยเอนไซม์ ACAT เพื่อเก็บเป็นเม็ดโคเลสเตอริลเอสเทอร์ (cholesteryl ester droplet) (รูปที่ 2-3)

อาหารที่มีโคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอริลเอสเทอร์ เป็นองค์ประกอบจะถูกขนย้ายเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดโดยสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ในลำไส้เรียกว่า chylomicrons (รูปที่ 2-2) เมื่อ chylomicrons เข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดแล้วไตรกลีเซอไรด์จะถูกเคลื่อนย้ายออกไปโดยเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) ได้ chylomicron remnants ซึ่งมันจะจับกับตัวรับจำเพาะเจาะจงที่ตับ (specific liver cell remnant receptor) และเข้าสู่ตับโดยวิธี receptor-mediated endocytosis (รูปที่ 2-3) ฉะนั้นเซลล์ตับและเนื้อเยื่อทั่วไปมีหน้าที่รับโคเลสเตอรอลได้สองทางคือ จากการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลที่ตับและกระแสเลือด

โคเลสเตอรอลมีการหมุนเวียนกลับไปมาระหว่างตับและเนื้อเยื่อทั่วไป (peripheral tissue) มี LDL ทำหน้าที่ขนย้ายโคเลสเตอรอลจากตับสู่เนื้อเยื่อทั่วไปและ High Density Lipoprotein (HDL) ขนย้ายโคเลสเตอรอลกลับมาสู่ตับ โคเลสเตอรอลส่วนเกินจะถูกสะสมในตับและเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี ซึ่งเป็นกลไกป้องกันร่างกายในการสะสมของสารที่ไม่ละลายในน้ำ (water-insoluble substance)

การควบคุมการสังเคราะห์และการขนย้ายโคเลสเตอรอลมีสามวิธี วิธีแรกคือ การควบคุมปฏิกิริยาของเอนไซม์ HMG Co A reductase ได้แก่ การควบคุมระยะสั้นโดยการควบคุมตัวเร่งปฏิกิริยาและการควบคุมระยะยาวโดยการควบคุมอัตราการสังเคราะห์และการย่อยสลายโคเลสเตอรอล วิธีที่สองคือการควบคุมการสังเคราะห์ LDL receptor และวิธีสุดท้ายคือควบคุมอัตราการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลและอัตราการเคลื่อนย้ายโคเลสเตอรอลอิสระ

ภาวะที่เลือดมีระดับโคเลสเตอรอลสูง (Hypercholesterolemia) เป็นผลมาจากการสร้าง LDL มากเกินไปหรือใช้ LDL น้อยเกินไป เกิดขึ้นจากสองสาเหตุ ได้แก่ Familial Hypercholesterolemia (FH) เป็นโรคพันธุกรรม (Dominant genetic defect) FH ที่เป็นโฮโมไซโกท (homozygote) ทำให้ LDL-receptor ทำหน้าที่ไม่สมบูรณ์ (Brown and Goldstein, 1986) เซลล์ไม่สามารถดูดซึมทั้ง LDL และ IDL เป็นสาเหตุให้ IDL ในกระแสเลือดสูงขึ้นตามและไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ตับได้ เพราะฉะนั้น FH ที่เป็นโฮโมไซโกทจะมี LDL- cholesterol ในกระแสเลือดสูงกว่าเฉลี่ยสามถึงห้าเท่า ส่วน FH ที่เป็นเฮ็ทเทอโรไซโกทจะสูงกว่าเฉลี่ยสองเท่า และการบริโภคอาหารที่มี โคเลสเตอรอลสูงจะให้ผลคล้าย FH แต่ไม่รุนแรงเท่า โคเลสเตอรอลที่บริโภคมากเกินไปเข้าสู่เซลล์ตับโดย chylomicron remnants และกด (depress) การสังเคราะห์ LDL-receptor เป็นเหตุให้ LDL - receptor ที่ผลิตได้ไม่มีประสิทธิภาพ ให้ผลคล้าย FH

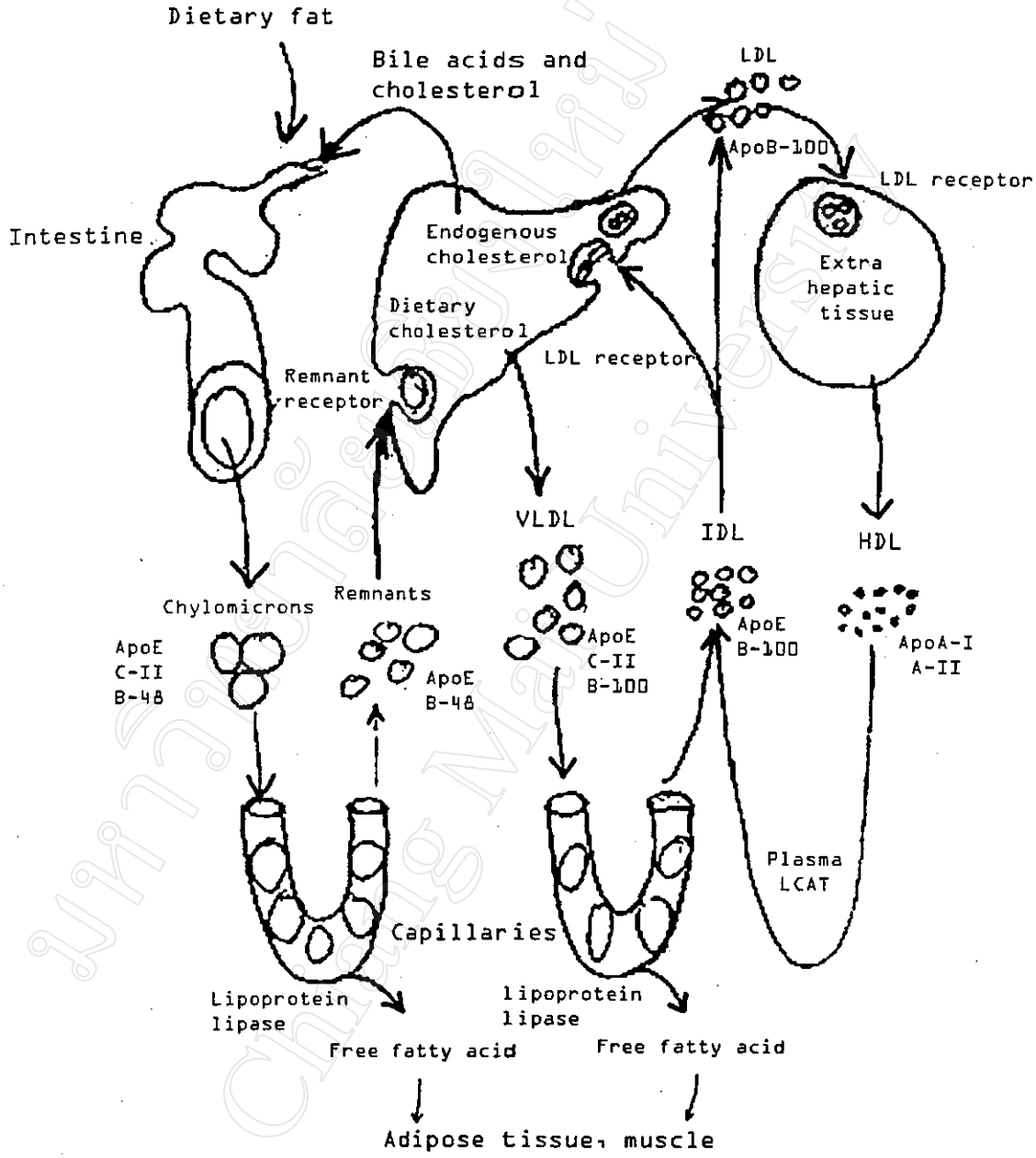

Figure 2-2. Blood cholesterol transportation.

