บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 วงรอบการเป็นสัดของโคนม (estrus cycle)

ในโคนมเพศเมียที่ไม่มีการตั้งท้องการตกไข่จะเกิดขึ้นทุกๆ 21 วัน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่สั้นมาก โคนมแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด โดยโคตัวเมียยอมรับการผสมพันธุ์จากโคตัวผู้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างการตกไข่กับพฤติกรรมการเป็นสัด ถ้าโคนมแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดออกมาแล้วได้รับการผสมพันธุ์ในระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำให้อัตราการผสมติดสูง (conception rate)

รอบการเป็นสัดในโคนมตัวเมียแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะได้แก่

1) ระยะเอสตรัส (estrus) (วันที่ 0) เป็นระยะที่โคตัวเมียแสดงอาการเป็นสัด โดยจะยอมให้ตัวผู้ผสมพันธุ์ได้
2) ระยะเมทเอสตรัส (metestrus) (วันที่ 1-4) เป็นระยะที่เกิดขึ้นต่อจากระยะเอสตรัส ระยะนี้มีการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล (follicle) เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะเกิดการตกไข่ (ovum) แล้วจึงเกิดคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ส่วนที่มดลูกจะมีการเจริญของต่อมต่างๆ (glandular epithelium) และเส้นเลือดในชั้นเนื้อเยื่อบุ (endothelium) อย่างเห็นได้ชัดเพื่อเตรียมตัวรับการฝังตัวของตัวอ่อน
3) ระยะไดเอสตรัส (diestrus) (วันที่ 5-18) เป็นระยะที่มีคอร์ปัสลูเทียมเจริญดี มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูง
4) ระยะโปรเอสตรัส (proestrus) (วันที่ 18-20) เป็นระยะก่อนจะเกิดการเป็นสัด คอร์ปัสลูเทียมเกิดการสลายตัวทำให้ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนต่ำลงเกิดการเริ่มของวงรอบการเป็นสัด

มีการแบ่งรอบการเป็นสัดอีกแบบหนึ่งโดยใช้ระยะการเจริญของคอร์ปัสลูแทียมเป็นตัวกำหนดซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะลูเทียลเฟส (luteal phase) คือช่วงวันที่ 0-18 ของรอบการเป็นสัด (metestrus และ diestrus) และระยะฟอลลิคูล่าเฟส (follicular phase) คือช่วงวันที่ 18-21 ของรอบการเป็นสัด (proestrus และ oestrus)เป็นระยะที่โคนมแสดงอาการเป็นสัด

การตกไข่เกิดขึ้นเมื่อมีการแตกของฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ (mature antral follicle) ทำให้ไข่หลุดเข้าสู่ท่อนำไข่ซึ่งเกิดขึ้นในวันที่ 1 ของรอบการเป็นสัด เวลาที่ไข่ตกเป็นระยะเวลาที่ประมาณ

ยาก ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลือกระยะเวลาของการผสมพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ผลในการผสมติดสูง มีรายงานพบว่าการตกไข่เกิดขึ้นในไม่กี่ชั่วโมงหลังการเป็นสัด โดยเฉลี่ยประมาณ 12-15 ชั่วโมงหลังจากหมดสัด ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการผสมเทียมนั้นอยู่ในระหว่างการเป็นสัดของแม่โคซึ่งจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่สำคัญคือ ระยะเวลาที่ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดได้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่โคและเวลาของไข่ตกออกมาจากรังไข่ พบว่าไข่จะตกจากรังไข่หลังจากแม่โคหมดการเป็นสัดประมาณ 12 ชั่วโมงโดยประมาณ (พีรศักดิ์, 2528) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ผลของการผสมเทียมโคในช่วงเวลาต่างๆของการเป็นสัดที่มีต่ออัตราการผสมติด

เวลาในการผสม	จำนวนแม่โค	อัตราการผสมติด(%)
เริ่มการเป็นสัด	25	44
ช่วงกลางของการเป็นสัด	40	82
ช่วงกลางของการเป็นสัดและผสมซ้ำหลังจากนั้น 24ชั่วโมง	25	84
ช่วงหมดการเป็นสัด	40	75
หลังหมดการเป็นสัด 6 ชั่วโมง	40	62
หลังหมดการเป็นสัด 12 ชั่วโมง	25	32
หลังหมดการเป็นสัด 18 ชั่วโมง	25	28
หลังหมดการเป็นสัด 24 ชั่วโมง	25	12
หลังหมดการเป็นสัด 36 ชั่วโมง	25	8
หลังหมดการเป็นสัด 48 ชั่วโมง	25	0

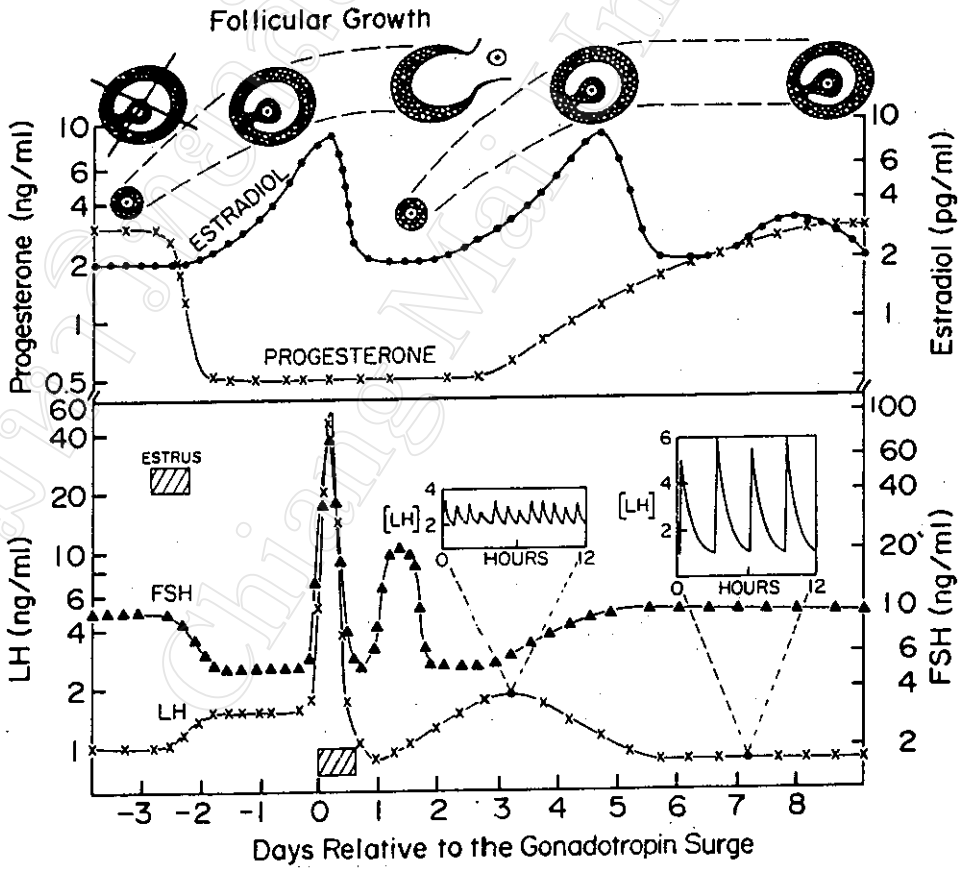
ที่มา : พีรศักดิ์ (2528)

