บทที่ 5
วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

การใช้ cholesterol-BSA ในการผลิตแอนติบอดีในซีรัมและในไข่

สารโมเลกุลขนาดเล็กสามารถเชื่อม (conjugate) กับโมเลกุลพาหะ (carrier molecule) เพื่อให้สารโมเลกุลขนาดเล็กเปลี่ยนคุณสมบัติจากเฮปเทน (hapten) กลายเป็นแอนติเจนได้ (สุทธิพันธ์และคณะ, 2530) โมเลกุลพาหะที่ใช้สำหรับการเชื่อมกับโมเลกุลเฮปเทนมีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือโบวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) BSA สามารถละลายได้ง่ายและเป็นโมเลกุลพาหะที่ดี โดยมีผลกระตุ้นการทำงานของ B cell และ T cell ด้วย แต่ต้องมีปริมาณของ BSA มากพอจึงจะทำให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้ (Harlow and Lane, 1988) เช่น การเชื่อมโคเลสเตอรอลกับอัลบูมินแล้วนำมากระตุ้นให้กับกระต่ายพบว่าสามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลโดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 0.80 และพบการทำงานของระบบคอมพลีเมนท์ (complement) อีกด้วย (Klopstock *et al.*, 1964) หรือการเชื่อมโมเลกุลของเทสโทสเตอโรน (testosterone) กับโมเลกุลของฮิวแมนซีรัม อัลบูมิน (human serum albumin, HAS) (ศุภมิตร, 2539) หรือการเชื่อมโคเลสเตอรอลกับกรดโคลานิก (cholanic acid) ด้วยอัลบูมิน (Sato *et al.*, 1976) การทดลองครั้งนี้ได้ใช้โมเลกุลเฮปเทน ได้แก่โคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนทที่เชื่อมกับโมเลกุลพาหะ คือ BSA (cholesterol-BSA)โดยมีอัตราการเชื่อมติดของโมเลกุลเฮปเทนต่อโมเลกุลพาหะเท่ากับ 17:1 แล้วนำมากระตุ้นให้กับนกกระทาที่อายุ 60 วัน ปรากฏว่าระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลของนกกระทาที่ได้รับการกระตุ้นสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ phosphate buffer saline (PBS) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 0.70 แสดงว่า การทดลองในครั้งนี้ การใช้โคเลสเตอรอลที่เชื่อมกับ BSA สามารถกระตุ้นให้นกกระทาผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลขึ้นได้เป็นอย่างดี ดังนั้นโคเลสเตอรอลที่เชื่อมกับ BSA ในตำแหน่งที่ 3 มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน Yoon *et al.* (1993) พบว่า การเชื่อมโมเลกุลขนาดเล็กกับโมเลกุลพาหะในตำแหน่งที่ต่างกันมีผลต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกันด้วย ในการทดลองครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาถึงตำแหน่งการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลพาหะกับโคเลสเตอรอลในตำแหน่งอื่นของ cyclopentanoperhydrophenanthrene ring ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถผ่านไปยังไข่แดงได้ (Larsson *et al.*, 1993) ในรูปของ IgG และ IgY โดยผ่านทาง follicular epithelium ของรังไข่ (Patterson *et al.*, 1962) สามารถผลิต IgY จากไข่แดงของนกกระทาได้โดยการเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีในร่างกาย (Losorczy, Szabo and Bardos, 1999; Camenisch *et al.*, 1999) จากการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว มีแนวโน้มของปริมาณ I gY เพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ PBS (รูปที่ 4-4) เช่นเดียวกับการทดลองของ Erhard *et al.* (1997) ซึ่งไม่พบความแตกต่างของปริมาณ IgY ในไข่แดงของไก่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้จะพบความแตกต่างของปริมาณ IgG ในซีรัมก็ตาม

การใช้ cholesterol-BSA ในการเปลี่ยนแปลงโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่

ระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลที่สูงขึ้น มีผลทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมลดต่ำลง เนื่องจากแอนติบอดีที่ร่างกายสัตว์สร้างขึ้นมีฤทธิ์หักล้างโคเลสเตอรอลที่อยู่ในร่างกายในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไลโปโปรตีน เมื่อระดับโคเลสเตอรอลในร่างกายลดต่ำลง ร่างกาย จำเป็นต้องสร้างโคเลสเตอรอลจากตับขึ้นมาทดแทนในส่วนที่สูญเสียไป (Siegel *et al.*, 1995) และนอกจากนี้ยังสูญเสียโคเลสเตอรอลในรูปของไข่แดง นกกระทาจึงต้องมีการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลขึ้นมาทดแทนในปริมาณสูงเพื่อทดแทนโคเลสเตอรอลที่สูญเสียทั้งสองทาง เพื่อรักษา homeostasis ไว้นั่นเอง ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมของกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA จะมีระดับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 19.23 % และ 23.34 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง (รูปที่ 4-6) จากนั้นระดับโคเลสเตอรอลจะเพิ่มขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง Bailey *et al.* (1964) พบว่า ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมของกระต่ายลดลง 33.53 % การทดลองของ Alving *et al.* (1996) พบว่า โคเลสเตอรอลในซีรัมกระต่ายลดลง 37.50 %, 27.50 % และ 43.48 % ในสัปดาห์ที่ 8, 10 และ 12 หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน Gero *et al.* (1959) พบว่าในไก่ไข่ลดลง 25.68 % แสดงว่าหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย cholesterol-BSA แล้ว ร่างกายมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันโดยแอนติบอดีที่นกกระทาสร้างขึ้น สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรัม โดยปฏิกิริยา antigen-antibody complex กับ VLDL, LDL และ IDL มากกว่า HDL ที่อยู่ในซีรัม (Dijstra *et al.*, 1996) หลังจากเกิดปฏิกิริยา antigen-antibody complex แล้ว ไปกระตุ้นให้คอมพลีเมนท์ (complement) สร้างตัวรับ (C3b recepter) แล้ว LDL จะถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดย macrophage (Alving and Wassef, 1999)