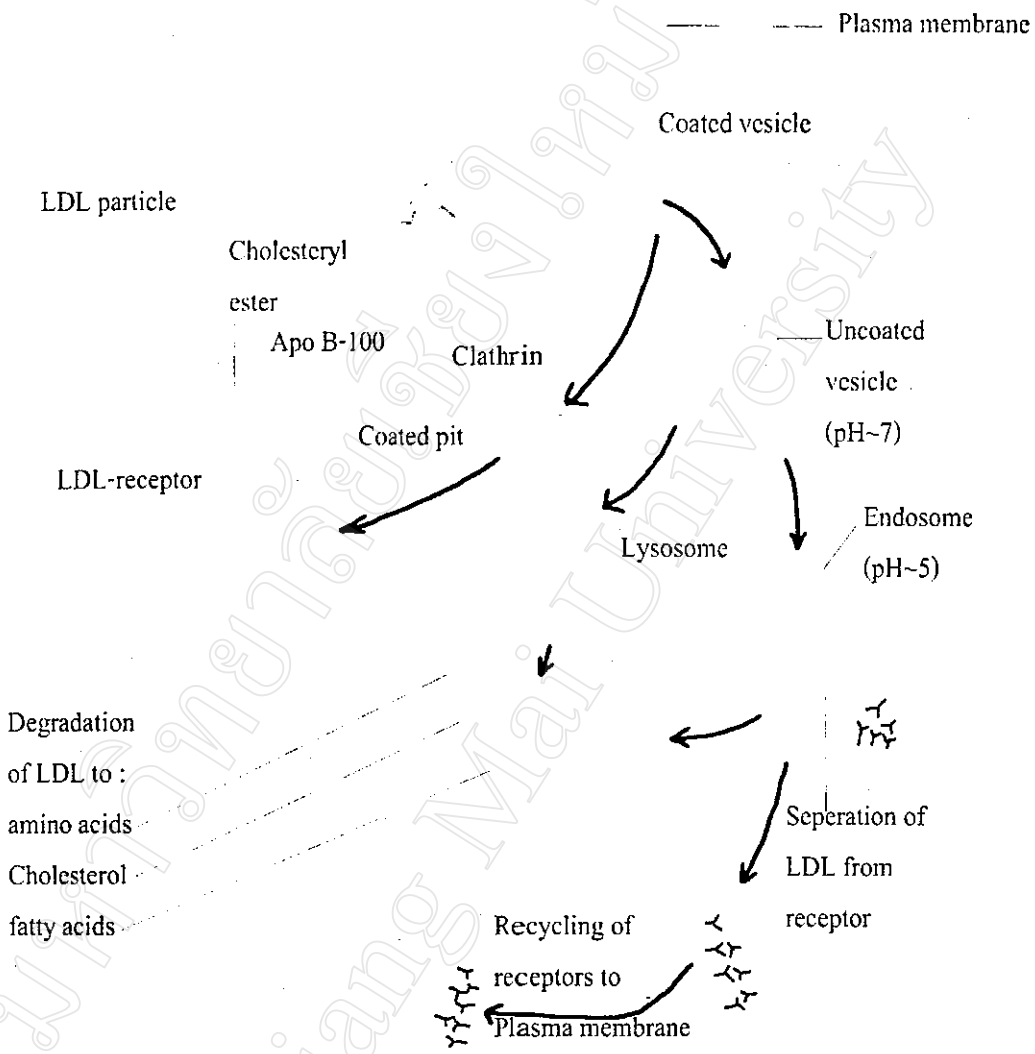

Figure 2-3. Receptor-mediated endocytosis in mammalian cell.

การใช้โคเลสเตอรอล (Cholesterol Utilization)

โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นของสเตียรอยด์ฮอร์โมนซึ่งแยกได้สามกลุ่มได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง กลุ่มฮอร์โมนต่อมหมวกไต (adrenal hormone) เช่น กลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids) และมินเนอร์ราลโรคอร์ติคอยด์ (mineralocorticoids) กลุ่มที่สอง กลุ่มฮอร์โมนเพศ เช่น แอนโดรเจน (androgens) และอีสโตรเจน (estrogens) กลุ่มที่สาม กลุ่มอนุพันธ์ของไวตามินดี (Vitamin D-derivatives) (พงษ์เพียจันทร์, 2538)

การกำจัดโคเลสเตอรอลออกจากร่างกายที่สำคัญที่สุดคือ กรดน้ำดี (bile acid) ที่สำคัญได้แก่ cholic acid และ chenodeoxycholic acid ซึ่งสังเคราะห์ในตับและหลั่งในรูปของ ไกลซีน (glycine) หรือทาอูรีน (taurine) สู่ท่อน้ำดีหลังจากนั้นจะหลั่งสู่ลำไส้เล็กทำหน้าที่ช่วยการรวมตัวกันระหว่างน้ำกับไขมัน (emulsifying agent) ในขบวนการย่อยและดูดซึมไขมันและไวตามินที่ละลายได้ในไขมัน (fat and fat-soluble vitamins) อัตราการหมุนเวียนกลับของกรดน้ำดี จากตับสู่กระแสเลือดและจากเลือดกลับสู่ตับใช้เวลาน้อยมาก มีการสูญหายระหว่างการหมุนเวียนกลับน้อยกว่าหนึ่งกรัมต่อวัน ถูกเมทาบอไลซ์โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่และถูกขับออกมาในอุจจาระ ซึ่งเป็นทางเดียวเท่านั้นที่ร่างกายขับโคเลสเตอรอลออกมาจากร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนสัตว์ปีก (Avian) สามารถขับโคเลสเตอรอลออกมาทางไข่ได้อีกด้วย (Hargis, 1988)

โครงสร้างของไลโปโปรตีน (Lipoprotein Structure)

อนุภาคของไลโปโปรตีนประกอบด้วยโปรตีน, ฟอสโฟไลปิดและโคเลสเตอรอลเพื่อสร้างผิวของอนุภาค และถูกหุ้มด้วยอะโปไลโปโปรตีนซึ่งมันสามารถกระจายตัวในน้ำถูกเคลื่อนย้ายในกระแสเลือด โดยการหมุนเวียนในรูปของไลโปโปรตีน แบ่งออกเป็นห้ากลุ่มตามหน้าที่ และคุณสมบัติทางกายภาพ (ตารางที่ 1)

Chylomicrons ขนย้ายไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลจากลำไส้ไปสู่เนื้อเยื่ออื่นๆ, VLDL ขนย้ายไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ภายในร่างกาย (endogenous triglycerols) และโคเลสเตอรอลจากตับไปสู่เนื้อเยื่ออื่นๆ, IDL ขนย้ายไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ภายในร่างกาย และโคเลสเตอรอลจากตับไปสู่เนื้อเยื่ออื่นๆ, LDL ขนย้ายไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ภายในร่างกายและโคเลสเตอรอลจากตับไปสู่เนื้อเยื่ออื่นๆ และ HDL ขนย้ายโคเลสเตอรอลที่อยู่ภายในร่างกาย (endogenous cholesterol) จากเนื้อเยื่ออื่นๆ ไปสู่ตับ

Table 1. Properties of lipoproteins

	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, A°	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 apopreteins	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 (Voet and Voet, 1995).