2.2 ฮอร์โมนที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัด

วงรอบการเป็นสัดที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทุกชนิด ถูกควบคุมโดยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ ระบบประสาทส่วนกลาง ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และฮอร์โมนจากรังไข่

ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotrophic hormone) ที่หลั่งจากต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) ได้แก่ ฟอลลิเคิลสตีมูเรทติงฮอร์โมน (follicle stimulating hormone, FSH) และลูทีไนท์ซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) ซึ่งมีผลต่อรังไข่ กระตุ้นให้กระเปาะไข่สุก และมีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งในระหว่างวันที่ 16-18 ของวงรอบการเป็นสัดในโค ระดับโปรเจสเตอโรน

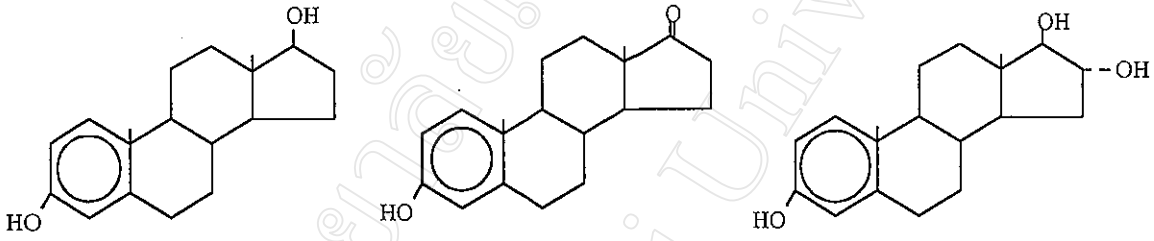
ในกระแสเลือดจะลดลงแต่ระดับเอสโตรเจนในกระแสเลือดจะสูงขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัด โดยผ่านทางระบบประสาท และมีการหลั่งลูทีไนท์ซิ่งฮอร์โมน จากต่อมพิทูอิทารีในขณะเริ่มเป็นสัด สำหรับในโคจะเกิดขึ้นในช่วง 25 ชั่วโมงก่อนตกไข่ การเพิ่ม LHในกระแสเลือดอย่างรวดเร็วนี้ มีผลไปกระตุ้นกรานูโลซ่าเซลล์ (granulosa cells) ของกระเปาะไข่ให้เจริญเติบโตขึ้น และผลิตโปรเจสเตอโรนออกมา ในช่วงเวลาเดียวกันมีคอลลาจิโนไลติคเอนไซม์ (collagenolytic enzyme) ที่ไปมีผลต่อผนังของกระเปาะไข่ ทำให้เกิดการตกไข่ กลไกนี้เกิดในช่วงประมาณ 10-11 ชั่วโมง หลังหมดการเป็นสัดในโค (Hansel and Convey, 1983) การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆ ในวงรอบการเป็นสัด แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1. แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆในวงรอบการเป็นสัดของโคนม (Hansel and Convey, 1983)

2.3 บทบาทและแหล่งผลิตของฮอร์โมนเอสโตรเจน

ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) จัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสารประเภทสเตียรอยด์ (steroid hormone) ซึ่งพบในระบบหมุนเวียนเลือดที่สำคัญมี 3 ชนิดได้แก่ อีสโตรน (estrone) อีสตรอล (estriol) อีสตราไดออล-17 เบต้า (estradiol –17-β) ทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันที่โครงสร้างของโมเลกุลต่างกัน ดังภาพที่ 2 อีสตราไดออล-17เบต้าเป็นชนิดที่แสดงฤทธิ์ของเอสโตรเจนได้สูงสุดมากกว่าอีสโตรน อีสตรอล เท่ากับ 10 และ 25 เท่า ตามลำดับ อีสตรอลและอีสโตรน เป็นสารเมตาโบไลท์ของอีสตราไดออล (Reed and Murray, 1988)



17β-estradiol **estrone** **estriol**

ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนอีสตราไดออล อีสโตรน อีสตรอล (ที่มา: Reed and Murray, 1988)

ฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนในสัตว์เพศเมียที่ผลิตได้จากรังไข่ ต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) และในขณะตั้งครรภ์ผลิตได้จากหน่วยของตัวอ่อน (foetoplacental unit) ในสัตว์เพศผู้ผลิตได้จากอัณฑะ (testis) และต่อมหมวกไตส่วนนอก ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความสำคัญสำคัญต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพศเมียที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จากการศึกษาโดยอาศัยเทคนิค *in vitro* ของการเลี้ยง follicular cyst ซึ่งได้จากคนไข้ พบว่าการสร้างแอนโดรเจน (androgen) จากเพคนานีโรน (pregnanelone) เกิดได้ 2 ทาง ที่สำคัญ ซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์ ดังภาพที่ 3 ต่อมาพบว่าการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเซลล์กรานูโลซ่าผลิตได้จากวิถีทาง Δ^4 ในขณะที่ทีกาเซลล์ (theca cells) ผลิตแอนโดรเจนและเอสโตรเจนโดยวิถี Δ^5 (Reed and Murray, 1988) เซลล์กรานูโลซ่าของแกะ (Moor, 1977) และโค (Hansel and Fortune, 1978) สามารถผลิตอีสตราไดออล ได้ถ้าให้สารตั้งต้นของเอนไซม์อะโรมาเตส (aromatase)หรือน้ำเลี้ยงของเนื้อเยื่อทีกาเซลล์