ปฏิกิริยา antigen-antibody complex มีผลทำให้ LDL ถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดย macrophage (Alving and Wassef, 1999) หรือไปมีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายไขมันระหว่างไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ ไปยัง follicular epithelium ของรังไข่ (Patterson *et al.*, 1962; Yen *et al.*, 1989) การทดลองในครั้งนี้ ระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงของกลุ่มที่ใช้ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS พบว่า ระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลง 0.91 % และ 58.65 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง จากนั้นระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง แสดงว่า การใช้ cholesterol-BSA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาได้ (รูปที่ 4-9) เช่นเดียวกับงานทดลองของ Shambharkar *et al.* (1996) สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาได้ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 จากนั้นระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ตลอดการทดลอง

การใช้ cholesterol-BSA ต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดง

ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่แดงคงที่ตลอดการทดลอง Jiang and Sim (1991) ไข่จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของไข่แดง แต่สัดส่วนของการเพิ่มปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าการเพิ่มน้ำหนักของไข่ ดังนั้น จึงพบน้ำหนักไข่อยู่ในระดับคง เพราะในไข่แดง นอกจากจะประกอบด้วยโคเลสเตอรอลและไขมันแล้ว ยังประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรท ไวตามิน และแร่ธาตุอีกด้วย (Gilbert and Pearson, 1971)

การใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีในซีรัมและในไข่

สารช่วยกระตุ้น (adjuvant) เป็นสารที่ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองได้ดีขึ้นและนานขึ้น มีหน้าที่ป้องกัน การสลายตัว (catabolism) อย่างรวดเร็วของแอนติเจนภายในตัวสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้น สารในกลุ่มนี้ได้แก่ อิมัลชั่นที่มีน้ำอยู่ในไขมัน (water-in-oil emulsion) หรือสารพวกอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (aluminium hydroxide precipitates) ซึ่งแอนติเจนหรืออิมมูโนเจน (immunogen) จะถูกดูดซับหรือถูกจับ (trapped) ระหว่างการตกตะกอน ส่วนไลโปโซม (liposome) เป็นอิมมูโนเจนที่อยู่บริเวณผิวนอกของชั้นไขมัน (lipid bilayer) หน้าที่อีกประการหนึ่งคือ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ได้ เช่น ลิมโฟไคน์ (lymphokines) และกระตุ้นการทำงานของ antigen

presenting cell's สารในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรียที่ทำให้หมดฤทธิ์โดยการฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed bacteria) ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides, LPS) ซาโปนิน (saponin) และ lipid A (Roitt *et al.*, 1991) ดังนั้น การใช้สารช่วยกระตุ้นร่วมกับแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดี สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีแบบไม่จำเพาะเจาะจงและมีการตอบสนองได้ดีและนานขึ้น

การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ซาโปนิน 2 ระดับ คือ 50 และ 100 ไมโครกรัม เป็นสารช่วยกระตุ้น (adjuvant) ในการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล โดยซาโปนินสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบ humoral immune response (Gebara *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าซาโปนินสามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokine ออกมามากขึ้น (Behboudi, Morein and Eriksson, 1996) Gomez *et al.* (1998) ใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีต่อวัคซีนโรคไข้สมองอักเสบ พบว่า มีระดับแอนติบอดีสูงสุดโดยคิดเป็น % relative เทียบกับกลุ่มที่ได้รับอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 256 % Santos *et al.* (1997) ใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีต่อวัคซีนป้องกันโรค leishmaniasis พบว่า ระดับแอนติบอดี ซึ่งได้จากผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เท่ากับ 1.7 จากการทดลอง ในกลุ่มที่ใช้ซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร สูงสุด เท่ากับ 1.80 $\pm$ 0.08 หรือมีค่า % relative เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เท่ากับ 258.83 $\pm$ 11.66 % และในกลุ่มที่ได้รับ ซาโปนินที่ระดับ 100 ไมโครกรัม มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 1.77 $\pm$ 0.60 หรือมีค่า % relative เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เท่ากับ 254.66 $\pm$ 26.93 % และสามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4-1) ดังนั้นการใช้ซาโปนินทั้ง 2 ระดับ เป็นสารช่วยกระตุ้น สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในนกกระทาได้อย่างมีประสิทธิภาพและสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาโดยสามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้ใกล้เคียงกัน