หน้าที่ของไลโปโปรตีน (Lipoprotein Function)

โคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์จากอาหารที่อยู่ใน chylomicrons ถูกส่งต่อไปยังท่อน้ำเหลืองของลำไส้ก่อนถูกปล่อยออกสู่ท่อน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณทรวงอก (thoracic duct) chylomicrons มีที่จับ (binding sites) ในเส้นเลือดฝอยของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ใน chylomicrons ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ LPL ซึ่งเป็นเอนไซม์ระหว่างเซลล์ (extracellular enzyme) โดยการกระตุ้นของ Apolipoprotein C-II ได้ monoacylglycerol และกรดไขมันแล้วถูกเก็บไว้ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ ส่วน chylomicrons ที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วจะมีส่วนประกอบของโคเลสเตอรอลในปริมาณที่มากเรียกว่า chylomicron remnants กลับเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดโดยเข้าจับกับที่รับ (receptor site) และถูกนำเข้าสู่เซลล์ตับ

VLDL สังเคราะห์ขึ้นที่ตับทำการขนย้าย (transport vehicles) ไขมัน,ไตรกลีเซอร์ไรด์, 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) ซึ่งเอนไซม์นี้จะเคลื่อนย้ายกรดไขมันจากคาร์บอนตัวที่สองของเลซิทินไปยังโคเลสเตอรอลได้โคเลสเตอริลเอสเทอร์ (Drayna *et al.*, 1987; Fracone *et al.*, 1989) และ Lysolecithin

Brown และ Goldstein (1986) พบว่าเซลล์ที่ได้รับโคเลสเตอรอลจากอาหารจะถูกนำผ่านเข้าสู่เซลล์โดยวิธี endocytosis (engulfment) ในรูปของ LDL โดยมี LDL receptor อยู่บริเวณผิวของเซลล์ซึ่งเชื่อม (binding) กับ Apo E และ Apo B - 100 อย่างจำเพาะเจาะจง LDL receptor อยู่ภายใน coat pits มี cathrin อยู่ภายในอีกชั้นหนึ่ง กลายเป็นถุง (vesicle) เมื่อ LDL ทำหน้าที่เป็นลิแกน (ligand) จับกับตัวรับที่จำเพาะเจาะจง (specific receptor) แล้วถูกนำเข้าไปใน lysosome เพื่อย่อยสลายอนุภาคของ LDL ได้ remnants receptor ส่วนโคเลสเตอรอลที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ lysosomal lipase ได้โคเลสเตอรอล สำหรับโคเลสเตอรอลส่วนเกินที่อยู่ภายในเซลล์ถูกเอสเทอริไฟด์อีกครั้งหนึ่ง เพื่อเก็บไว้ในเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ ACAT เมื่อเกิดการสะสมมากเกินไป จะมีกลไกป้องกันสองกลไกคือระดับโคเลสเตอรอลที่อยู่ภายในเซลล์ระดับสูงจะยับยั้งการสร้าง LDL receptor ทำให้ลดอัตราการ endocytosis และยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลโดยเอนไซม์ HMG Co-A reductase

HDL มีหน้าที่ตรงข้ามกับ LDL เนื่องจาก HDL จะนำเอาโคเลสเตอรอลจากเนื้อเยื่อและเปลี่ยนเป็นโคเลสเตอริลเอสเทอร์ โดยเอนไซม์ชื่อว่า LCAT เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดย apo A - I เพราะฉะนั้น HDL จัดเป็นตัวทำลายโคเลสเตอรอล (cholesterol scavenger)

Arteriosclerosis เป็นปรากฏการณ์ผนังเส้นเลือดแดงเพิ่มความหนาขึ้น เป็นวิการ (necrosis) ที่เกิดจากการสะสมไขมันภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ของผนังเส้นเลือดภายในมากเกินไป วิการนี้จะมีลักษณะหยาบ (fibrous) มีแคลเซียมมาเกาะ (calcified plaque) ทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางของท่อเส้นเลือดแดงสั้นลง และอุดตันในที่สุด เมื่อเกิดเช่นนั้นเลือดจะแข็งตัว แล้วกระแสเลือดจะหยุดไหล เรียกว่า Infarction ทำให้เนื้อเยื่อตาย การลดลงของ HDL-C และการเพิ่มขึ้นของ LDL-C จะเพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อโรคเส้นเลือดแดงของหัวใจ (cardiovascular arteries disease) ดังนั้นการเพิ่ม HDL-C เกี่ยวข้องกับการลดอัตราการเสี่ยงต่อโรคหัวใจ (Bagatell *et al.*, 1992)

ผลโคเลสเตอรอลในไข่ต่อสัตว์และคน

จากข้อความข้างต้นพบว่า โคเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นสารต้นตอของกรดน้ำดีและสเตียรอยด์ฮอร์โมน มีความสำคัญทางด้านสรีรวิทยาของสัตว์ และนอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อในกระแสเลือดมีระดับของโคเลสเตอรอลสูงและติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะมีผลทำให้ผนังเส้นเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis plaque) (Voet and Voet, 1995) Sacks และคณะ (1984) ได้ทดลองให้คนได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลปกติไม่มีไข่เป็นส่วนประกอบ (97 มิลลิกรัมต่อวัน) เปรียบเทียบกับคนที่ได้รับอาหารที่มีไข่เป็นส่วนประกอบซึ่งมีโคเลสเตอรอลสูง (418 มิลลิกรัมต่อวัน) เป็นเวลาสามสัปดาห์ ปรากฏว่า ระดับ LDL-C และ Apolipoprotein B ในกลุ่มคนที่ได้รับอาหารที่มีไข่เป็นส่วนประกอบสูงกว่ากลุ่มคนที่ได้รับอาหารปกติที่ไม่มีไข่เป็นส่วนประกอบ 11.11% และ 8.7% ($P<0.005$ และ $P<0.007$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Roberts และคณะ (1981) เคยได้ทดลองให้กลุ่มคนได้รับโคเลสเตอรอลจาก whole eggs (415 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม) และอีกกลุ่มหนึ่งได้รับโคเลสเตอรอลจาก egg substitute (4 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม) เป็นเวลาสี่สัปดาห์ปรากฏว่า กลุ่มคนที่ได้รับ whole eggs มีระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดสูงกว่ากลุ่มคนที่ได้รับ egg substitute อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) มีการเพิ่มการหลั่งกรดน้ำดี (bile acid) และลดอัตราการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล การกินไข่ที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูงมีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมมากกว่าเป็นผลมาจากกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) แต่เมื่อมีระดับโคเลสเตอรอลในอาหารเท่ากันชนิดของกรดไขมันมีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลในซีรัม (Trautwein *et al.*, 1997) นอกจากชนิดของกรดไขมันแล้วเลซิทินยังมีผลต่อระดับโคเลสเตอรอลอีกด้วย (Polichetti *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 1996) จากการทดลองทั้งสองจะเห็นได้ว่า ระดับโคเลสเตอรอลในไข่มีผลเสียต่อร่างกายผู้บริโภคเมื่อได้รับติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน การทดลองของ Goley และคณะ (1990) ได้ทดลองกับคนที่เกิดภาวะระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypercholesterolemia) ให้ได้รับหางนม (skim milk) จากวัวที่ปกติและจากวัวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้านจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารให้มีระดับโคเลสเตอรอลต่ำ ปรากฏว่า กลุ่มคนที่ได้รับหางนมจากวัวที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีระดับโคเลสเตอรอลต่ำ มีปริมาณโคเลสเตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) ต่ำกว่ากลุ่มคนที่ได้รับหางนมจากวัวปกติ 8% ($P<0.025$) นอกจากนี้ยังลดแรงดันเลือด systolic และ diastolic ลง 4 และ 5 มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ (Sharpe *et al.*, 1994) Gero *et al.* (1959) ได้ทดลองในกระต่ายให้ได้รับโคเลสเตอรอลในระดับสูง (2 กรัมต่อวัน) ปรากฏว่าระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด เพิ่มขึ้นจาก 66 mg/dL เป็น 710 mg/dL และเมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ฆ่ากระต่ายเพื่อดูเส้นเลือด aorta ปรากฏว่า