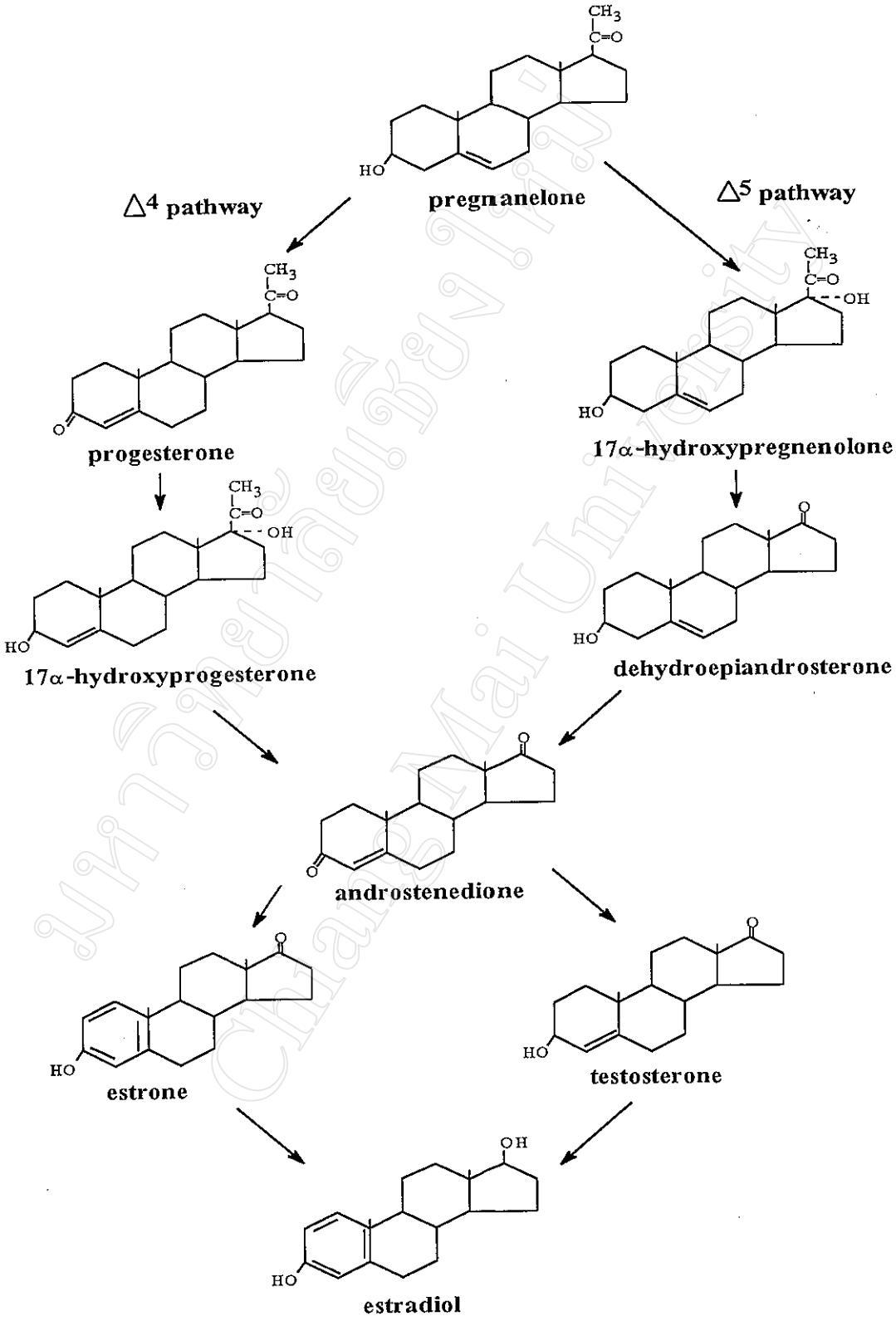
และมีรายงานเพิ่มเติมพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณทีกาเป็นบริเวณที่สังเคราะห์ฮอร์โมนแอนโดรเจนในฟอลลิเคิล และการหลั่งฮอร์โมนแอนโดรเจนเพิ่มขึ้นได้โดยอิทธิพลของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนโดยไม่เกี่ยวข้องกับฟอลลิเคิลสตีมูเลทติ้งฮอร์โมนในแกะ (England *et al.*, 1981) โค (Hansel and Fortune, 1978) และสุกร (Evan *et al.*, 1981) รวมถึงการพบว่าฮอร์โมน อีสตราไดออล-17-เบต้าเป็นชนิดที่แยกได้จากของในฟอลลิเคิล (follicular fluid) (Short, 1962) ส่วน อีสโตรนพบในปริมาณน้อยมาก และอีสตรอลไม่พบในรังไข่ของโค (England *et al.*,1973)

