# บทที่ 5
## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการผลิตเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีขั้นตอนโดยใช้แอนติเจน Progesterone-3-(O-Carboxymethyl) - Oxime bovine serum albumin ($P_4$-3CMO-BSA) เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมน และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 314.15 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กมากเรียกว่า แฮปเทน (hapten) ไม่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูนโนเจนที่ดีและไม่สามารถกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนตามต้องการได้ เพราะโดยทั่วไปแอนติเจนที่ดีที่กระตุ้นการตอบสนองที่มีประสิทธิภาพสูงควรมีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป แต่เมื่อใช้กระบวนการทางเคมีเชื่อมแฮปเทนกับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า โปรตีนพาหะ (carrier protein) ก็สามารถประกอบเป็น hapten – carrier conjugate ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอิมมูนโนเจนได้ จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ Progesterone-3CMO-BSA ที่ผลิตขึ้นแต่ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c ให้ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่มีไตเตอร์ในระดับสูงได้ และพบว่าหลังจากที่ฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 แล้วนั้น สัตว์ทดลองไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนอีก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและ BSA ที่เชื่อมติดกันน้อยมาก คือ มีอัตราส่วนเพียงเป็น 4 : 1 จึงเปลี่ยนไปใช้ Progesterone-3CMO-BSA ทางการค้า พบว่ามีอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและ BSA ที่เชื่อมติดกันมากถึง 38 : 1 จึงทำให้สามารถกระตุ้นหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c ได้เป็นอย่างดี นอกจากแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพที่ดีแล้ว ยังต้องอาศัยแอดจูแวนท์ (adjuvant) ซึ่งเป็นสารผสมแอนติเจนเพื่อเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมักใช้ผสมกับแอนติเจนที่มีการเป็นอิมมูนโนเจนต่ำหรือปริมาณน้อย เช่น การสร้างแอนติบอดีต่อ BSA ในหนูขาวจะเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า ถ้าฉีด BSA ร่วมกับแอดจูแวนท์ ซึ่งบทบาทของแอดจูแวนท์ในการเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่โดยทั่วไปทำให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้นและเพิ่มจำนวนลิมโฟไซต์แบบไม่จำเพาะ

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าหลังจากที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูด้วย Progesterone-3CMO-BSA ร่วมกับ Freund ' s complete adjuvant ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และกระตุ้นครั้งต่อไปใช้ Freund ' s

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

incomplete adjuvant โดยฉีดกระตุ้นหนูจำนวนทั้งหมด 3 ตัว คือหนูเบอร์ 1, 2 และ 3 หนูที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนได้ดีที่สุดคือหนูเบอร์ 1 หลังจากที่ตรวจพบว่าหนูเบอร์ดังกล่าวมีไตเตอร์ของแอนติบอดีมากที่สุด จึงนำไปสู่ขั้นตอนการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมาต่อไป

จากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมา พบว่า จากทั้งหมด 576 หลุม เกิดกลุ่มโคลนไฮบริโดมาจำนวนทั้งหมด 40 หลุม หรือ 168 โคลน คิดเป็น 6.9% เมื่อนำกลุ่มโคลนที่ได้ทั้ง 40 หลุม ตรวจหาการผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Indirect ELISA ผลได้คือมีกลุ่มโคลนที่สามารถให้ผลเป็นบวกเท่ากับ 37 หลุม หรือ 72 โคลน คิดเป็น 92.5% จากกลุ่มโคลนทั้งหมด และได้เลือกกลุ่มโคลนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรสูงที่สุด ได้แก่ 3C10, 4B2 และ 5H9 จากนั้นจึงนำไปสู่การแยกเป็นโคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ต่อไป และพบว่าทั้ง 3 โคลนสามารถให้ผลบวกได้ทั้งหมด แต่ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ลูกผสมหมายเลข 4B2 เนื่องจากเซลล์มีคุณภาพดี จึงได้ทำการขยายและเลี้ยงเซลล์เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ต่อไป จากการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อตรวจสอบก่อนนำไปใช้พบว่าโคลนหมายเลข 4B2 สามารถผลิตแอนติบอดีชนิดอิมมูนโนโกลบูลิน จี (IgG) ได้ 0.138 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งนับว่ามีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้เป็นแอนติบอดีที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ ใน *in vitro* culture ที่มี 10 % fetal calf serum และเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไม่ใช่แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดเซลล์ลูกผสมเข้าในช่องท้องหนูแล้วสกัดแอนติบอดีจากของเหลวในช่องท้องหนู (ascetic fluid) วิธีนี้เป็นการผลิตแอนติบอดีในร่างกายสัตว์ (*in vivo* culture) จะได้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่า Dekker (1987) ได้สรุปว่าโดยเฉลี่ยจะได้ปริมาณแอนติบอดีประมาณ 6.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือมีน้ำเลี้ยงเซลล์ในช่องท้องหนูประมาณ 4.8 มิลลิลิตร แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะทำการฉีดเข้าสู่ช่องท้องของหนูด้วย