เส้นเลือด aorta ของกระต่ายที่ได้รับโคเลสเตอรอล 2 กรัมต่อวันเปลี่ยนแปลงเป็น atherosclerosis plaque นอกจากนี้ Ribeiro และคณะ (1994) พบว่า มวลร่างกาย (body mass) ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับโคเลสเตอรอลในซีรัม (r^2 = .00)

กลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าเมื่อได้รับโคเลสเตอรอลเข้าไปในร่างกายในปริมาณมากเกินพอ (excess) ก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย คือ ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลทั้งหมดในกระแสเลือดสูงและเกิดภาวะ atherosclerosis ได้ ดังนั้นจึงมีสมมติฐานว่า " ***ถ้าทำให้โคเลสเตอรอลกลายเป็นสิ่งที่ร่างกายไม่ต้องการ (antigen) ร่างกายจะมีกลไกทางระบบภูมิคุ้มกันออกมาต่อต้านโคเลสเตอรอลแล้วกลับเป็นผลให้ร่างกายมีระดับโคเลสเตอรอลลดต่ำลง***"

โดยปกติโคเลสเตอรอลภายในร่างกาย (endogenous cholesterol) ไม่ใช่สิ่งแปลกปลอม (non-foreigness) ไม่มีคุณสมบัติของแอนติเจน ได้แก่ Immunogenicity คือ ความสามารถทางธรรมชาติที่จะชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและ T lymphocyte ที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน

ดังนั้น โคเลสเตอรอลภายในร่างกาย จึงมีคุณสมบัติเป็นเพียงแฮปเทน (hapten) (แอนติเจนที่มีคุณสมบัติไม่ครบถ้วน) เมื่อนำมาเชื่อม (conjugated) กับสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่, สารแปลกปลอม, โปรตีน หรือโมเลกุลพาหะ (carrier molecule) เช่น Human serum albumin (HSA), Bovine serum albumin (BSA), Keyhole Limpets Hemocyanin (KLH) จะทำให้แฮปเทน กลายเป็นแอนติเจนได้ทันที (สาระสมบัติและคณะ , 2530)

การเปลี่ยนคุณสมบัติของโคเลสเตอรอลให้กลายเป็นแอนติเจน

Bailey และคณะ (1964) ได้นำผงโคเลสเตอรอลที่ติดกัมมันตรังสี ^{14}C (cholesterol-4-^{14}C) 10 กรัมละลายใน 10 มิลลิลิตร sebacyl dichloride ที่อุ่น เติม pyridine เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และเติมสารละลายของ bovine albumin (Fraction V) (10 กรัมใน isotonic saline 1 ลิตร) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.3 เติม pyridine และตั้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตกตะกอนด้วย acetone:alcohol (1:1) และล้างด้วย ether: ethanol (1:1) กรองและทำให้แห้ง จะทำให้โคเลสเตอรอลเปลี่ยนคุณสมบัติจาก

แฮปเทนกลายเป็นแอนติเจน Harlow และ Lane (1988) ได้เชื่อมเปปไทด์กับโปรตีนพาหะ ดังนี้: เตรียมสารละลายเปปไทด์ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) เติมโปรตีนพาหะ คนด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer bar) เติม glutaraldehyde อย่างช้าๆ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ glutaraldehyde เท่ากับ 0.2% ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาหนึ่ง ชั่วโมง เติมกรดอะมิโนไกลซีนในสารละลายให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 มิลลิโมลาร์ คนด้วยแท่งแม่เหล็กหนึ่งชั่วโมง แยกสารละลายที่ได้โดยการซึมผ่านเยื่อบางๆ (dialysis) วิธีการข้างต้นเรียกว่า การเชื่อมโดยใช้ glutaraldehyde แบบ 1 ขั้นตอน (1 step glutaraldehyde coupling) (Catty, 1990) และการเติมกรดอะมิโนไกลซีนเข้าไปในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อเป็นการหยุดการเชื่อมกันของเปปไทด์และโปรตีนพาหะ (Bailey *et al.*, 1964) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนคุณสมบัติของ immunogenicity คือ เป็นสารแปลกปลอมที่ไม่มีในร่างกาย, เมื่อแฮปเทนมีมวลมากกว่า 10,000 ดาลตัน จะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ immunogenicity และคุณสมบัติทางเคมีได้ (สาระสมบัติและคณะ, 2530)

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

เมื่อแฮปเทนเปลี่ยนคุณสมบัติกลายเป็นแอนติเจนแล้วนำเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ (immunization) เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอม การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันนั้นเรียกว่า Immune response แบ่งออกได้สองวิธี (Abbas *et al.*, 1994) วิธีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific or native immune response) เป็นการตอบสนองแบบง่ายๆ เกิดขึ้นเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมเป็นครั้งแรกหรือทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และวิธีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response) เกิดขึ้นเมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดแอนติเจนแปลกปลอมนั้นออกไปได้โดยวิธีไม่จำเพาะ ซึ่งแบ่งการตอบสนองออกเป็นสองส่วน คือ Humoral immunity (HMI) โดยใช้แอนติบอดีเป็นตัวกำจัดแอนติเจนแปลกปลอม มี B cells และ plasma cells เป็นผู้รับผิดชอบ และ Cell-mediated immunity (CMI) ตอบสนองโดยการทำหน้าที่ของ T cells เช่น Cytolytic T lymphocytes, Natural killer cell และ phagocytes

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถแบ่งออกได้เป็นสามระยะ (Abbas *et al.*, 1994) ดังนี้ ระยะที่หนึ่ง (cognitive phase) มีการจับกัน (binding) ระหว่างแอนติเจนกับตัวรับที่จำเพาะเจาะจงของลิมโฟซัยท์ที่เจริญเต็มที่ โดยที่ B lymphocytes จะปล่อยแอนติบอดีออกมาสู่

ผิวหน้าของเซลล์และสามารถจับกับอนุภาคแปลกปลอม โพลีแซคคาไรด์ หรือไขมันในรูปที่ละลายน้ำได้ ส่วน T lymphocytes มีตัวรับที่ยอมรับลำดับของเปปไทด์ที่สั้นๆ ของแอนติเจน ที่เป็นโปรตีน และยิ่งกว่านั้น T lymphocytes ที่มีคุณสมบัติในการยอมรับและตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์จะไปแสดงบนผิวหน้าของเซลล์อื่นๆด้วย ระยะที่สอง (activation phase) เป็นลำดับของเหตุการณ์ต่อมาหลังจากเกิดการเหนี่ยวนำลิมโฟซัยท์ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจง ลิมโฟซัยท์จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญสองประการ คือ เกิดการแบ่งตัว (proliferation) มีการขยาย (expansion) จำนวนของลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจน และขยาย (amplification) การป้องกันให้มากขึ้น และลิมโฟซัยท์จะพัฒนา (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 ในขบวนการ activation ของลิมโฟซัยท์มีสัญญาณมากระตุ้นอยู่สองชนิดคือ แอนติเจน และ helper cells หรือ accessory cells ระยะสุดท้าย (effector phase) เป็นระยะที่ลิมโฟซัยท์ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ทำหน้าที่กำจัดแอนติเจนโดย effector cell การทำงานต้องมี non-lymphoids cell และกลไกการป้องกันอื่นร่วมด้วย เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดีเกิด phagocytosis โดยการกระตุ้นของ neutrophils และ mononuclear phagocytes มีโปรตีนในเลือดที่เรียกว่า complement ช่วยในการทำให้เซลล์แตก และ phagocytosis ของเชื้อจุลชีพ แอนติบอดีชนิดอื่นๆ กระตุ้น mast cell ให้เกิด degranulation แล้วปล่อย mediator เพื่อต่อสู้กับการติดเชื้อ (infection) และตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute inflammation) T lymphocytes หลั่ง cytokines ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนกระตุ้น phagocytosis และการอักเสบอย่างเฉียบพลัน phagocytes, complement , mast cells, cytokines และ leukocytes ที่ทำให้เกิดการอักเสบ ทุกตัวล้วนแต่เป็นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสิ้น

ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลในสัตว์เลี้ยง

Bailey และคณะ (1964) ได้ทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลโดยการเชื่อม (conjugated) โคเลสเตอรอลกับ Bovine serum albumin (Fraction V) ในกระต่ายด้วยแอนติเจนตัวละ 25 มิลลิกรัมปรากฏว่า กระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลและได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอล 1% มีปริมาณไขมันทั้งหมดและโคเลสเตอรอลทั้งหมดต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.001$) และมี plaque ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลปกติ ระดับของโคเลสเตอรอลในกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลมีแนวโน้มสูงขึ้นและ plaque ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Alving และคณะ (1996) ซึ่งได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลโดย liposome ที่มี dimyristoyl phosphatidylcholine, dimyristoyl phosphatidylglycine และ *lipid A* ที่มาจาก *Salmonella minnesota* ในอัตราส่วน 2.5 : 0.9 : 0.1 โมล โดย *lipid A* ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดียิ่งขึ้น (adjuvant) ในกระต่ายที่ได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอล ปรากฏว่า Ig G ของกระต่ายกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.03$) ที่ 1:50 dilution และระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น Swartz และคณะ (1988) ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลโดยใช้ liposome ในหนู (mice) ปรากฏว่าแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลของหนูมีค่าสูง (1:31,250 dilution) และทำหน้าที่กำจัด (neutralized) โคเลสเตอรอลบริเวณผิวของเซลล์ตับหนู

การวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์

หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลแล้วต้องมีการตรวจหาความเจือจางสูงสุดของซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือที่เรียกว่า แอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titre) (สาระสมบัติและคณะ, 2530) Gero และคณะ (1959) ได้วัดปริมาณแอนติบอดีของกระต่ายและไก่ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้าน β-lipoprotein ด้วยวิธี interfacial precipitation Bailey และคณะ (1964) ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโคเลสเตอรอลโดยการเชื่อมโคเลสเตอรอลกับ BSA หลังจากนั้นได้วัดปริมาณแอนติบอดีที่ร่างกายของกระต่ายผลิตขึ้นด้วยวิธี interfacial precipitation เช่นเดียวกันกับ Klopstock และคณะ (1964) วัดปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Complement-fixation วิธีการที่

กล่าวมาข้างต้นมีความไว (sensitivity) ในการตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าโดยการใช้เอนไซม์เป็นตัวตรวจวัดเรียกว่า เอนไซม์ลิงก์เกจ-อิมมูโนซอเบนท์แอสเซย์ (Enzyme-linkage Immunosorbent Assay; ELISA) (Catty, 1990) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูง หลักการโดยย่อมีดังนี้ (รูปที่ 2-4): นำแอนติเจนมาติดกับวัฏภาคของแข็ง (solid phase) หลังจากนั้นนำซีรัมตัวอย่างหรือแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหามาจับกับแอนติเจนแล้วนำเอา anti-antibody ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์มาจับกับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหาอีกทีหนึ่ง เติมสารตั้งต้นเพื่อการพัฒนาสี อ่านค่าดูดกลืนแสง (Voller *et al.*, 1978) วิธีการดังกล่าวเรียกว่า Indirect ELISA ซึ่งเป็นวิธีการหาแอนติบอดีไตเตอร์แบบวิธีอ้อม (indirect method) Shimizu และคณะ (1988) ได้วัดแอนติบอดีต่อ *Eschericia coli* โดยวิธี ELISA แบบวิธีอ้อม โดยใช้ polystyrene plate เป็นวัฏภาคของแข็งในการยึดเกาะ *E. coli* Swartz และคณะ (1988) ได้วัดแอนติบอดีต่อ โคเลสเตอรอลโดยใช้ polystyrene plate เป็นที่ยึดเกาะโคเลสเตอรอลที่ละลายในเอทานอล Mezdour และคณะ (1994) ใช้ polystyrene plate เป็นที่ยึดเกาะแอนติเจนเช่นเดียวกัน ส่วน Aniagolu และคณะ (1995) และ Dijkstra และคณะ (1996) ใช้ polyvinylidenefluoride (PVDF) membrane เป็นวัฏภาคของแข็งสำหรับการเกาะโคเลสเตอรอลที่ละลายในเอทานอล ปริมาณแอนติเจน (โคเลสเตอรอล) ที่ใช้ในการยึดเกาะกับวัฏภาคของแข็ง 5-10 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (well) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน (Aniagolu *et al.*, 1995) หรือ 1 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (Wassef *et al.*, 1989) หรือ 5-10 ไมโครกรัมต่อ 100ไมโครลิตรต่อหลุม ทำให้แห้งภายในเวลา 2 ชั่วโมง (Dijkstra *et al.*, 1996) หรือ 40 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมทำให้แห้งโดยใช้พัดลมเป่าภายในเวลา 45 นาที (Avila *et al.*, 1996) หลังจากนั้นจะเคลือบ polystyrene plate (coating) ด้วย 1% BSA ใน phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Avila *et al.*, 1996) หรือใช้ซีรัมที่ถูกทำให้หมดฤทธิ์ด้วยความร้อนเข้มข้น 10 % (10 % heat activated fetal bovine serum) ใน PBS (Wassef *et al.*,1989; Dijkstra *et al.*,1996; Swartz *et al.*,1988) หรือ 10 กรัมต่อ BSA 1 ลิตร ที่มี Triton X-100 10 มิลลิลิตรต่อ BSA 1 ลิตร (Mezdour *et al.*, 1994) หรือเจลาตินใน PBS ที่มีความเข้มข้น 0.3% (Alving *et al.*,1996) จากนั้นเติมซีรัมตัวอย่างที่ต้องการหาไตเตอร์มาเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Shimizu *et al.*, 1988) หรือ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (Swartz *et al.*,1988) หรืออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Li *et al.*, 1998) หรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Wassef *et al.*, 1989) หรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Mezdour *et al.*, 1994) ล้างและเติมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับ

แอนติบอดีที่ต้านซีรัมตัวอย่างที่ต้องการหาแอนติบอดีไตเตอร์ เช่น alkaline phosphatase-rabbit anti-chicken IgG (Shimizu *et al.*, 1988) หรือ peroxidase-rabbit anti-chicken IgG (Li *et al.*, 1998) หรืออาจใช้ polyvalent Ig ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ก็ได้ (Avila *et al.*, 1996) ล้างแล้วเติมสารตั้งต้นเพื่อการพัฒนาสี (substrate) เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 (Harlow และ Lane, 1988) แล้วอ่านค่าดูดกลืนแสง (Absorbance)

การขนย้ายโคเลสเตอรอลจากกระแสเลือดไปยังไข่และการควบคุม

เมื่อระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลงอาจทำให้การส่งผ่านโคเลสเตอรอลไปยังรังไข่ (ovary) ลดลงโดยขบวนการ receptor-mediated endocytosis (Elkin, 1997; Bujo *et al.*, 1997) ในรูปของไลโปโปรตีน (Gilbert และ Pearson , 1983) เพื่อการเจริญเติบโตเป็นไข่ (oocytes)

ไก่ไข่เมื่อเจริญเติบโตทางด้านร่างกายเต็มที่ (maturity) ร่างกายไก่จะมีความพร้อมเพื่อการพัฒนาลักษณะทางเพศที่สอง (secondary sexual characteristic) โดยอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอีสโตรเจน (oestrogen) (Elkin, 1997) ปัจจัยหลักที่ทำให้ไก่มีพัฒนาการทางด้านการสืบพันธุ์ได้แก่ ช่วงความยาวแสง (daylength) โดยเมื่อความยาววันยาวขึ้นจะไปกระตุ้นต่อมไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีรีสซิ่งแฟกเตอร์ (gonadotropin releasing factor, GnRF) กระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้สร้างฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติ้งฮอร์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) กระตุ้นให้กระเปาะไข่เกิดการพัฒนาให้มีขนาดใหญ่ขึ้น และสร้างฮอร์โมนลูทินไนซิ่งฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) เพื่อทำให้กระเปาะไข่เกิดการตกไข่ (ovulation) และ LH กระตุ้น granulosa cell ให้สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ซึ่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนี้ไปยับยั้ง hypothalamus ไม่ให้สร้าง GnRH เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้สร้าง LH มากจนเกินไป ดังรูปที่ 2-5

ส่วนประกอบของไข่แดงส่วนมากถูกสร้างขึ้นโดยตับ และอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ได้แก่ FSH และ LH (Sturkie, 1986) และสเตียรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ อีสโตรเจน (Elkin, 1997) ส่วนประกอบต่างๆ ของไข่แดงถูกขนย้ายมาทางกระแสเลือด โดยไขมันและโคเลสเตอรอลในตับถูกขนย้ายในรูปของไลโปโปรตีน ซึ่งตับเก็บไขมันอยู่ในรูปเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) หรือเม็ดไขมันรวมทั้งไวตามินที่ละลายในไขมันด้วย (fat-soluble vitamin) มีการ

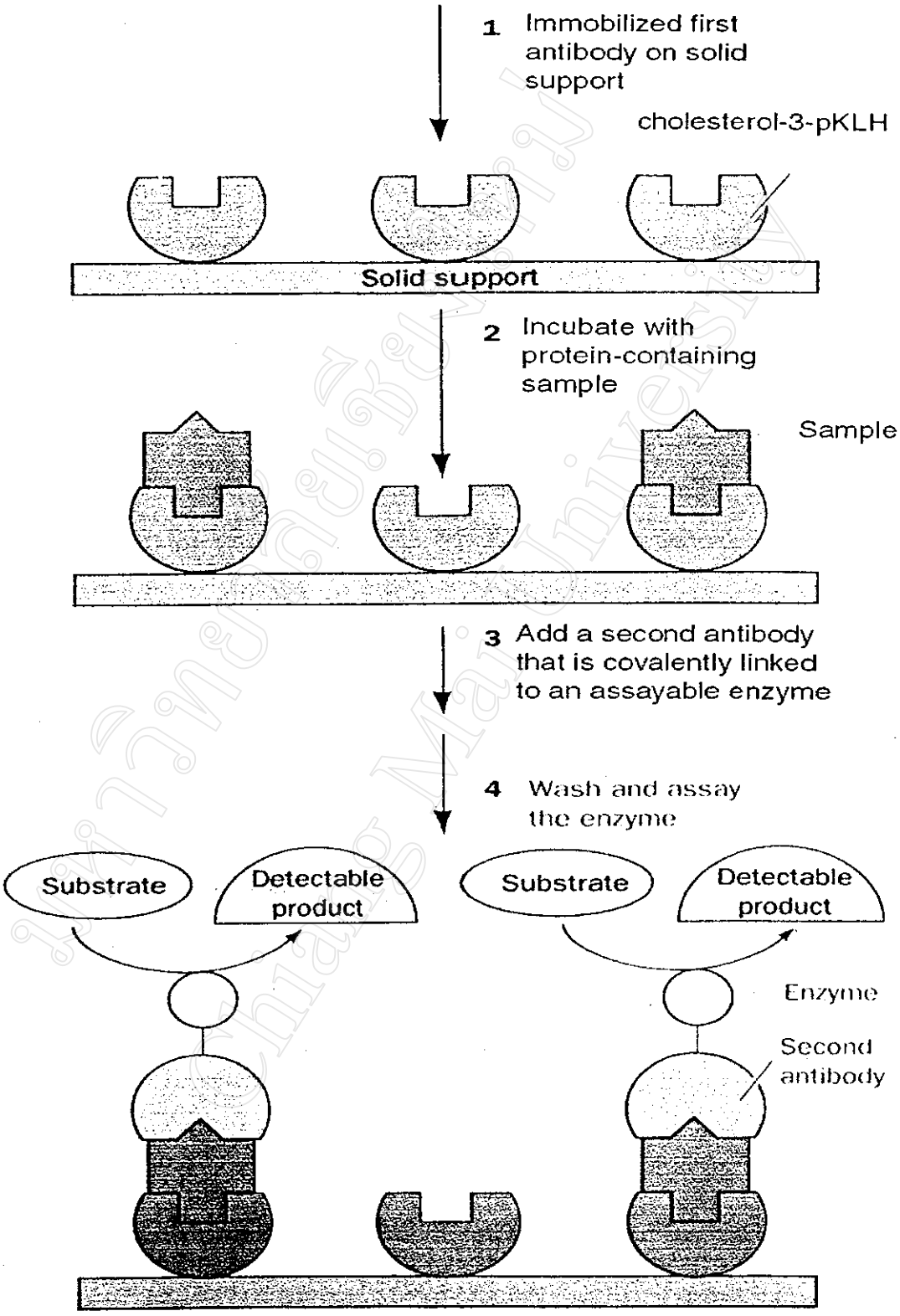

Figure 2-4. Indirect ELISA.

ขนย้ายโคเลสเตอรอลประมาณ 220 มิลลิกรัม (Bujo *et al.*, 1997) ส่วนไวตามินที่ละลายในน้ำถูกขนส่งโดยตรงจากลำไส้เล็กมายังกระเปาะไข่ (Hermier, 1997) แร่ธาตุที่อยู่ในไข่แดงอาจอยู่ร่วมกับโปรตีน (mineral bounded protein) ที่เรียกว่า vitellogenin มีอยู่สองรูปได้แก่ lipovitellin และ phosvitin ถูกขนส่งมาในรูปของไลโปโปรตีนด้วยเหมือนกัน ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำหรือไขมันต่ำ หรือมีปริมาณโคเลสเตอรอลหรือไขมันในกระแสเลือดต่ำ อาจทำให้ร่างกายของไก่สร้างไข่ที่มีไขมันหรือโคเลสเตอรอลต่ำได้ ดังรูปที่ 2-6

การสร้างไข่ไก่แต่ละฟองใช้เวลาประมาณ 25 ชั่วโมงและสร้างเป็นลำดับขั้น (Gilbert และ Pearson, 1983) โดยมีกระเปาะไข่ (follicle) จำนวนมากมายคล้ายพวงองุ่น (bunch of grapes) อยู่ในรังไข่ (ovary) กระเปาะไข่แต่ละอันมีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 – 150 ไมโครเมตร (McIndoe, 1971) และกระเปาะไข่ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 35 มิลลิเมตร (Bujo *et al.*, 1997) หรือมีน้ำหนัก 0.08 ถึง 15-18 กรัมเกิดการตกไข่ (ovulaiton) ลงมายังท่อนำไข่ (oviduct) ในส่วนที่เรียกว่า infundibulum จะอยู่บริเวณนี้ประมาณ 15 นาที (Sturkie, 1986) หลังจากนั้นกระเปาะไข่ที่มีขนาดใหญ่ตกลงมายัง infundibulum อีก กระเปาะไข่ที่ตกลงมาถูกหุ้มด้วยอัลบูเมนทันทีที่ตกลงสู่ท่อนำไข่ แต่อย่างไรก็ตามการสะสมอัลบูเมนจะมีมากที่สุดในท่อนำไข่ส่วนที่เรียกว่า magnum ซึ่งอัลบูเมนมีลักษณะข้นและเหนียว (gelatinous) หลังจากนั้นมีการเติมน้ำเข้าไปยังอัลบูเมนที่ข้นและเหนียว เรียกว่า ไข่ขาว (egg-white) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง ไข่ถูกส่งมายังท่อนำไข่ในส่วนที่เรียกว่า isthmus มีการพอกส่วนของเปลือกไข่ (shell-membranes) ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะอยู่ในส่วนที่เรียกว่า uterus หรือ shell gland ทำให้ไข่มีรูปร่างและมีการหุ้มไข่ด้วยไขที่เรียกว่า cuticle ใช้เวลาประมาณ 18 – 20 ชั่วโมง

การวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่

ไข่ที่มีน้ำหนัก 60 กรัม ประกอบด้วยน้ำ 40 กรัม โปรตีน 7 กรัม ไขมัน 7 กรัม คาร์โบไฮเดรต 0.4 กรัม แร่ธาตุ 2.5 กรัม ธาตุที่ไม่ใช่โลหะอีก 3 กรัม และไขมัน 7 กรัม (Gilbert และ Pearson, 1983) มีโคเลสเตอรอลอยู่ 280 มิลลิกรัม (4% ของไขมัน) (McIndoe, 1971) การแยกโคเลสเตอรอลออกจากไข่แดงต้องกำจัดสารอื่นในไข่แดงออกก่อน ได้แก่ น้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและแร่ธาตุ ซึ่งไขมันและโคเลสเตอรอลสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform), เมธานอล (methanol), เอธานอล (ethanol) และเฮกเซน

(hexane) หรือส่วนผสมของตัวทำละลายเหล่านี้ เช่น คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ส่วนโปรตีน น้ำ หรือสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำจะถูกแยกออกโดยใช้เวลาประมาณ 3 นาที (Folch *et al.*, 1951) ไขมันและโคเลสเตอรอลถูกแยกออกจากกันโดยใช้สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ละลายในแอลกอฮอล์ (alcoholic KOH: alc. KOH) โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์จะซาปอนิไฟด์ (saponified) ไขมันให้ตกตะกอนในน้ำที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 55-60 นาที (Abell *et al.*, 1951) และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ละลายโคเลสเตอรอลออกจากไขมันอีกทีหนึ่ง แยกสารที่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ออกมาแล้วทำให้แห้ง (Naito *et al.*, 1972) เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอล

ในซีรัมของไก่มีโปรตีน ฟอสโฟไลปิด ไขมัน โคเลสเตอรอล แร่ธาตุเป็นองค์ประกอบ ขั้นตอนการแยกโคเลสเตอรอลออกจากซีรัมไม่ซับซ้อนเหมือนไข่ไก่ เพราะส่วนประกอบของซีรัมนั้นมีไขมันน้อยกว่าไข่แดง ดังนั้นไม่จำเป็นต้องสกัดเอาไขมันออก แต่ใช้ alc. KOH สกัดเอาโคเลสเตอรอลออกจากซีรัมที่ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 55-60 นาที ซึ่งอัลกอฮอล์จะตกตะกอนสารประกอบโปรตีน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์จะซาปอนิไฟด์ไขมันและตกตะกอนในน้ำ แร่ธาตุอื่นๆ ที่ละลายได้ในน้ำและเมื่อปั่นด้วยแรงเหวี่ยงสูงๆ ทำให้ตะกอนและแร่ธาตุอยู่ชั้นล่าง ส่วนโคเลสเตอรอลที่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์อยู่ชั้นบน หลังจากนั้นทำให้แห้งเพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอล นอกจากการใช้ alc. KOH แล้วยังสามารถสกัดเอาโคเลสเตอรอลออกจากซีรัมได้ด้วย isopropanol 99% โดยไม่ต้องใช้เวลานาน ไม่ต้องใช้ความร้อน ไม่ต้องทำให้แห้งก่อนหาปริมาณโคเลสเตอรอล (Naito *et al.*, 1972) แต่ isopropanol 99% มีราคาแพงมากและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงต้องใช้กรณีนี้เตรียมสารละลายโคเลสเตอรอลมาตรฐานเท่านั้น (Leffler, 1959) เมื่อตัวอย่างที่สกัดแห้งแล้ว นำมาเติมสารเพื่อการพัฒนาให้เกิดสี (coloring reagent) ทิ้งไว้ 30 นาที อ่านค่าดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้มาเข้าสมการทำนายปริมาณโคเลสเตอรอล

นอกจากการหาปริมาณโคเลสเตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) โดยวิธีเคมี (chemical method) แล้วยังมีการหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยการใช้เอนไซม์ cholesterol ester hydrolase (C.E.H.) (Allian *et al.*, 1974) โดยเอนไซม์ C.E.H. ไฮโดรไลซ์โคเลสเตอริลเอสเทอร์เป็นโคเลสเตอรอล และเอนไซม์ cholesterol oxidase ออกซิไดซ์โคเลสเตอรอลให้เป็น cholest-4-en-3-one และเอนไซม์ hydrogen peroxide oxidoreductase เปลี่ยนให้เป็น Quinoneimine ซึ่งเป็นสารสี (dye) และอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร การใช้วิธีเอนไซม์มีราคาแพงกว่าการหาปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีเคมี

นอกจากระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะลดลงแล้วแอนติบอดีของไก่ที่ผลิตขึ้นสามารถผ่านไปยังไข่แดงได้ (Larsson, 1993) ในรูปของ Ig G หรือ Immunoglobulin Y (Ig Y) โดยการผ่านทาง follicular epithelium ของรังไข่ (Patterson *et al.*, 1962) ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส ทนค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 ได้นานถึง 30 นาทีโดยที่ยังคงมีคุณสมบัติของ Ig Y อยู่ (Shimizu *et al.*, 1988) Ig Y ที่ได้นี้เมื่อผ่านเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร สามารถจับกับโคเลสเตอรอลที่มากับอาหาร อาจทำให้โคเลสเตอรอลไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งเป็นอีกหนทางหนึ่งที่ผู้บริโภคจะได้รับจากอาหารที่มีโคเลสเตอรอลต่ำโดยวิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีปริมาณของ Ig ที่จำเพาะเจาะจงประมาณ 130 มิลลิกรัมต่อไข่หนึ่งฟอง (Gassmann *et al.*, 1990) หรือมี Ig Y ประมาณ 83.2 ถึง 105.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของไข่แดง และไข่แดงจะมี activity ของแอนติบอดีสูงกว่าซีรัมในวันที่ 14 – 70 หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