ในวงรอบการเป็นสัดของสัตว์เพศเมีย ปริมาณอีสตราไดออล-17-เบต้าเป็นตัวกำหนดลักษณะการเป็นสัด ความเข้มข้นของอีสตราไดออลในพลาสม่าน้อยมากตลอดทั้งรอบการเป็นสัด และจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระยะ 4 วันก่อนจะเป็นสัดจะตรวจพบระดับสูงที่สุดก่อนวันที่แสดงอาการยืนนิ่งให้ตัวผู้ผสมพันธุ์ (Peter and Ball, 1986) Henricks และคณะ (1972) รายงานว่ารอบการเป็นสัดของโคเนื้ออยู่ในช่วง 18-24 วัน ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลในพลาสม่าหลังการเป็นสัด 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.1, 6.8, 13.3, 6.0 และ 13.3 พิโคกรัม/มล. ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยในช่วงแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดประมาณ 25.3 พิโคกรัม/มล. ในระหว่างรอบการเป็นสัดของโคนมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียน จากการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้าในพลาสมาพบว่าความเข้มข้นของอีสตราไดออล-17-เบต้า ค่อยๆเพิ่มในช่วงท้ายของระยะลูเทียลเฟส จากนั้นระดับของอีสตราไดออล17-เบต้า จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะก่อนโคแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดเป็น 6 พิโคกรัม/มล.(Glencross *et al.*, 1973) มีรายงานในทิศทางเดียวกันโดยใช้ตัวอย่างพลาสมาและน้ำนมที่เอาไขมันออกจากโคพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียน พบว่ามีความเข้มข้นของฮอร์โมนเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ช่วงท้ายของระยะลูเทียลเฟส ระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออล 17-เบต้าจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระยะฟอลลิคูล่าเฟส เป็นะระยะที่มีระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล 17-เบต้าสูง ช่วงวันที่ 16-21 ของรอบการเป็นสัด Meisterling และ Dailey (1987) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้าในน้ำนมและซีรั่มของโคที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกัน (synchronized cows) มีความสัมพันธ์กัน ($r = 0.88$, $P<0.01$) สำหรับในน้ำนมมีระดับความเข้มข้นของของฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้าต่ำกว่าในซีรัม ในน้ำนมการเพิ่มของฮอร์โมนอีสตราไดออลสูงสุด นับเป็นที่ชั่วโมงที่ 0 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 4.2 พิโคกรัม/มล. และมีระดับลดลงต่ำลงหลังจากชั่วโมงที่ 0 ก่อนและหลัง 12, 24, 36 ชั่วโมง เท่ากับ 2.5, 1, 0.8 พิโครกรัม/มล. Dobson (1983) รายงานความเข้มข้นของฮอร์โมนอีสตราไดออล 17-เบต้า ในน้ำนมของโคในระยะลูเทียลเฟส เท่ากับ 1-4 พิโคกรัม/มล. และในระยะฟอลลิคูล่าเฟส เท่ากับ 4-6 พิโคกรัม/มล.

2.4. เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay , ELISA)

เทคนิคในการใช้หาปริมาณสารที่มีปริมาณน้อยที่นิยมใช้กันมานาน คือ เทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเซ (Dobson, 1983)ซึ่งอาศัยหลักการของปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยใช้ตัวติดตามปฏิกิริยาเป็นสารกัมมันตรังสี ได้แก่ ตริเตียม (^{3}H) ไอโอดีน 125 (^{125}I) คาร์บอน 14 (^{14}C) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีข้อดีคือ มีความแม่นยำ ถูกต้องสูง สามารถหาปริมาณสารที่มีอยู่จำนวนน้อยได้ มีความจำเพาะเจาะจงสูง แต่มีข้อเสียคือ ผู้ปฏิบัติงานเสี่ยงต่อการได้รับอันตรายจากสารกัมมันตรังสีเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ปัญหาการกำจัดขยะที่มีการปนเปื้อนสารกัมมันตรังสีมีข้อจำกัดในการใช้งานมากเช่นข้อกฎหมายในการใช้สารกัมมันตรังสี และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพงมากทำให้การนำไปประยุกต์ใช้ในฟาร์มเป็นเรื่องที่เป็นไปได้ยาก ต่อมาได้มีเทคนิคที่มาทดแทนเทคนิค RIA คือ เทคนิค ELISA ซึ่งอาศัยหลักการในการทำปฏิกิริยาคล้ายคลึงกับเทคนิค RIA จะแตกต่างกันที่ตัวติดตามปฏิกิริยา เทคนิค ELISA ใช้เอนไซม์เป็นตัวติดตามปฏิกิริยาแทนสารกัมมันตรังสี โดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีติดบนพื้นผิวตัวกลาง (solid-phase) ที่สามารถดูดติดแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ เช่น โพลีสไตรีน โพลีไวนิล เทคนิคนี้อาศัยหลักการของปฏิกิริยา 2 ชนิด คือ ปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี และเอนไซม์ (enzyme) กับ สับสเตรท (substrate) โดยเป็นการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่มีเอนไซม์ติดฉลากอยู่กับแอนติเจนที่มาจากสารละลายมาตราฐานหรือจากตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ เพื่อจะแย่งกันจับแอนติบอดีที่มีปริมาณจำกัด หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกแล้วก็จะวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติมสับสเตรทลงไป แล้วเก็บไว้ในที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้น จะได้สัดส่วนผกผันกันกับปริมาณแอนติเจน เมื่อต้องการทราบปริมาณสารก็นำค่าความเข้มข้นของสีของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตราฐาน (มณีวรรณ, 2531; Crowther, 1995; Campbell, 1984 ; Catty, 1989)

ในปัจจุบันเทคนิค ELISA เป็นที่นิยมแพร่หลายในการวัดสารปริมาณน้อย เช่น วัดปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว (Crowther, 1995) ใช้วัดปริมาณฮอร์โมนชนิดต่างๆ เช่น ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคนมที่ตั้งท้อง (Chang, 1983 ; Kasson, 1993) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำลาย (Tallon *et al*, 1984) ข้อดีของเทคนิค ELISA คือมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน มีความไวสูง ประหยัดเวลาในการวัด อุปกรณ์ในการใช้งานมีราคาไม่แพง รวมถึงการพัฒนานำไปใช้ในรูปแบบที่สำเร็จรูปเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการปฏิบัติงานในฟาร์มหรือนอกห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนในรังไข่ (ที่มา : Reed and Murray, 1988)

2.5. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในปี ค.ศ.1975 Kohler and Milstein พบวิธีการเตรียมเซลล์ให้สามารถสร้างแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะเจาะจงได้ และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมากโดยอาศัยหลักการของการเชื่อมระหว่างลิมโฟซัยท์ชนิดบี ที่ถูกกระตุ้นโดยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดี กับเซลล์ไมอิโลมา ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง ผลของการเชื่อมเซลล์ก่อให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridomas) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงได้ตามต้องการ และมีอายุยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมา แอนติบอดีที่ผลิตได้ เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากสร้างมาจากเซลล์โคลน (clone) เดียวกัน และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูง

ความสำเร็จของเทคนิคนี้อยู่ที่ความสามารถในการเตรียมเซลล์ไมอิโลมาให้สามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน ซีเล็กทีฟ มีเดีย (selective media) เพราะขาดยีนบางยีน (functional gene) ที่จำเป็นในการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) selective media โดยทั่วไปคือสารละลาย HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium) ซึ่งมีส่วนประกอบของ ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) อะมินอฟทารีน (aminopterin) และไทมีดีน (thymidine) อะมินอฟทารีนจะขัดขวางการสร้างพิวรีนตามวิธีปกติ (*Denovo* pathway) ทำให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ต้องเปลี่ยนมาสร้างนิวคลีโอไทด์ด้วยทางอ้อม (Salvage pathway) ด้วยการใช้ ไฮโปแซนทีน ในการสร้างพิวรีนโดยอาศัยเอนไซม์ hypoxanthine-quanine phosphoribosyl tranferase (HGPRT) และสร้างไทมีดีนไคเนส (thymidinekinase, TK) แต่เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาที่ใช้นั้นขาดเอนไซม์ HGPRT และ/หรือ TK ทำให้ไม่สามารถสร้าง นิวคลีโอไทด์จาก salvage pathway ได้ จึงตายใน HAT media นี้ ในขณะที่เซลล์ hybridoma มานั้นอาศัยเอนไซม์ทั้งสองจากเซลล์ปกติคือ B-lymphocyte ทำให้สามารถสร้างดีเอ็นเอและเจริญเติบโตสร้างแอนติบอดีได้ (Harlow, 1988) เซลล์ไมอิโลมามีการเตรียมขึ้นหลายสายพันธุ์ รายละเอียดตาม ตารางที่ 2

สารที่ทำให้เซลล์รวมกันระหว่างเซลล์ไมอิโลมาและ B- lymphocyte ได้แก่ โพลีเอทอรีนไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 ความเข้มข้น 50 % (Schelling, 1995) หรือ PEG (น้ำหนักโมเลกุล 1540) 47 % ผสมกับ 7.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 1:2 (Borrebaeck and Moller, 1986) ขั้นตอนในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีขั้นตอนดังภาพที่ 4

เซลล์ไมอิโลมาชนิดต่างๆที่มีอยู่ส่วนมากได้มาจากหนูขาวตัวเล็กและหนูพุก (rat) การผลิต MAb ที่นำไปใช้งานสัตว์สปีชีส์อื่นๆ เช่น คน โค สุกร มีข้อจำกัดคือ MAbไม่สามารถอยู่ในร่างกายสัตว์เหล่านั้นได้นาน เนื่องจาก MAb ของหนูเป็นสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันจะกำจัดทิ้งไปและอีกประการหนึ่งสำหรับแอนติเจนบางชนิดเป็นแอนติเจนชนิดอ่อน (weak antigen) กระตุ้นในหนูเล็กไม่มีการตอบสนอง แต่จะตอบสนองได้ดีในสัตว์สปีชีส์อื่นๆ เช่น กระต่าย ในระยะหลังจึงได้มีความพยายามเป็นอย่างมากในการผลิต MAb จากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ (heterohybridomas) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ดังตารางที่ 3

Raybould และ Takahashi (1981) ได้ผลิต heterohybridomas ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยท์ของกระต่ายกับ SP2/0-Ag14 ได้เป็นผลสำเร็จและสามารถรักษาเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ให้ผลิต MAb ได้นานถึง 4 เดือนโดยการเติมซีรัมของกระต่าย (normal rabbit serum, NRS) เท่ากับ 7.5 % ของอาหารเลี้ยงเซลล์

Teng และคณะ (1983) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของคนจาก heterohybridomas ระหว่างหนูกับคน ซึ่งใช้เซลล์ลิมโฟซัยท์ของคนจากหลายแหล่ง ได้แก่ เซลล์จากระบบเลือด (peripheral blood cells, PBL) เชื่อมเซลล์กับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 เกิด Heterohybridomas เท่ากับ 31% และผลิตอิมมูโนโกลบูลินชนิด จี (IgG) เท่ากับ 33 % ของ Heterohybridomas ที่เกิดขึ้น ส่วน Jahn และคณะ (1990) ที่สามารถใช้เซลล์จาก PBL เชื่อมเซลล์กับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ CB-C7 และ P3X63Ag8.653 ได้ผลผลิตเท่ากับ 96% และ 17 % ตามลำดับ และผลิตอิมมูโนโกลบูลิน ชนิดเอ็ม (IgM)

จากรายงานของ Walstra และคณะ (1985) พบว่าจากกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand white) ตัวเมีย 5 ตัว และตัวผู้ 5 ตัว ทำการแยกชนิดเซลล์ลิมโฟซัยท์ ชนิด บี และ ที จากน้ำเลือด พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cells) ทั้งหมดประมาณ 6.5-7.3 X 10^9 เซลล์ / 1 ลิตรของเลือด แยกเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ที่ 37°ซ และอุณหภูมิห้องได้เซลล์ลิมโฟซัยท์ ชนิดบีเท่ากับ 27±6 และ 46±6 % ตามลำดับ