นอกจากสาเหตุเนื่องจากแหล่งที่มาของแอนติบอดีแล้ว ยังพบว่าปริมาณแอนติบอดีที่ได้ยังขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยจากเดิมที่ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน จี ที่เตรียมเจลเอง สามารถให้แอนติบอดีได้น้อย และเมื่อคอลัมน์ได้ผ่านการใช้งานหลายครั้ง ทำให้แอนติบอดีที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ จึงได้เปลี่ยนไปใช้คอลัมน์โปรตีน จี จากอีกบริษัทหนึ่ง ซึ่งเป็นคอลัมน์สำเร็จรูปที่สามารถใช้ได้ทันที พบว่าให้แอนติบอดีในปริมาณมาก และไม่จำเป็นต้องตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งโดยปกติจะเป็นขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก และอาจทำให้แอนติบอดีเสียสภาพ แต่จากการใช้จากคอลัมน์สำเร็จรูปสามารถนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาผ่าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอลัมน์ได้ทันที แต่มีข้อระวังในการใช้ คือ หลังจากที่ใช้งานเรียบร้อยแล้ว จะต้องล้างคอลัมน์ด้วย 20 % เอทานอล และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันเชื้อรา และจากกระบวนการผลิตทั้งหมดทำให้ได้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสำหรับใช้งานต่อไป

การพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยการศึกษาของ Monro and Stabenfeldt (1984) โดยได้พัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้วิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมกระต่าย ต่อมามีการพัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้วิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม และน้ำนมโค (Mercus and Hacket, 1986) Stanley *et al.* (1986) ได้ตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโคเพื่อประเมินประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ด้วยวิธี An amplified enzyme-linked immunoassay (AELIA) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถให้ผลภายในเวลา 35 นาที ซึ่งมีความรวดเร็วในการตรวจอย่างมากและวินิจฉัยการตั้งท้องในโคนมหลังจากที่ทำการผสมไปแล้ว 24 วัน