การใช้ซาโปนินร่วมกับ cholesterol-BSA ในการผลิตแอนติบอดี พบว่า ปริมาณ IgY ในกลุ่มที่ได้รับซาโปนินทั้ง 2 ระดับ โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับซาโปนิน 100 ไมโครกรัม มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียวและกลุ่มที่ได้รับ PBS โดยเห็นความแตกต่างในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง (รูปที่ 4-4) เนื่องจากซาโปนินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีในซีรัมมากขึ้น ดังนั้น จึงพบปริมาณ IgY ในปริมาณมากกว่าการกระตุ้นด้วยแอนติเจนอย่างเดียว ดังนั้น จากการทดลองครั้งนี้ ซาโปนิน ถือว่าเป็นสารช่วยกระตุ้นที่สามารถเหนี่ยวนำการผลิต IgY ได้ในระดับหนึ่ง IgY เป็นแอนติบอดีที่สามารถสกัดได้จากไข่ โดยสกัดได้ปริมาณ

มากและง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างจากการสกัดจากซีรัมโดยต้องเจาะเลือดจากสัตว์ ยุ่งยากในการจัดการและทำให้สัตว์เกิดความเครียด หากสามารถผลิต IgY ได้มาก อาจนำไปทำ passive immunization เพื่อศึกษาระดับแอนติบอดีใน ร่างกาย การสกัดแอนติบอดีจากไข่นี้ สามารถนำไปใช้กับการศึกษาการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนตัวอื่น ๆ ได้

อายุของสัตว์ทดลองมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สัตว์ที่อายุน้อยจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ T-cell dependent ได้ดีกว่าสัตว์ที่มีอายุมากแต่สัตว์อายุมากจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ T-cell independent ดีกว่าสัตว์ที่อายุน้อย (Munns and Lamont, 1991) เมื่อนกกระทามีอายุมากขึ้น ระดับแอนติบอดีจะสูงสุดที่อายุ 88 วัน (รูปที่ 4-2) ซึ่งสอดคล้องกับสัปดาห์ที่ทำการกระตุ้น โดยระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และจะลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 6 เนื่องจากเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ให้เข้าไปกับแอนติบอดีที่ยังหลงเหลืออยู่ในกระแสเลือด ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและตกตะกอนในที่สุด จากนั้น จะถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดย macrophage (Alving and Wassef, 1999) ดังนั้น จึงพบระดับของแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ปริมาณ IgY ในไข่ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น เนื่องจากมีการขนย้ายแอนติบอดีจากซีรัมเข้าสู่ไข่โดยผ่านทาง follicular epithelium (Patterson *et al*., 1962) โดยเพิ่มขึ้นสูงที่อายุ 102 วัน หรือที่สัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

การใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นในการเปลี่ยนแปลงโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่

กลุ่มที่ได้รับซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลลดลง 15.39 % และ 32.10 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS และกลุ่มที่ได้รับซาโปนินที่ระดับ 100 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลลดลง 11.53 % และ 21.44 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS จากการทดลอง จะเห็นว่าในกลุ่มที่ได้รับซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมได้มากที่สุด แต่หลังจากนั้นระดับโคเลสเตอรอลจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง ดังนั้น การใช้ซาโปนินร่วมกับ cholesterol-BSA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมลงได้

กลุ่มที่ใช้ซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 42.60 % และ 2.55 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง จากนั้น ระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง ในกลุ่มที่ใช้ซาโปนิน

ที่ระดับ 100 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 12.98 % และ 14.87 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง จากนั้นระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง (รูปที่ 4-9) นครินทร์ (2543) พบว่า การใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในไก่ไข่ สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลง 49.11 % และ 62.59 % ในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 ของการทดลอง แอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลที่นกกระทาสร้างขึ้นในกลุ่มที่ใช้ซาโปนินทั้ง 2 ระดับ สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่ลง

เมื่อนกกระทามีอายุมากขึ้น ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นมีฤทธิ์หักล้างโคเลสเตอรอลในซีรัม ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Micky *et al.* (1996) พบว่า ในไก่ไข่ที่อายุมากขึ้น จะมีปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่สูงกว่าไก่ที่อายุน้อย จากข้อมูลดังกล่าวเห็นว่า สัตว์ทดลองทุกชนิดจะมีเรื่องอายุเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อขบวนการต่าง ๆ ใน ร่างกาย รวมถึงการให้ผลผลิต ซึ่งเป็นไปตามธรรมชาติ ดังนั้น ในการวิเคราะห์ผลการทดลองต่าง ๆ ควรนำเรื่องของอายุมาเป็นปัจจัยที่สำคัญในการวิเคราะห์ เพื่อให้เห็นถึงแนวโน้มของข้อมูลว่าผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากขบวนการตามธรรมชาติหรือเกิดจากสิ่งที่เราได้กระทำ

การใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดง

กลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับซาโปนินมีเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่แดงคงที่ตลอดการทดลอง Hammad, Siegel and Marks (1996) รายงานว่า ถึงแม้จะพบระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่แดงของนกกระทาลดลง แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักไข่แดง Grimes *et al.* (1996) พบว่า ในไก่ไข่ที่ระดับของ LDL และ VLDL ลดลง แต่น้ำหนักไข่แดงมีระดับคงที่ตลอดการทดลอง ในการทดลองครั้งต่อไป ควรทำการศึกษาถึงองค์ประกอบของไขมันในไข่แดงทั้งปริมาณและขนาดของไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอย่างใกล้ชิด

การใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีในซีรัมและในไข่

จากการทดลองครั้งนี้ การเตรียมไลโปโซมเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากเทคนิคแบบ reverse-phase evaporation, REV (Roger et al., 1984) กล่าวคือ ผสมสฟิงโกไมอีลินซึ่งเป็นแหล่งของฟอสโฟลิปิดร่วมกับน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จะเกิดเป็นอีมัลชัน (emultion) จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปจะเกิดเป็นเจล หลังจากระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกหมดแล้วจะกลับสภาพจากเจลเป็นไลโปโซม โดยกรณีที่มีฟอสโฟลิปิดในปริมาณน้อยจะเกิดเป็นไลโปโซมที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (Unilamellar vesicle, ULV) แต่ในกรณีมีฟอสโฟลิปิดมากเกินพอจะเกิดเป็นไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (large multilamellar vesicle, LMV) (อรัญญา, 2539) จากการทดลอง ไลโปโซมที่เตรียมได้ มี 2 ประเภทคือ ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชั้น (LMV) และ ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นเพียงชั้นเดียว (large unilamellar vesicle, LUV) ไลโปโซมประเภท LMV มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 14.685 ไมโครเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางของผนังสองชั้นเท่ากับ 0.783 ไมโครเมตร (รูปที่ 4-14) ไลโปโซมประเภท LUV มีเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 4.895 ไมโครเมตร (รูปที่ 4-15) และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเท่ากับ 2.10 ถือว่าไลโปโซมที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพการกักเก็บสารได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Barbet, Machy and Leserman (1981) ได้ใช้ฟอสฟาทิดิลเอทาโนลามิน (phosphatidylethanolamine) เป็นแหล่งของฟอสโฟลิปิด สามาถกักเก็บ IgG ได้ตั้งแต่ 1-10 โมเลกุล Swartz *et al.* (1987) ได้เตรียมไลโปโซมจาก dimyristoyl phosphatidylcholine ([Myr2]PtdCho), dicetyl phosphate (Cet2-P) และใช้โคเลสเตอรอล 2 ระดับ คือที่ 71 mol % และ 41 mol % พบว่า มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่การใช้ โคเลสเตอรอล 71 mol % เท่านั้น Gregoriadis, Davis and Davies (1987) รายงานว่าไลโปโซม LMV ที่เตรียมจากเทคนิค dehydration-rehydration โดยเพิ่มจำนวนของสารที่มีประจุและฟอสโฟลิปิดให้มากขึ้น สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บจาก 93.5 % เป็น 96.1 % แต่ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่แตกต่างจากเดิม ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อไปควรจะมีการศึกษาถึงสัดส่วนและส่วนประกอบแต่ละชนิดที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีของไลโปโซม

ไลโปโซมจัดเป็นสารช่วยกระตุ้นที่มีส่วนที่เป็นอิมมูโนเจนที่บริเวณผิวนอกของชั้นไขมัน โดยมีลักษณะของการเรียงซ้อนกันของผนังสองชั้น (bilayer) หลายชั้น เมื่อมีการกักเก็บแอนติเจน ซึ่งอาจเป็นโปรตีนหรือสารชนิดอื่นไว้ในไลโปโซม พบว่า เมื่อนำไปกระตุ้นการผลิต

แอนติบอดีจะพบระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าระดับแอนติบอดีต่อ diphtheria toxoid และใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้น ซึ่งวัดโดยวิธี hemaglutination เท่ากับ 6.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีไลโปโซม มีระดับแอนติบอดี เท่ากับ 2.5 (Gregoriadis and Allison, 1994) การใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นในการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นได้มากขึ้นและรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ก่อนการกระตุ้น (Dijkstra *et al.*, 1996) โดยไลโปโซมสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบ humoral and cellular immunity ได้ดี (Alving and Swartz, 1991; Gregoriadis and Allison, 1994) การทดลองในครั้งนี้ ได้ใช้ไลโปโซม 2 ระดับ คือ 1,400 และ 2,800 ไมโครกรัม ในกลุ่มที่ได้รับไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 1.45 $\pm$ 0.40 หรือมี % relative เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เท่ากับ 207.92 $\pm$ 15.60 % และในกลุ่มที่ได้รับไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด เท่ากับ 1.45 $\pm$ 0.31 หรือมี % relative เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เท่ากับ 207.82 $\pm$ 16.62 % ซึ่งเป็นระดับที่สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับ PBS (รูปที่ 4-17) แสดงว่า ไลโปโซมสามารถใช้เป็นสารช่วยกระตุ้นที่ดีในการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในนกกระทา

ปริมาณ IgY ในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมมีปริมาณสูงขึ้นแต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA และ PBS (รูปที่ 4-20) ดังนั้น จากการทดลองครั้งนี้ซาโปนินถือว่าเป็นสารช่วยกระตุ้นที่สามารถเหนี่ยวนำการผลิต IgY ได้ในระดับหนึ่ง

เมื่อนกกระทามีอายุมากขึ้น ระดับแอนติบอดีจะสูงสุดที่อายุ 88 วัน (รูปที่ 4-18) ซึ่งสอดคล้องกับสัปดาห์ที่ทำการกระตุ้น โดยระดับแอนติบอดีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และจะลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 6 . ปริมาณ IgY มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น เนื่องจากมีการขนย้ายแอนติบอดีจากซีรัมเข้าสู่ไข่โดยผ่านทาง follicular epithelium (Patterson *et al.*, 1962) โดยเพิ่มขึ้นสูงที่อายุ 102 วัน หรือที่สัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง

นกกระทาที่มีน้ำหนักตัวช่วง 160-180 กรัม จะมีการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้ดีที่สุด หากอยู่ในช่วงที่มากหรือน้อยกว่านี้ จะมีการสร้างแอนติบอดีเพียงเล็กน้อย ในภาวะที่มีน้ำหนักมากหรือน้อยเกินไป $CD4^+$ และ $CD8^+$ จะมีปริมาณลดลง ส่งผลให้การสร้างแอนติบอดีไม่ดีเท่าที่ควร และน้ำหนักตัวที่มากเกินไปก่อให้เกิดความเครียดด้วย (Fink *et al.*, 1996) Linda and Jensen (1991)

การใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นในการเปลี่ยนแปลงโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่

กลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม เป็นสารช่วยกระตุ้น พบว่าปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมลดลง 24.62 % และ 22.17 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS และในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 2,800 ไมโครกรัม เป็นสารช่วยกระตุ้น พบว่าปริมาณโคเลสเตอรอลใน ซีรัมลดลง 9.54 % และ 26.15 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS (รูปที่ 4-22) โดยในกลุ่มที่ใช้ที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมลงได้มากที่สุดหลังจากนั้นระดับโคเลสเตอรอลจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง ดังนั้น การใช้ไลโปโซมร่วมกับ cholesterol-BSA สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมลงได้เช่นกันและมีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มที่ใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้น จากงานที่ผ่านมาส่วนใหญ่มักเป็นงานที่ศึกษาระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมของสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น หนู กระต่าย ไก่ แต่งานทดลองกระตุ้นแอนติบอดีเพื่อลดปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมของนกกระทามีน้อยมาก และพบว่า สามารถลดโคเลสเตอรอลในซีรัมของนกกระทาได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้น อาจทำการศึกษาโดยใช้แอนติเจนและสารช่วยกระตุ้นชุดเดียวกับการทดลองครั้งนี้ ทดลองในสัตว์อื่นเพื่อศึกษาถึงระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมที่มาจากผลของซาโปนินและไลโปโซมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไดรับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 18.98 % และ 11.75 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง ในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 2,800 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 39.69 % และ 4.96 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง จากนั้นระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง (รูปที่ 4-25) และเนื่องจาก ยังไม่พบรายงานการใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นในการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่ ดังนั้น จากการทดลองนี้ถือว่าแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลที่นกกระทาสร้างขึ้นในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมทั้ง 2 ระดับ สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่ลงได้ในระดับหนึ่งแต่ลดลงน้อยกว่ากลุ่มที่ใช้ซาโปนิน ดังนั้น ในการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงควรใช้ cholesterol-BSA ร่วมกับการใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นจึงจะสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

เมื่อนกกระทาที่มีน้ำหนักตัวมาก มีระดับแอนติบอดีต่ำ จึงส่งผลทำให้การกำจัดโคเลสเตอรอลออกจากซีรัมได้น้อยจึงพบปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมสูงกว่านกกระทาที่มี

น้ำหนักตัวน้อย ดังนั้น การใช้สัตว์ทดลองที่มีช่วงของน้ำหนักตัวอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการสร้างแอนติบอดี สามารถลดความแปรปรวนของผลการทดลองลงได้และสามารถผลิตแอนติบอดีได้ในระดับสูงและมีประสิทธิภาพ จากเหตุผลดังกล่าว จึงมีเรื่องการควบคุมน้ำหนักตัวเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อาจให้อาหารแบบจำกัด แต่การจำกัดอาหารที่ไม่ เหมาะสมอาจส่งผลให้สัตว์เกิดความเครียดและส่งผลเสียต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้

การใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดง

ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับไลโปโซม มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่แดงคงที่ตลอดการทดลอง Jiang and Sim, 1991 รายงานว่า ไข่จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของไข่แดง แต่สัดส่วนของการเพิ่มปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าการเพิ่มน้ำหนักของไข่ ดังนั้นจึงพบน้ำหนักไข่แดงอยู่ในระดับคงที่ เพราะในไข่แดง นอกจากจะประกอบด้วยโคเลสเตอรอลและไขมันแล้ว ยังประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรท ไวตามิน และแร่ธาตุอีกด้วย (Gilbert and Pearson, 1971) จากการทดลองพบว่า Hammad, Siegel and Marks (1996) รายงานว่า ถึงแม้จะพบระดับ โคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่แดงของนกกระทาลดลง แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักไข่แดง Grimes *et al.* (1996) พบว่า ในไก่ไข่ที่ระดับของ LDL และ VLDL ลดลง แต่น้ำหนักไข่แดงมีระดับคงที่ตลอดการทดลอง

เปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี subcutaneous injection และ oral administration

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารช่วยกระตุ้น 2 ชนิด คือ ซาโปนินและไลโปโซม พบว่าสารช่วยกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดก้อนเนื้อ (granuloma) และผีภายหลังการกระตุ้นไม่เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังและรุนแรงเหมือน Freund's adjuvants ซึ่งเป็นสารช่วยกระตุ้นที่นิยมใช้กับสัตว์ทดลอง ในงานทดลองในครั้งนี้ ได้ทดลองใช้ Freund's complete adjuvant (FCA) 2 ระดับคือ 50 และ 100 ไมโครลิตร เป็นสารช่วยกระตุ้นอีกตัวหนึ่ง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 1.06 ± 0.20 และ 1.64 ± 0.31 ตามลำดับ หรือมีค่า % relative เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เท่ากับ 151.99 ± 15.42 % และ 235.83 ± 15.86 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่ใกล้เคียงกับการใช้ ซาโปนินและไลโปโซม แสดงว่า สารช่วยกระตุ้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สามารถทดแทน FCA ได้อย่างสมบูรณ์

บริเวณที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (route injection) ขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติเจน ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์หรือส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ให้ร่วมกับแอนติเจน และระยะเวลาที่แอนติเจนถูกปลดปล่อยเข้าไปในกระแสเลือดหรือน้ำเหลือง บริเวณที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันมีหลายบริเวณ ได้แก่ ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, *S.C.*) ใช้สำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาค (particulate immunogen) มีสารช่วยกระตุ้นหรือไม่มีก็ได้ โดยแอนติเจนสามารถเข้าสู่ระบบน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่ฉีด แอนติเจนถูกดูดซับ (absorbed) อย่างช้า ๆ และการกระตุ้นซ้ำจะทำให้เกิด anaphylactic shock น้อยที่สุด ถ้าแอนติเจนและ Freund's complete adjuvant มีปริมาณมากไม่ควรฉีดเพียงแห่งเดียว จะทำให้เกิดก้อนเนื้อและเกิดฝีได้ง่าย (Halow and Lane, 1988) การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection, *i.m*) แอนติเจนจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ interstitial spaces อย่างช้า ๆ เมื่อใช้ร่วมกับ Complete Freund's adjuvant จะให้ผลดีที่สุด มีการสร้างแอนติบอดีอย่างรวดเร็ว หากไม่มีสารช่วยกระตุ้นจะทำให้แอนติเจนที่ละลายได้ (soluble antigen) ถูกเจือจางและหายไปในที่สุด การฉีดเข้าระหว่างชั้นผิวหนัง (intradermal injection, *i.d*) ใช้สำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาคและใช้ร่วมกับสารช่วยกระตุ้น ให้ผลคล้ายกับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าสู่กระแสเลือด (intravenous, *i.v*) เหมาะสำหรับแอนติเจนที่เป็นอนุภาคหรือ alum precipitated แอนติเจนจะเข้าสู่กระแสเลือดได้โดยตรง มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอย่างรวดเร็วและลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยกระตุ้น reticuloendothelial system ได้แก่ ตับ ปอด ม้าม อาจชักนำให้เกิด pulmonary embolism หรือ lethal anaphylactic shock การกระตุ้นโดยวิธีนี้ไม่ควรใช้กับ Freund's adjuvant หรือสารพิษ การฉีดเข้าข้อต่อ (intra-articular) เหมาะสำหรับแอนติเจนที่ละลายในน้ำเกลือ ถ้าใช้ water-in-oil emulsion จะไม่เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การกิน (oral administration) เหมาะสำหรับแอนติเจนบางชนิดที่ทนต่อภาวะความเป็นกรดและด่างในระบบทางเดินอาหารได้ดี และไม่ถูกย่อยสลายได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดพิษอย่างรุนแรงภายหลังจากการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด รวมถึงไม่ไปรบกวนการย่อยอาหารของร่างกายด้วย สารในกลุ่มนี้ เช่น สารไขมันต่าง ๆ ซาโปนินเป็นสารที่สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์ การฉีดเข้าใต้ผิวหนังสามารถกระตุ้นให้ ร่างกายมีการตอบสนองต่อแอนติเจนนานขึ้น โดยไม่เกิดการอักเสบอย่างรุนแรง ไม่เกิดเนื้องอกหรือฝีบริเวณที่ฉีด และซาโปนินยังสามารถให้โดยการกิน (oral administration) อีกด้วย โดยซาโปนินจะไปเพิ่มการซึมผ่านได้ (permeability) ของลำไส้ ทำให้สารหรือยาที่ให้ไปสามาถซึมผ่านเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดได้เร็วและดีขึ้น (Atkinson *et al.*, 1996) จากการทดลอง ซาโปนินที่ให้ร่วมกับ cholesterol-BSA โดยการกิน มีระดับแอนติบอดี

สูงกว่ากลุ่มที่ฉีด cholesterol-BSA และ PBS แต่มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับซาโปนินร่วมกับ cholesterol-BSA โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (รูปที่ 4-29) เนื่องจากตัวของซาโปนินเองไม่สามารถดูดซึมเข้าทางลำไส้ได้ และจะถูกขับออกมากับมูลในที่สุด (พันทิพา, 2538) ดังนั้นจึงมีเพียง cholesterol-BSA ส่วนที่เหลือจากการถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารเท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปในกระแสเลือดแล้วไปมีผลต่อการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล

โครงสร้างของไลโปโซมจะเป็นตัวป้องกันสารที่เก็บกักไว้ภายในจากการทำลายของน้ำย่อยต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร จึงมีการทดลองให้ไลโปโซมโดยการกิน (อรัญญา, 2539) จากการทดลอง ไลโปโซมที่ให้ร่วมกับ cholesterol-BSA โดยการกิน มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ฉีด cholesterol-BSA และ PBS และมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับไลโปโซมร่วมกับ cholesterol-BSA โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (รูปที่ 4-30) เนื่องจากไลโปโซมสามารถดูดซึมเข้าทางลำไส้และผ่านเข้าไปถึงกระแสเลือด ไลโปโซมจะทำปฏิกิริยาหรือจับกับโปรตีนหรือเซลล์ในเลือด หลังจากนั้นระบบทางเดินโลหิตจะขจัดไลโปโซมออกไป โดยอนุภาคของไลโปโซมส่วนใหญ่จะถูกจับโดยอวัยวะต่าง ๆ เช่น ม้าม ตับ ไขสันหลัง ต่อมน้ำเหลือง และเซลล์มะเร็ง โดยไลโปโซมจะมีการกระจายตัวหรือการสะสมน้อยมากในอวัยวะอื่น ๆ เช่น หัวใจ ไต และระบบทางเดินอาหาร (อรัญญา, 2539) และไลโปโซมจัดเป็นสารช่วยกระตุ้นที่มีส่วนของอิมมูโนเจนที่บริเวณผิวจึงสามารถกระตุ้นแอนติบอดีได้มากกว่าการฉีดเข้าใต้ผิวหนังซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เนื่องจากเราทราบถึงคุณสมบัติของซาโปนินที่ไม่สามารถดูดซึมเข้าทางลำไส้ได้แต่ไลโปโซมสามารถดูดซึมได้ ในการศึกษาครั้งต่อไป อาจนำซาโปนินและ cholesterol-BSA เข้าไปกักเก็บไว้ในไลโปโซม เพื่อให้ไลโปโซมเป็นตัวพาเข้าสู่กระแสเลือด แล้วป้อนให้กินและศึกษาถึงปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น

สรุปผลการทดลอง

ระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ phosphate buffer saline (PBS) ปริมาณ Immunoglobulin Y (IgY) ในไข่ มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมจะมีระดับลดลง19.23 % และ 23.34 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลง 0.91 % และ 58.65 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดงของกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียวมีระดับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ PBS นกกระทาจะมีระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลสูงที่อายุ 88 วัน เมื่อนกกระทามีอายุมากขึ้น ปริมาณ IgY จะเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมลดลง ปริมาณ โคเลสเตอรอลในไข่ทั้งฟองเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่แดงจะคงที่ทุกช่วงอายุ

ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับการใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้น 2 ระดับ คือ 50 และ 100 ไมโครกรัม มีระดับแอนติบอดีใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่ใช้ซาโปนินทั้ง 2 ระดับ มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว ปริมาณ IgY ในกลุ่มจะมีปริมาณสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับซาโปนิน 100 ไมโครกรัม จะมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมของกลุ่มที่ใช้ซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม จะมีระดับโคเลสเตอรอลลดลง 15.39 % และ 32.10 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS และกลุ่มที่ได้รับซาโปนินที่ระดับ 100 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลลดลง 11.53 % และ 21.44 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของกลุ่มที่ได้รับ ซาโปนินที่ระดับ 50 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลง เท่ากับ 42.60 % และ 2.55 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS ในกลุ่มที่ใช้ซาโปนินที่ระดับ 100 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลง เท่ากับ 12.98 % และ 14.87 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดงของกลุ่มที่ได้ซาโปนิน 2 ระดับ มีระดับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ PBS นกกระทาที่มีน้ำหนักตัวช่วง 160-170 กรัม เป็นช่วงที่มีระดับแอนติบอดีสูงสุดในกลุ่มที่ใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้นนกกระทาที่มีน้ำหนักตัวมากจะมีปริมาณ

โคเลสเตอรอลใน ซีรัมสูงกว่านกกระทาที่มีน้ำหนักตัวน้อย ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่ทั้งฟองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักตัวมากขึ้นโคเลสเตอรอลในไข่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักไข่เพิ่มขึ้น

การเตรียมไลโปโซม สามารถเตรียมได้ 2 ประเภท คือ ไลโปโซมประเภท LMV มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 14.685 ไมโครเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางของผนังสองชั้นเท่ากับ 0.783 ไมโครเมตร ไลโปโซมประเภท LUV มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 4.895 ไมโครเมตรและมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารเท่ากับ 2.10 ระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับการใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้น 2 ระดับ คือ 1,400 และ 2,800 ไมโครกรัม มีระดับใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมทั้ง 2 ระดับ มีระดับแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA เพียงอย่างเดียว ปริมาณ IgY ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับการใช้ไลโปโซมทั้ง 2 ระดับ จะมีปริมาณสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมของกลุ่มที่ได้รับ ไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม ปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมลดลง 24.62 % และ 22.17 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS และในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 2,800 ไมโครกรัม เป็นสารช่วยกระตุ้น พบว่าปริมาณโคเลสเตอรอลในซีรัมลดลง 9.54 % และ 26.15 % ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของกลุ่มที่ได้รับไลโปโซมที่ระดับ 1,400 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 18.98 % และ 11.75 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง ในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมที่ระดับ 2,800 ไมโครกรัม มีระดับโคเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ PBS เท่ากับ 39.69 % และ 4.96 % ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการทดลอง เปอร์เซ็นต์น้ำหนักไข่แดงของกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ไลโปโซม 2 ระดับ มีระดับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ PBS น้ำหนักตัวช่วง 170-180 เป็นช่วงที่มีระดับแอนติบอดีสูงสุดในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้น นกกระทาที่มีน้ำหนักตัวมากจะมีปริมาณโคเลสเตอรอลใน ซีรัมสูงกว่านกกระทาที่มีน้ำหนักตัวน้อย ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่ทั้งฟองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักตัวมากขึ้นโคเลสเตอรอลในไข่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักไข่เพิ่มขึ้น

ระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลโดยวิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) หรือ การป้อนให้กิน (oral administration) ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับซาโปนินที่ระดับ 100 ไมโครกรัม พบว่า ระดับแอนติบอดีในกลุ่มที่กระตุ้นโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง มีระดับสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นโดยการป้อนให้กิน ในกลุ่มที่ได้รับ cholesterol-BSA ร่วมกับไลโปโซมที่ระดับ 2,800 ไมโครกรัม พบว่า ระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในกลุ่มที่กระตุ้นโดยการป้อนให้กินมีระดับสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

สรุป จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า การใช้ cholesterol-BSA ทำให้มีการผลิตแอนติบอดีในซีรัมสูงขึ้น ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่ลดลง เมื่อใช้ซาโปนินเป็นสารช่วยกระตุ้น ทำให้การผลิตแอนติบอดีในซีรัมและในไข่สูงกว่ากลุ่ม cholesterol-BSA ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่ลดลง เมื่อใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นทำให้การผลิตแอนติบอดีในซีรัมและในไข่สูงกว่ากลุ่ม cholesterol-BSA ระดับโคเลสเตอรอลในซีรัมและในไข่ลดลง การผลิตแอนติบอดีในกลุ่มที่ใช้ซาโปนินโดยวิธีฉีดเข้าใต้ผิวหนังมีการผลิตแอนติบอดีสูงกว่าการกิน แต่การผลิตแอนติบอดีในกลุ่มที่ใช้ไลโปโซมโดยการกินมีการผลิตแอนติบอดีสูงกว่าการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

ข้อเสนอแนะ

1. การกระตุ้นแอนติบอดี ควรกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ห่างกัน 2 สัปดาห์ จากนั้นอีก 4 สัปดาห์ จึงกระตุ้นซ้ำอีกครั้งก็เพียงพอสำหรับการตอบสนองต่อแอนติเจน เนื่องจากการกระตุ้นครั้งที่ 2 จะทำให้มีการผลิตแอนติบอดีสูงและอยู่ได้นานกว่าการกระตุ้นครั้งแรก แต่หากมีการให้แอนติเจนชนิดเดียวกันในขณะที่ยังมีแอนติบอดีเหลืออยู่ในกระแสเลือดจะเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ให้เข้าไปกับแอนติบอดี ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและตกตะกอน จากนั้น ถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดย macrophage จึงพบระดับของแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลลดลง ดังนั้นควรรอให้ระดับแอนติบอดีลดลงเสียก่อนซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์ แล้วจึงทำการกระตุ้นซ้ำเพื่อให้ได้ระดับแอนติบอดีในระดับสูง

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอล ควรจะใช้วิธีเอนไซม์ (enzymatic method) ซึ่งมีความเที่ยงตรง (precision) สามารถวัดความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้มากกว่าวิธีการวัดสีและมีราคาไม่แพงมากเมื่อเทียบกับการวัดโครมาโตกราฟฟีแบบแก๊ส (gas chromatography, GC) และโครมาโตกราฟฟีแบบของเหลวความดันสูง (high pressure chromatography, HPLC)

3. หาปริมาณสารประกอบไลโปโปรตีนเชิงซ้อน HDL, LDL, VLDL และ IDL ทั้งในกระแสเลือด และไข่แดง เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำการวัดอนุพันธ์ของไลโปโปรตีน

4. ศึกษาถึงตำแหน่งการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลพาหะกับโคเลสเตอรอลในตำแหน่งอื่นของ cyclopentanoperhydrophenanthrene ring ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากการเชื่อมโมเลกุลขนาดเล็กกับโมเลกุลพาหะในตำแหน่งที่ต่างกัน มีผลต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกันด้วย

5. ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของซาโปนินที่มีผลต่อการผลิตแอนติบอดี เนื่องจากโครงสร้างในส่วนของโมเลกุลน้ำตาลเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของลิมโฟซัยท์ การใช้ซาโปนินที่มีแหล่งของโมเลกุลน้ำตาลต่างกันมีผลต่อการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกัน

6. ศึกษาส่วนประกอบของไลโปโซม และสัดส่วนของฟอสโฟลิปิด โคเลสเตอรอล สารมีประจุ ที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดี

7. การนำซาโปนินและ cholesterol-BSA มารวมกันไว้ในไลโปโซม เพื่อนำไปกระตุ้นแอนติบอดี เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาไม่ได้มีการนำซาโปนินเข้าไปกักเก็บในไลโปโซม

8. ศึกษาการนำ IgY ไปทำ passive immunization เพื่อศึกษาระดับแอนติบอดีในร่างกาย และการสกัดแอนติบอดีจากไข่นี้ สามารถนำไปใช้กับการศึกษาการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนตัวอื่น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University