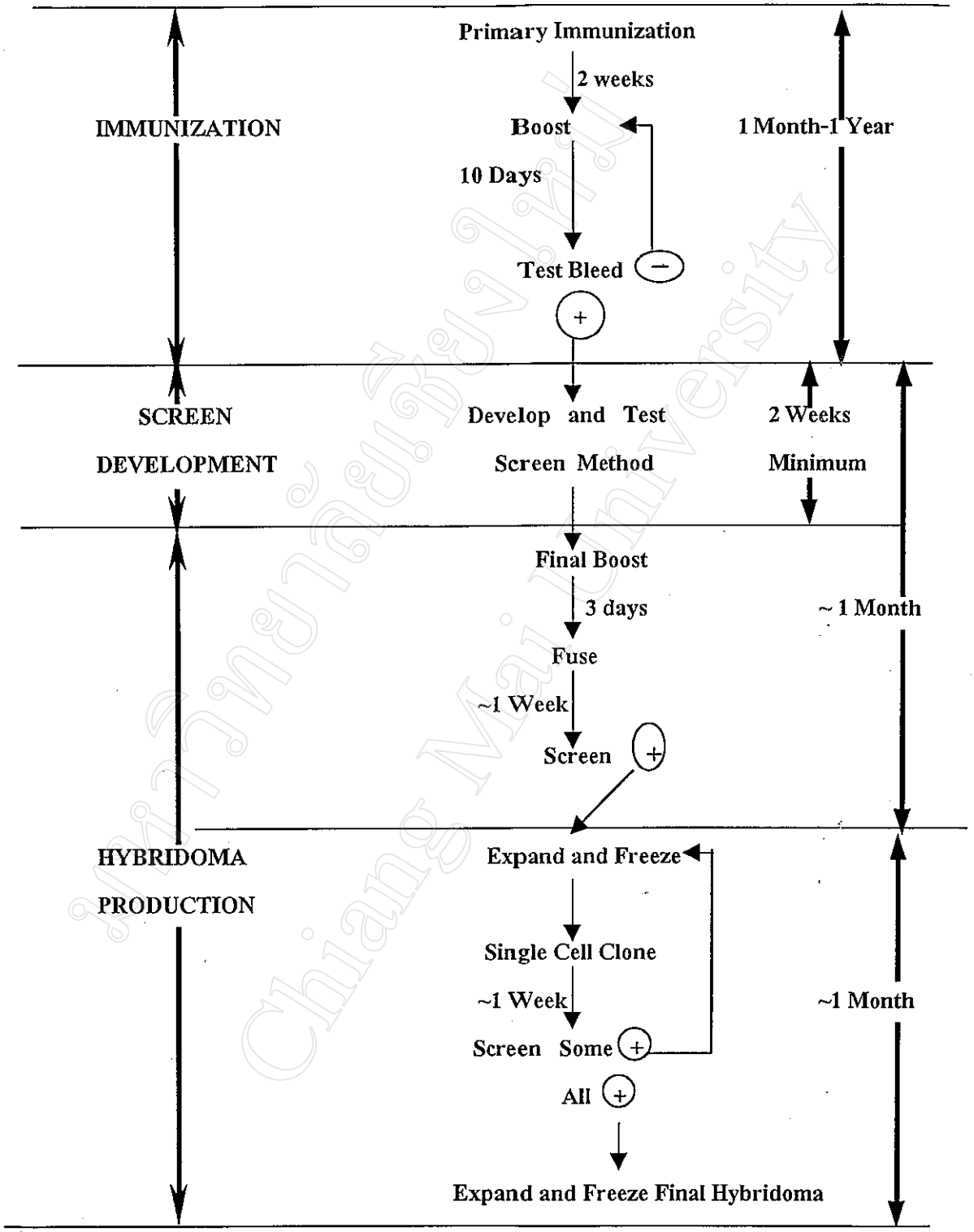
ตารางที่ 2. แสดงเซลล์ไมอิโลมาที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ

Cell line	Reference	Derived from	Chains expressed	Secreting
Mouse Lines				
P3-X63Ag8	Kohler and Milstein (1975)	P3K	γ1,κ	IgG_1
X63Ag8.653	Kearney *et al.* (1979)	P3-X63Ag8	None	No
Sp2/0Ag14	Kohler and Milstein (1976)	P3-X63Ag8	None	No
	Shulman *et al.* (1978)	X BALB/c		
FO	De St. Groth and Scheidegger (1980)	Sp2/0Ag14	None	No
NSI/1-Ag4-1	Kohler *et al.* (1976)	P3-X63Ag8	Kappa	No
NSO/1	Galfre and Milstein (1981)	NSI/1-Ag4-1	None	No
FOX-NY	Taggart and Samloff (1984)	NSI/1-Ag4-1	Kappa (?)	No
Rat Lines				
Y3-Ag1.2.3	Galfre *et al.* (1979)	Y3	Kappa	No
YB2/0	Kilmartin *et al.* (1982)	YB2/3HL	None	No
IR983F	Bazin (1982)	LOU/c rat	None	No

ที่มา: Harlow (1988)

ตารางที่ 3. การผลิตลูกผสมข้ามสปีชีส์

ชนิดของเซลล์ปกติ	ชนิดเซลล์ไมอิโลมา	MAbต่อต้าน	เอกสารอ้างอิง
เซลล์ลิมโฟซัยท์ของโค	NS1/NS0	IgG	Jone and Howard, 1995
เซลล์ลิมโฟซัยท์ของโค	SP-2/0	IgG_1	Srikumaran *et al.*,1983
เซลล์ม้ามของสุกร	SP2/0	Growth hormone	Lumanglas and Wang, 1995
เซลล์ม้ามของม้า	SP2/0	Anemia virus	Perryman and Mason, 1995
เซลล์ม้ามของหนูขาว(Rat)	P3-X63Ag8	MHC	Galfre *et al.*, 1977
เซลล์ลิมโฟซัยท์ของคน	X63Ag8.653	-	Cooper and Kirkpatrick, 1995

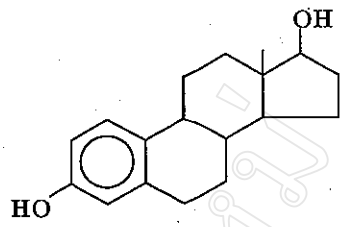


ภาพที่ 4. แสดงขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ดัดแปลงจาก Harlow, 1988)