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ competitive ELISA ซึ่งเป็นวิธีการวัดปริมาณแอนติเจนคล้ายกับ RIA โดยวิธีเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ผสมกับตัวอย่างแอนติเจนมาตรฐานหรือตัวอย่างที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมลงในถาดหลุม 96 หลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งถ้าในตัวอย่างมีปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอยู่มาก ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำที่จะจับกับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ก้นหลุมจึงมีมากเช่นเดียวกันแต่โปรเจสเตอโรนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีก้นหลุมน้อย ดังนั้นผลที่ได้จะแปรผันกัน เช่น ถ้าตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอยู่มากจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ (สีจางลง) กว่าหลุมที่มีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนความเข้มข้นต่ำ ซึ่งหลักการดังกล่าวนี้เอง จึงนำไปสู่การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยอัตราเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เพื่อใช้ในการเคลือบเพลท คือ 1 : 150 และอัตราเจือจางของ Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1:150,000 พบว่าที่ 50 % binding หรือ sensitivity เท่ากับ 10 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร จากการหา Inter coefficient assay คือนำตัวอย่างเดียวกันมาทำการวิเคราะห์ภายในเพลทเดียวกันพบว่ามีค่าสูง, กลาง และต่ำเท่ากับ 8.23, 9.64 และ 10.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับ Intra coefficient assay ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันแต่ทำคนละเพลท พบว่ามีค่าสูง, กลาง และต่ำเท่ากับ 11.05, 11.89 และ 10.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อดีของการหาค่า Inter และ Intra coefficient assay คือเป็นดัชนีในการวัดความแม่นยำในการทำงานทางด้าน ELISA ซึ่งค่า Intra coefficient assay จะช่วยประเมินความแม่นยำในการวัดของตัวอย่างเดียวกันในเพลทเดี่ยวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน ซึ่งค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ ถ้าหากค่าที่วัดได้ไม่เกินข้อกำหนดดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการวัดมีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่ง เช่นเดียวกันกับค่า Inter coefficient assay จะใช้ประเมินเช่นกัน โดยที่ค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาปัจจัยเนื่องจากฤดูกาลต่อวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด (Day to first ovarian activity postpartum) พบว่าเมื่อรวมกลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนโดยไม่คำนึงถึงสายพันธุ์จะพบว่าโคมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอดยาวนานกว่ากลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูหนาวซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฤดูร้อนมีผลต่อการทำงานของรังไข่ต่อทั้งสองสายพันธุ์แต่ทั้งนี้ย่อมแล้วแต่ความสามารถในการปรับสภาพร่างกายของโคนมแต่ละสายพันธุ์ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่าโคนมลูกผสมจะมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้ แต่มีแนวโน้มว่าโคนมลูกผสมจะมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอดสั้นกว่าโคนมพันธุ์แท้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pongpiachan *et al.* (2000) ถึงประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ระหว่างโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเซียนและโคนมลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง-โฮสไตน์ฟรีเซียนภายใต้อากาศร้อน พบว่าโคนมพันธุ์แท้โฮสไตน์ฟรีเซียน จะมีประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ต่ำกว่ากลุ่มโคนมลูกผสม เช่น โคนมพันธุ์แท้จะใช้เวลาในจากหลังคลอดจนถึงวันที่ผสมเทียมครั้งแรกยาวนานกว่าเนื่องจากมีการทำงานของรังไข่หลังคลอดยาวนานกว่า แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ของโคนมมีส่วนเกี่ยวข้องกันระหว่างความสามารถปรับร่างกายให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่า โคนมลูกผสมมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด ไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้ แต่ทั้งนี้การที่ไม่สามารถพบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนเนื่องจำนวนของหน่วยทดลองมีน้อย นอกจากนี้ Padilla *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของความเครียดที่เกิดจากความร้อนในโคนมจะส่งผลต่อวิตามินอีในพลาสมาให้ลดต่ำลง ซึ่งวิตามินอีมีส่วนสำคัญต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ให้เป็นไปอย่างปกติ นอกจากนี้ยังได้ทดลองนำวิตามินซีเพื่อช่วยลดภาวะเครียดจากความร้อน พบว่าสามารถทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการกิน แต่ยังต้องมีการศึกษาถึงผลของวิตามินซีที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์และการให้ผลผลิตของโคนมต่อไป

จากการศึกษาปัจจัยระหว่างฤดูกาลที่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เมื่อรวมกลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนโดยไม่คำนึงถึงสายพันธุ์จะพบว่าโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนจะมีปริมาณโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดน้อยกว่าโคนมที่คลอดลูกในฤดูหนาวซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับ Jennifer *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าความเครียดเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นในฤดูร้อนนั้นมีผลทำให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระแสเลือดลดลง และจากการศึกษาของ Hansen and Arechiga (1999) พบว่าฤดูร้อนมีผลทำให้คุณภาพของ oocyte ลดลง และการเกิด corpus luteum หลังการตกไข่มีความผิดปกติ ส่งผลให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่า โคนมลูกผสมมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด ไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด ไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาผลของฤดูกาลที่มีต่อคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด (Progesterone profile) เมื่อรวมกลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนโดยไม่คำนึงถึงสายพันธุ์พบว่ากลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนจะมีคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดน้อยกว่ากลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูหนาวโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่า โคนมลูกผสมมีคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด ไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสม มีคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด ไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้สายเลือดเช่นเดียวกัน เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสร้างจาก corpus luteum จึงมีผู้ศึกษาถึงฤดูกาลที่มีผลต่อการทำงานของ corpus luteum โดย Lopez-Gatius *et al.* (2006) พบว่าความเครียดจากความร้อนก่อให้เกิดฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่ยับยั้งการทำงานของ Gonadotrophin releasing hormone ดังนั้นจึงมีการเสริมฮอร์โมนดังกล่าวในระหว่างฤดูร้อนเพื่อให้การทำงานของ corpus luteum และการหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนให้เป็นไปอย่างปกติ นอกจากนี้การศึกษาของ De la sota et al. (1998) ยังพบว่าภาวะเครียดจากความร้อนจะมีผลให้โคที่กำลังให้ผลผลิตน้ำนมมีระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลในระยะโปรอีสตรัส (proestrous) และจะตรวจการเป็นสัดได้น้อย

จากการศึกษาปัจจัยแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เมื่อรวมกลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนโดยไม่คำนึงถึงสายพันธุ์ พบว่าโคนมที่คลอดลูกในฤดูร้อนจะมีแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดที่สูงกว่ากลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูหนาวโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Howell *et al.* (1993) ที่พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะลดต่ำลงในช่วงที่โคนมมีความเครียดอันเกิดจากความร้อนจากฤดูร้อนเปรียบเทียบกับฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งสัมพันธ์กับขนาด corpus luteum ที่ลดลง ส่งผลให้แอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะต่ำเช่นเดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่าโคนมลูกผสมมีแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คลอดไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาปัจจัยเนื่องจากฤดูกาลที่มีผลต่อจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดโดยไม่คำนึงถึงสายพันธุ์ พบว่าโคนมในฤดูร้อนจะมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดมากกว่ากลุ่มโคนมที่คลอดลูกในฤดูหนาวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Arechiga *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าฤดูร้อนก่อให้เกิดภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน ทำให้โคนมที่อยู่ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา มีอัตราการผสมติดลดลงจากเดิมถึง 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ และยังมีผลต่อการตายของตัวอ่อนในระยะแรก อีกทั้งพฤติกรรมการเป็นสัดไม่ชัดเจน โดยมีความเห็นสอดคล้องเช่นเดียวกันกับ Armstrong (1994) และ Garcia-Ispierto et al. (2006) ได้ศึกษาผลเนื่องจากฤดูกาลที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้อง พบว่าโคนมที่ได้รับการผสมเทียมและหลังจากที่ผสมติดแล้วจะมีโอกาสเกิดการตายของตัวอ่อนระยะแรกในอัตราที่สูง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีความร้อนส่งผลให้ร่างกายของแม่โคมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น จึงมีผลกระทบต่อการฝังตัวของตัวอ่อนบริเวณมดลูกมากขึ้น นอกจากนั้น Jordan (2003) ยังพบว่าอัตราการผสมติดในฤดูร้อนจะลดลงจาก 61 เป็น 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิที่วัดได้จาก rectal เพิ่มขึ้นทุก ๆ 1 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของ Avendano *et al.* (2006) พบว่าโคนมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเซียนที่เลี้ยงภายใต้อากาศที่เย็นมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดน้อยกว่าหรือใช้เวลาสั้นกว่าโคนมที่เลี้ยงภายใต้อากาศที่ร้อน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อนพบว่าโคนมลูกผสมมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ และเมื่อมีการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาปริมาณผลผลิตน้ำนมที่มีต่อปริมาณโปรเจสเตอโรนพบว่าโคนมที่ให้ปริมาณผลผลิตน้ำนมสูงจะมีผลต่อปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งหมด 100 วันหลังคลอดน้อยกว่าโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ และจากการศึกษาถึงการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดพบว่าโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงจะมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกยาวนานกว่าโคนมที่ให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากโคนมที่ให้ผลผลิตสูงจะมีพลังงานในร่างกายไม่สมดุลจึงทำให้มีผลต่อการทำงานของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ โดย Sangsritavong *et al.* (2002) ได้ศึกษาถึงเมตาบอลิซึมของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากการไหลเวียนฮอร์โมนเข้าสู่ตับ โดยพบว่าโคนมที่ให้ที่ให้ผลผลิตสูงนั้นจะกินอาหารใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณที่มากเพื่อให้มีความสมดุลในการดำรงชีพพร้อมกับการสร้างน้ำนม ดังนั้นปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ไหลเวียนเข้าสู่ตับ ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดและน้ำนมมีน้อย จึงมีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์จะลดต่ำลงสอดคล้องกับ Lindberg *et al.* (1999) และ Comin *et al.* (2005) อีกทั้งโคนมที่ให้ผลผลิตสูงยังโอกาสสูญเสียตัวอ่อนในระยะแรก เนื่องจากโปรเจสเตอโรนที่มีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาของผนังมดลูกสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน (Santos *et al.*, 2001)

เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีความสำคัญต่อความสมบูรณ์พันธุ์ การฝังตัวและการมีชีวิตรอดของตัวอ่อน การพัฒนาฟอลลิเคิล การตกไข่ และวงรอบการเป็นสัด ในการไหลเวียนเลือดเพื่อกำจัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตับ จึงมีความเกี่ยวข้องกับระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด Rabiee *et al.* (2001) พบว่าประมาณ 95 % ของโปรเจสเตอโรนทั้งหมดจะถูกสันดาปในตับ และถูกขับออกทางอุจจาระ ระดับของโปรเจสเตอโรนจะสัมพันธ์กับปริมาณการกินได้และการไหลเวียนของกระแสเลือดเข้าสู่ตับ ซึ่งสอดคล้องกับ Huntington (1990) และ Butler (2000) ที่กล่าวว่าโคนมที่ปริมาณผลผลิตน้ำนมสูงในช่วงแรกของการให้นมจะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมที่สูงกว่าโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำจึงส่งผลให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดลดลงตามไปด้วย Tapki and Ahmet (2006) ได้ศึกษาโคนมพันธุ์แท้ฟรีเชียนที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ให้ผลผลิตสูงภายใต้อิทธิพลความเครียดที่เกิดจากความร้อน พบว่าผลผลิตน้ำนมที่ได้มีแนวโน้มลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูหนาว และมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมอย่างรุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับโคนมที่ให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากร่างกายมีการปรับตัวเพื่อลดความร้อนภายในร่างกายโดยลดอัตราการกินอาหาร แต่เพิ่มอัตราการกินน้ำ ทำให้ไม่สามารถผลิตน้ำนมได้มากเท่าที่ควร และยังส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ ด้วยเช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน จากไฮบริโดมาโคลนเบอร์ 4B2 และหลังจากที่ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์สามารถให้ความเข้มข้น 0.138 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีสำหรับทำกราฟมาตรฐาน เท่ากับ 1 : 150 และอัตราเจือจางของ Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 1:150,000 เมื่อนำแอนติบอดีสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความไว (sensitivity) ที่ 50 % binding เท่ากับ 10 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร เพราะฉะนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธี competitive ELISA

จากการศึกษาปัจจัยเนื่องจากฤดูกาลต่อวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่า โคนมลูกผสมมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด ไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้ แต่มีแนวโน้มว่าโคนมลูกผสมจะมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอดสั้นกว่าโคนมพันธุ์แท้และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่า โคนมลูกผสมมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด ไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้

จากการศึกษาปัจจัยระหว่างฤดูกาลที่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่า โคนมลูกผสม มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด ไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ แต่มีแนวโน้มว่าโคนมลูกผสมจะมีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่าโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสม มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้

จากการศึกษาปัจจัยจากเนื่องจากฤดูกาลที่มีต่อคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด (Progesterone profile) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่าโคนมลูกผสมมีคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีคลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาปัจจัยเนื่องจากฤดูกาลต่อแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อน พบว่าโคนมลูกผสม มี แอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาปัจจัยเนื่องจากฤดูกาลที่มีผลต่อจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูร้อนพบว่าโคนมลูกผสมมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดไม่แตกต่างกันกับโคนมพันธุ์แท้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คลอดลูกในฤดูหนาว พบว่าโคนมลูกผสมมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดไม่แตกต่างจากโคนมพันธุ์แท้เช่นเดียวกัน แต่ถ้าไม่คำนึงถึงสายพันธุ์พบว่าโคนมที่เลี้ยงในฤดูร้อนจะมีจำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติดมากกว่าโคนมที่เลี้ยงในฤดูหนาว

จากการศึกษาปริมาณผลผลิตน้ำนมที่มีต่อปริมาณโปรเจสเตอโรนสามารถสรุปได้ว่าโคนมที่ให้ปริมาณผลผลิตน้ำนมสูงจะมีผลต่อปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งหมด 100 วันหลังคลอดน้อยกว่าโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ และจากการศึกษาถึงการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดพบว่าโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงจะมีวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกยาวนานกว่าโคนมที่ให้ผลผลิตต่ำ

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นเครื่องมือพัฒนาไปสู่วิธี Competitive ELISA เพื่อวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, การทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอด, คลื่นและแอมพริจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ทำให้ทราบสถานะของโคนมแต่ละตัว แต่ละสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี และเรียนรู้ได้ถึงอิทธิพลของฤดูกาลที่มีต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมและทราบถึงแนวทางในการเลี้ยงโคนมแต่ละสายพันธุ์ให้มีความเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศทางภาคเหนือด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังทราบถึงปริมาณการผลิตน้ำนมของโคนมแต่ละตัวว่ามีอิทธิพลต่อปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและการทำงานของรังไข่หลังคลอดอย่างไร เพื่อสรุปและหาแนวทางในการปรับปรุงหรือดูแลโคนมแต่ละตัวได้อย่างถูกต้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## ข้อเสนอแนะ