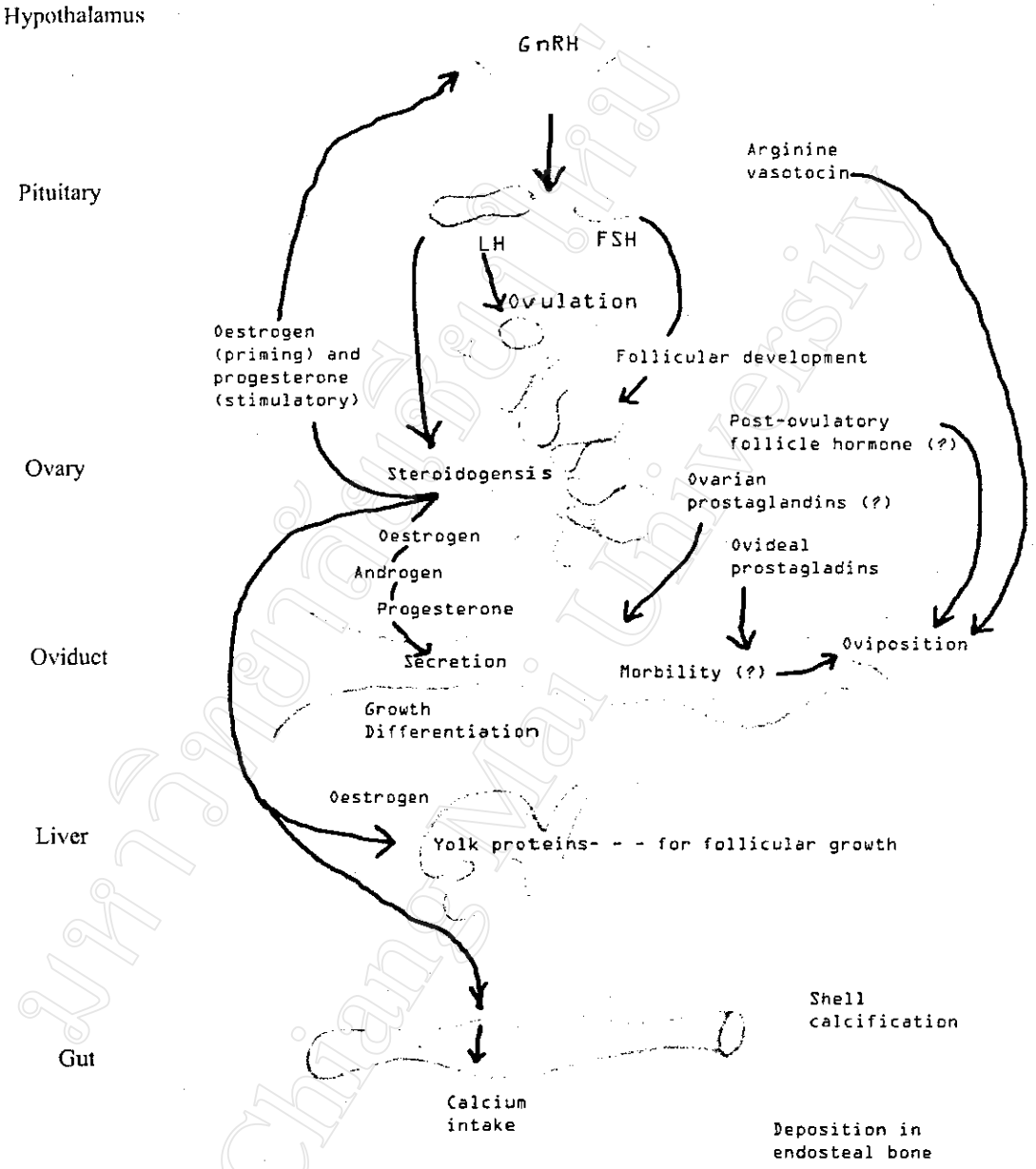

Figure 2-5. Major endocrinological interrelationships in the control of ovarian and oviducal function (Gilbert and Pearson, 1983).

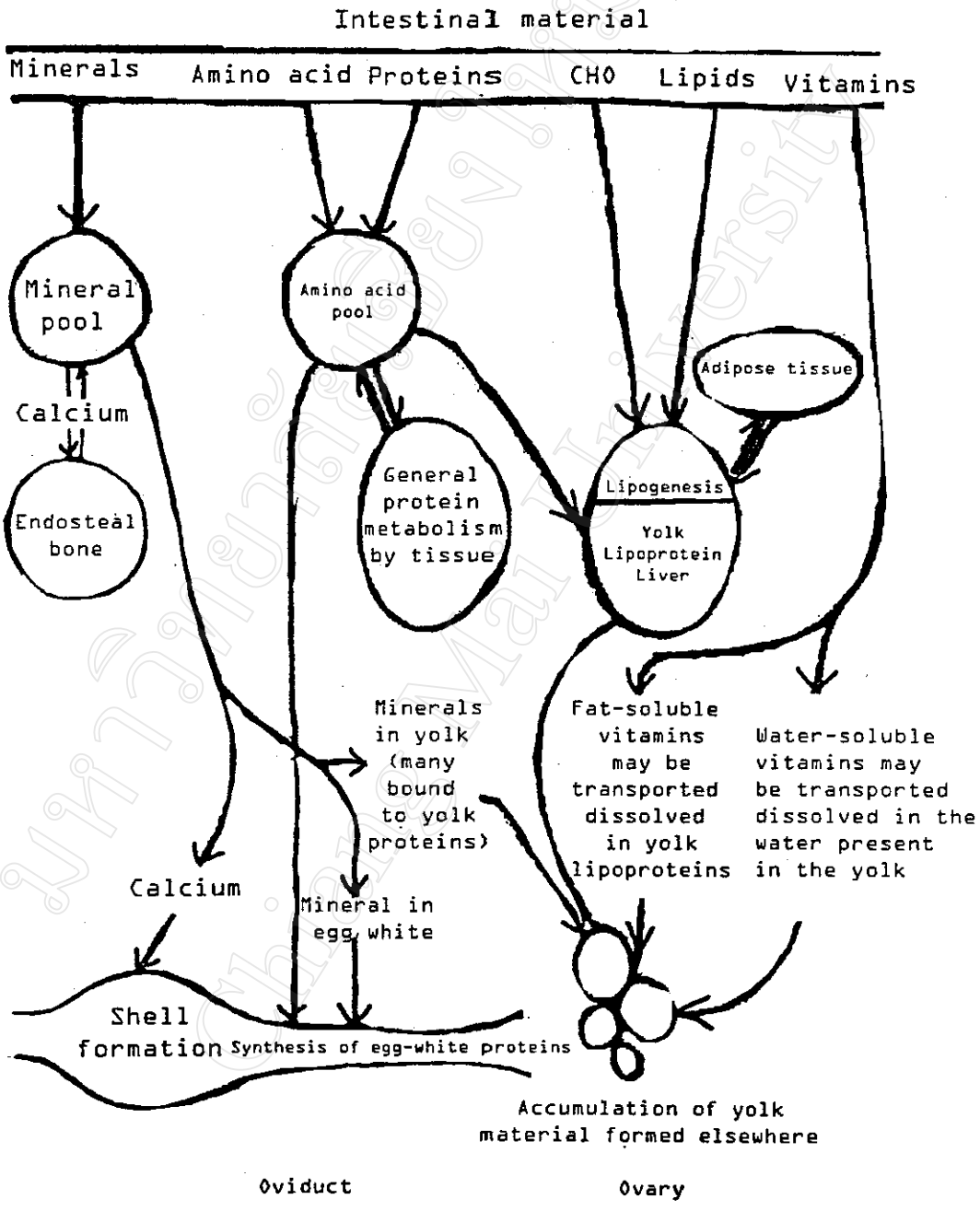

Figure 2-6. Major nutritional influences of the formation of egg (Gilbert and Pearson, 1983).