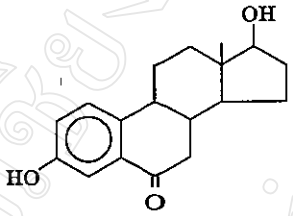
2.6. การเตรียมแอนติเจน

ฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้า ชื่อทางเคมีคือ (17β)-estra-1,3,5 (10)-triene-3,17α-diol มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 272.37 มีจุดหลอมเหลว (melting point) 173-179 °ซ และสามารถดูดแสง Ultraviolet (UV) ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 225 และ 280 นาโนเมตร (Budavari *et al.*, 1989) อีสตราไดออล-17-เบต้ามีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมาก ซึ่งไม่มีความสามารถในเป็นแอนติเจนได้ เรียกว่า เฮพเทน (hapten) ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติเป็นเฮพเทนไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ให้ตอบสนองได้ ดังนั้นต้องอาศัยการเชื่อมติด (conjugation) ระหว่างเฮพเทนกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่ เช่น bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA) จึงมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้ Erlanger และคณะ (1967) ได้เชื่อมต่อระหว่าง estrone-17-(o-carboxymethyl) oxime กับ BSA ด้วยการ ผสม estrone-17-(o-carboxymethyl) oxime 2.06 กรัม (6.0 mmoles) กับ Tri-n-butylamine 2.28 กรัม (12.0 mmoles) ซึ่งละลายใน dioxane ปริมาตร 2.86 มล. ลดอุณหภูมิลงแล้วเติม isobutyl-chlorocarbonate 0.70 กรัม (6.0 mmoles) ในปริมาตร 0.63 มล. ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายที่มี BSA 7 กรัม (0.10 mmole) ในน้ำ 183.5 มล. และเติม dioxane 123.5 มล. สุดท้ายเติม 1 *N* NaOH 7.0 มล. ให้มี pH 8.0 ปั่นในที่เย็นต่อเนื่อง 4 ชั่วโมง หลังจากหลังจากนั้น dialyzed ในน้ำไหลนาน 17 ชั่วโมง ปรับ pH ให้เป็น 4.6 ด้วย 1 *N* HCl ทิ้งไว้ข้ามคืน จึงนำไปปั่นแยก เพื่อเก็บตะกอน จากนั้นนำตะกอนมาละลายน้ำ 200 มล. ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 *N* NaOH แล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยอะซิโตน (acetone) ที่เย็นในปริมาตร 300 มล. และปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย 1 *N* HCl ปั่นแยกเพื่อเก็บตะกอนอีกครั้ง แล้วทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตน (acetone) ซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ 300 มล. ปรับ pH เป็น 7.8 ด้วย 1 *N* NaOH จากนั้นปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวไป dialyzed ในน้ำไหล 8 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนอีสตราไดออล 17-เบต้า และอนุพันธุ์ต่างๆที่เกิดขึ้นดังภาพที่ 5

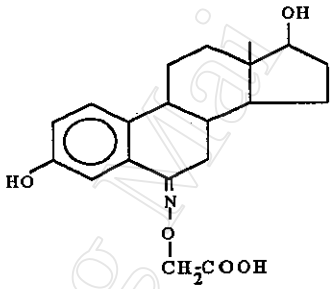
Walker และคณะ (1973) ได้เชื่อมต่อระหว่าง estriol-6-(o-carboxymethyl) oxime กับ BSA ด้วยวิธีผสม estriol-6-(o-carboxymethyl) oxime 50 มก., tri-n-butylamine 100 µl และ dioxane 10 มล. ทำให้สารละลายเย็นลงแล้วเติม isobutyl chloroformate 15 µl ทิ้งไว้ 60 นาทีจากนั้นเติมสารละลายที่มี BSA 100 มก. ละลายในน้ำ 10 มล. ปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย 1 *N* NaOH จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง จึงนำไป dialyzed ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในสารละลายที่มี dioxane 60% นาน 24 ชม. และในน้ำอีก 3 วันแล้ว lyophilized จะได้ estriol-6-(o-carboxymethyl) oxime-BSA และการเตรียมแอนติเจนของฮอร์โมนอีสตราไดออลโดย Lindner และคณะ (1972) ในรูป 6-ketoestradiol-6-o-carboxymethyl-oxime -HSA ซึ่งมีรายละเอียดในการเตรียม ดังภาพที่ 6



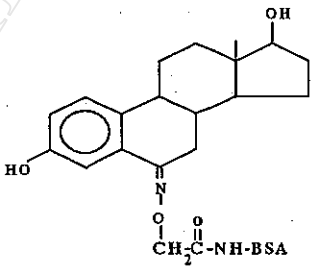
(a) 17β-estradiol



(b) 6-ketoestradiol-17β

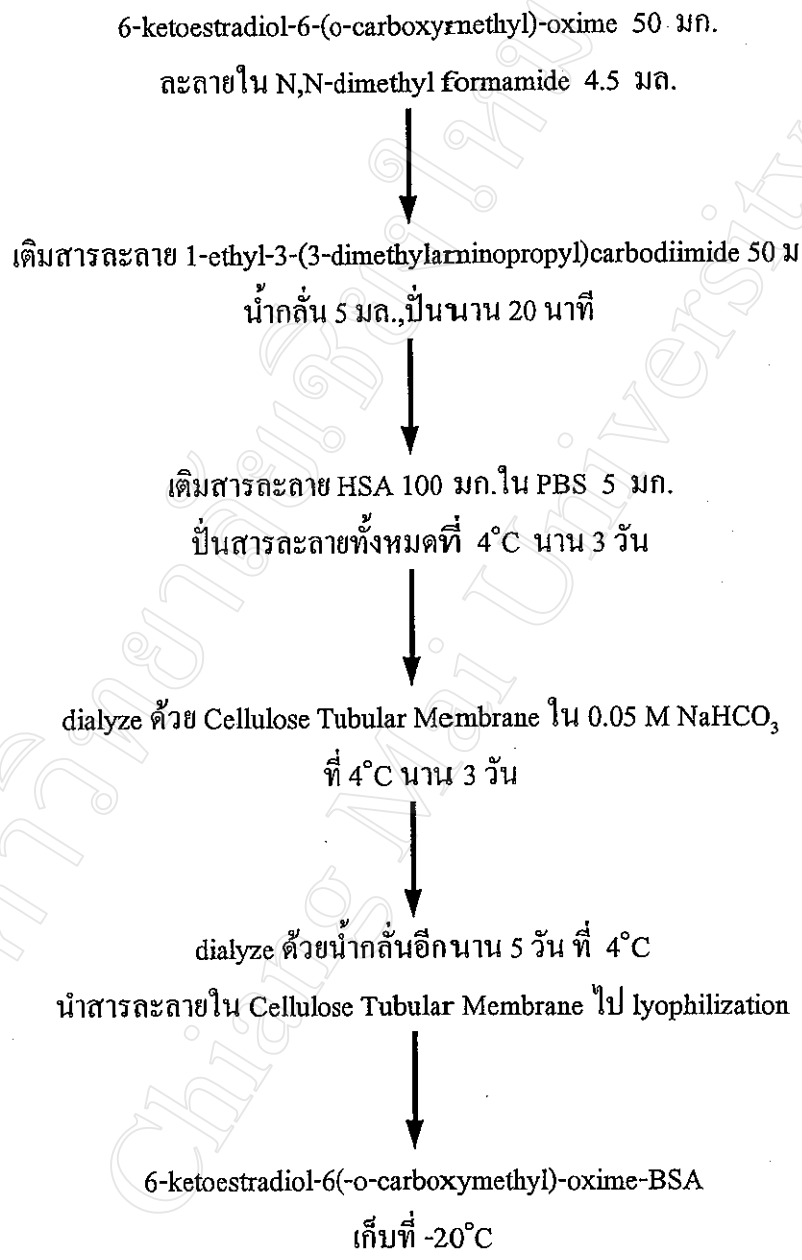


(c)17β-estradiol-6-(o-carboxymethyl) oxime



(c) 17β-estradiol-6-(o-carboxymethyl) oxime-BSA

ภาพที่ 5. แสดงโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมน 17-เบต้า-อีสตราไดออล, และอนุพันธุ์ต่างๆ (จาก Erlanger *et al.*, 1967)



ภาพที่ 6. แสดงวิธีการเชื่อมติดระหว่าง 6-Ketoestradiol-6(-o-carboxymethyl)-oxime กับ BSA (ที่มา: Lindner *et al.*, 1972)

2.7. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

Walker และคณะ (1973) ได้กระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยวิธีการกระตุ้น 2 วิธีคือ (1) ใช้แอนติเจน 1 มก. ใน Freund's complete adjuvant (FCA) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังหลายจุด หลังจากนั้นทุกๆ สัปดาห์ฉีดแอนติเจน 2.5 มก. ติดต่อกัน 8 สัปดาห์ และหลังจากนั้นทุกๆเดือน (2)ใช้ capsule ที่ทำจาก silastic tubing โดยตัดท่อให้ได้ความยาว 20 มม. ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยกาว medical adhisive silicone type A ทิ้งไว้ในกล่องที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมแอนติเจนลงใน Capsule 12-15 มก. แล้วปิดปลายที่เหลือ นำ capsule ไปสอดเข้าใต้ผิวหนังส่วนหลังของกระต่าย หลังจากนั้นกระตุ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับวิธีที่ 1. พบว่าวิธีที่ 2 ให้ ไตเตอร์ 1:100 ในขณะที่วิธีที่ 1 ให้ไตเตอร์ 1:500 ถึง 1:2,000.

Fantl และ Wang (1984) ได้ทดลองกับแอนติเจน 4 ชนิดประกอบด้วยแอนติเจนต่อโปรเจสเตอโรน (11α-hydroxyprogesterone hemisuccinate : BSA), เทสทอสเตอร์โรน (testosterone ในรูป testosterone 17β-hemisuccinate: BSA), อีสตราไดออล (estradiol ในรูป estradiol-6-(o-carboxymethyl) oxime : BSA มีอัตราส่วนของ estradiol : BSA เท่ากับ 24:1], และ dehydroepiandrosterone (DHA) ในรูป dehydroepiandrosterone-7-(o-carboxymethyl)oxime : BSA ใช้หนู BALB/c 6 ตัวต่อแอนติเจนแต่ละชนิด การกระตุ้นภูมิคุ้มกันใช้แอนติเจน 10 ไมโครกรัมในสารละลายพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS) 200 ไมโครลิตร ผสมกับ FCA 100 ไมโครลิตร ฉีดให้หนูอายุ 6 ถึง 8 สัปดาห์ ระยะเวลาในการฉีดห่างกัน 4 สัปดาห์ หลังจากตรวจพบแอนติบอดีไตเตอร์แล้วฉีดแอนติเจนเข้มข้น 30 ไมโครกรัมในสารละลายพีบีเอส 0.2 มล. เข้าช่องท้อง 3 วันก่อนการทำการเชื่อมเซลล์เมื่อตรวจแอนติบอดีไตเตอร์จากการเก็บตัวอย่างเลือดที่หาง (tail-vein) 2 สัปดาห์หลังการฉีดครั้งที่สอง โดยใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary) ประมาณ 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายพีบีเอส 1 มล. แล้วปั่นเอาส่วนพลาสมาใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาวัดการเกาะเกี่ยวกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม วัดค่าเป็นเปอร์เซนต์ของค่า activity ทั้งหมด (%binding) พบว่ากลุ่มแอนติเจนที่เป็นเทสทอสเตอร์โรนมีการผลิตแอนติบอดีต่ำสุดคือ หนู 2 ใน 6 ตัวมี % binding เท่ากับ 14-16 % รองลงมาเป็นกลุ่มอีสตราไดออล มีหนู 1 ใน 6 ตัวมี % binding มากกว่า 50 % ส่วนกลุ่ม DHA มีหนู 4 ใน 6 ตัวมี % binding อยู่ระหว่าง 20-40 % กลุ่มที่ผลิตแอนติบอดีสูงที่สุดคือกลุ่มโปรเจสเตอโรน หนูทั้ง 6 ตัวมี % binding เท่ากับ 20-60 % ส่วนอีกงานทดลองหนึ่งทำในหนูพุกโดย Bourtourault และคณะ (1991) ใช้แอนติเจนที่เป็น 17β-estradiol-6-(o-carboxymethyl)oxime : BSA มีอัตราส่วนของ estradiol : BSA เท่ากับ 35:1, testosterone-3-(o-carboxymethyl)oxime : BSA มีอัตราส่วนของ testosterone : BSA เท่ากับ 22:1 โดยให้ estradiol : BSA 100 ไมโครกรัม และ testosterone : BSA 150 ไมโครกรัม ผสมกับ FCA อัตราส่วน 1:1

(v:v) ในการฉีดครั้งแรก หลังจากนั้นฉีดอีก 5 ครั้งใช้ adjuvant ชนิด Freund's incomplete adjuvant (FIA) ผสมกับ muramyldipeptide (MDP) 60 ไมโครกรัม ต่อการฉีด 1 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน การฉีดใช้ปริมาตร 1 มล. แบ่งฉีดใต้ผิวหนังบริเวณส่วนหลัง และด้านข้างประมาณ 10 ตำแหน่งพบว่า กลุ่ม estradiol : BSA มี % binding ในช่วง 28.4-86.9 ในขณะที่กลุ่ม testosterone : BSA มี % binding ในช่วง 4.9-67.9

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University