ในการฉีดกระตุ้นหนูทดลองเพื่อให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันหรือสร้างแอนติบอดีครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าคุณสมบัติของแอนติเจนที่ดีควรมีขนาดโมเลกุลใหญ่ หรือถ้ามีแอนติเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากควร conjugate กับโปรตีน เพื่อให้มีคุณสมบัติการเป็นอิมมูนโนเจนที่ดี หรือถ้าหนูทดลองไม่สามารถตอบสนองต่อแอนติเจนได้ ควรตรวจสอบถึงปริมาณของสารที่ฉีดกระตุ้นว่าควรเพิ่มปริมาณหรือไม่

การที่จะทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมี activity ที่สูง ควรเริ่มตั้งแต่การตรวจสอบแอนติบอดีที่หนูทดลองสร้างขึ้น ด้วยวิธี Indirect ELISA ซึ่งควรจะเป็นไตเตอร์ที่สูงมาก ก่อนที่จะนำม้ามของหนูมาทำการเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมา และหลังจากได้ไฮบริโดมาโคลนที่สร้างแอนติบอดีที่เป็นบวกไปแล้วนั้นจะต้อง limiting dilution เซลล์ไม่น้อยกว่า 2 ครั้ง เพื่อป้องกันการเกิดไฮบริโดมาโคลนที่ไม่ผลิตแอนติบอดี และเจริญเติบโตแทนที่ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการ นอกจากนี้หลังจากเก็บเกี่ยวน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่ต้องการแล้ว ในการใช้คอลัมน์สำหรับการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้อิมมูนโนโกลบูลินมากที่สุดควรเปลี่ยนคอลัมน์บ่อยครั้งเท่าที่จะทำได้ และศึกษาคุณสมบัติของคอลัมน์โปรตีน จี เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานให้มากที่สุด

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการทำ ELISA ควรเป็นการเตรียมแบบเดียวกันตลอดการทดลอง เช่น ถ้าใช้น้ำนมที่มีไขมันปนก็ควรที่จะเป็นแบบเดียวกันทั้งหมด หรือถ้าแยกไขมันออกก่อนการวิเคราะห์ก็ควรเป็นแบบเดียวกันทั้งหมดเช่นกัน เนื่องจากไขมันมีผลต่อการวิเคราะห์

จากการศึกษาพบว่าสภาพภูมิอากาศ หรือฤดูกาล มีผลต่อโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ ดังนั้นจึงควรนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ไปใช้ร่วมกับการจัดการฟาร์มเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น หรือนำไปปรับปรุงสมรรถภาพการผลิตของฝูงโคนมต่อไป โดยเฉพาะโคนมพันธุ์แท้ที่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทยได้น้อย

ควรเพิ่มจำนวนประชากรโคนมในการศึกษาให้มากขึ้น ซึ่งอาจพบความแตกต่างระหว่างปัจจัยต่าง ๆ มากยิ่งขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าควรมีการศึกษาถึงปัจจัยเนื่องจากปริมาณน้ำนมให้มากกว่า 100 วัน เพื่อติดตามผลของอัตราการผสมติด และจำนวนครั้งของการผสม สำหรับประเมินอิทธิพลของปริมาณการผลิตน้ำนมได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น และอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณการกินได้ของโคนมแต่ละตัวร่วมด้วย เพื่อประเมินร่วมกับปริมาณน้ำนมที่ผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้จากข้อมูลที่ได้ทำการวิจัยพบว่า โคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงมักจะมีปัญหาของระบบสืบพันธุ์มากกว่าโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมต่ำ ดังนั้น ควรมีการศึกษาต่อไปว่า การให้ปริมาณน้ำนมในระดับใดที่จัดว่าอยู่ในระดับปานกลางและไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ เพราะโดยทั่วไปแล้วเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมย่อมต้องการทั้งผลผลิตน้ำนมและระบบสืบพันธุ์ที่ดีควบคู่กันไป นอกจากจะวิเคราะห์ฮอร์โปรเจสเตอโรนแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออล ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีสตราไดออล เพื่อยืนยันการทำงานของรังไข่จากโคนมหลังคลอดได้เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved