

ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต้านฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน
ต่อการทำงานของรังไข่หลังคลอด
ของแม่โคนมลูกผสม พันธุ์พื้นเมือง x โฮลสไตน์

**Effect of Passive Immunization Against Testosterone on
Postpartum Ovarian Activity
in Crossbred Native x Holstein Dairy Cows**

อภิชาติ รัตนวนิช^๑ เพทาย พงษ์เพียรจันทร์^๒ วิภาณ สุขประเสริฐ^๓
พันทิพา พงษ์เพียรจันทร์^๒ และชาตรี ทองอินทร์^๒
Apichart Ratanavanich¹ Petai Pongpiachan² Vichan Sookprasert³
Puntipa Pongpiachan² and Chatree Tong-Inn²

Abstract : The objective of this study was to passively immunize against testosterone in crossbred Native x Holstein dairy cows on postpartum ovarian activity. Immunogen was prepared by conjugation between Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime and Human Serum Albumin (HSA) to be Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime-HSA (T4-HSA). Experimental animals were derived from three groups. First, crossbred Native x New Zealand White rabbits were used for assessing immunogenicity of the conjugate before administering to calves. Second, calves from Huay Hong Khrai Royal Development Study Center were employed for producing antibodies against testosterone for passively

^๑ สำนักงานปศุสัตว์เขต 5 กรมปศุสัตว์ เชียงใหม่ 50300.

Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Chiang Mai 50200, Thailand.

^๒ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200.

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

^๓ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดลำพูน อ.เมือง จ.ลำพูน 51000

Lumphun livestock Development Office, Lumphun 51000, Thailand.

ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต้านฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ต่อการทำงานของรังไข่หลังคลอดของแม่โคนมลูกผสม พันธุ์เมือง x โฮลสไตน์

immunization in cows. Third, were crossbred Native x Holstein dairy cows within the same study center. T4-HSA, which was detected the ability to stimulate antibody production in the rabbits radioimmunoassay (RIA) technique, was used for immunization to the calves. Positive plasma from the calves that showed antibody titer by RIA were collected for passively immunization to the cows. Experimental design was completely randomized design (CRD) with regiment : control and passively immunization against T4-HSA. The cows were immunized by subcutaneous injection of plasma from intact crossbred milking cows or from the calves which had positive anti-testosterone antibody. The results of this study were that : the rabbits did react to the T4-HSA and showed ability to produce antibodies that were capable to bind with tritiated testosterone at activities of 1,000 to 3,000 cpm and the calves showed the percentage of binding to the tritiated testosterone at 20-62 % throughout 10 weeks of experimental period whilst the control group made only 3-11 %. Cows passively immunized by the calves' antibodies performed normal reproductive cycle and all exhibited pregnancy. These study demonstrated that passively immunization against testosterone trend to improve reproductive performance of the crossbred dairy cows.

บทคัดย่อ : การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟ (passive immunization) ต้านฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ต่อการทำงานของรังไข่หลังคลอดในโคนมลูกผสมพันธุ์เมือง x โฮลสไตน์. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogen) เตรียมจากการเชื่อมระหว่าง โมเลกุลของ Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime กับ Human Serum Albumin (HSA) เป็น Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime-HSA (T4-HSA) สัตว์ทดลองกลุ่มแรก เป็นกระต่ายลูกผสมพันธุ์เมือง x นิวซีแลนด์ขาวสำหรับทดสอบฤทธิ์สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เตรียมขึ้นใช้เองในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในร่างกายสัตว์ เป็นการทดสอบเบื้องต้นก่อนนำไปทดลองกับลูกโค การทดสอบผลการกระตุ้นใช้เทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) กลุ่มที่สองเป็นลูกโคนมจาก ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ เพื่อผลิตแอนติบอดี สำหรับนำไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟให้กับแม่โคนมลูกผสม กลุ่มที่สามเป็นแม่โคนมลูกผสมที่อยู่ในศูนย์นี้เช่นเดียวกัน. แผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีกลุ่มการทดลองเป็น : กลุ่มควบคุมและกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อต้าน T4-HSA. ผลการทดลองพบว่า T4-HSA สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต้านเทสโทสเตอโรนได้ทั้งในกระต่ายและลูกโค กล่าวคือ กระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีวัดเป็นความสามารถในการเกาะกับเทสโทสเตอโรนที่ติดรังสีได้ 1,000 ถึง 3,000 cpm ตลอดระยะเวลาการทดลอง 10 สัปดาห์ ในลูกโคสามารถผลิตแอนติบอดีวัดเป็น %Binding กับเทสโทสเตอโรนที่ติดรังสีได้ 20-62 เปอร์เซ็นต์ขณะที่กลุ่มควบคุมจับได้เพียง 3-11 เปอร์เซ็นต์ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อ T4-HSA พบว่าแม่โคนมทั้งหมดมีรอบการสืบพันธุ์เป็นปกติและทุกตัวตั้งท้อง โดยสรุปการวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อต้านฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมีแนวโน้มสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมได้.

Index words : การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน, พาสซีฟ, เทสโทสเตอโรน, โปรเจสเตอโรน, โคนม, immunization, passive, Testosterone, Progesterone, dairy cow

คำนำ

ในการผลิตโคนม ระยะเวลาระหว่างวันที่แม่โคคลอดลูกกับวันที่รังไข่เริ่มทำงานอีกครั้งและการกลับมีรอบการเป็นสัด (oestrouscycle) ใหม่หลังคลอดถือว่าเป็นค่าชี้ถึงประสิทธิภาพการผลิตลูกของแม่โคในแต่ละปี ในฟาร์มโคนมขนาดเล็กในจังหวัดเชียงใหม่ โดยเฉลี่ยแล้วแม่โคนมหลังคลอด อยู่ในสภาพไม่มีรอบการเป็นสัด (anoestrous) ประมาณ 20.5 เปอร์เซ็นต์ (Apichartsrungeon and Pongpiachan, 1990) ถือได้ว่าเป็นปัญหาอย่างหนึ่ง ในระบบการสืบพันธุ์ของโคนม สาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการควบคุมของระบบเอ็นโดไครน์ (Endocrine system) กล่าวคือต่อมใต้สมอง (Hypophysis) ผลิตโปรตีนฮอร์โมนชื่ออะดรีโนคอร์ติโคโทรปิก ฮอร์โมน (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH) ไปควบคุมการทำงานของต่อมหมวกไต (Adrenal gland) ให้ผลิตและหลั่งฮอร์โมนคอร์ติคอยด์ (Corticoid hormones) (Zarrow *et al.*, 1964) เรียกกลไกการควบคุมแบบนี้ว่า Hypophyseal-adrenal axis. กลไกนี้ทำงานเมื่อสัตว์ได้รับความเครียด เช่น การขาดอาหาร, การอยู่ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงเกินไป ฮอร์โมนคอร์ติคอยด์ที่เพิ่มขึ้นจะไปกีดการทำงานของระบบการสืบพันธุ์ของโคนม หลักฐานยืนยันคืองานของ Stoebel and Moberg (1979) ที่พบว่าในการกระตุ้นให้โคเป็นสัดพร้อมกัน (oestrus synchronization) ถ้าให้ฮอร์โมน ACTH ด้วยจะลดการหลั่ง ลูทีไนซิง ฮอร์โมน (Luteinizing hormone, LH) ในระยะที่เรียกว่า LH Surge, ลดอัตราการตกไข่ (ovulation rate) และลดช่วงเวลาในการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดให้สั้นลง แสดงว่าฮอร์โมนคอร์ติคอยด์อาจมีฤทธิ์กีดการทำงานของระบบสืบพันธุ์ได้ด้วยการควบคุม

ผ่านไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ไปมีผลต่อการทำงานของต่อมใต้สมอง และรังไข่ตามลำดับ เรียกกลไกนี้ว่า Hypothalamo-pituitary-gonadal and adrenal feedback control (Nieschlag *et al.*, 1974) สฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) เป็น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone) เช่นเดียวกัน มีหลักฐานการทดลองในแกะเพศผู้ (Schanbacher and Ford, 1977) พบว่า เทสโทสเตอโรนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน LH และฟอลลิเคิล-สเตอโรนเลทิง ฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone, FSH) ดังนั้นการควบคุมระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน อาจช่วยเพิ่มการทำงานของ LH และ FSH ทำให้การทำงานของระบบสืบพันธุ์ของโคดีขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะวัดผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์หลังคลอดของโคนมลูกผสมพื้นเมือง x ไฮลสไดน์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

กระต่ายลูกผสมพื้นเมือง x นิวซีแลนด์ขาว (New Zealand White) จากหมวดสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพศผู้ 3 ตัว (เบอร์ N85, N34, และ N104) สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอโรน

โคนมลูกผสมพื้นเมือง x ไฮลสไดน์ ฟรีเซียน อายุ 6-12 เดือน จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ประกอบด้วย 2 กลุ่ม : กลุ่มควบคุม 5 ตัวมีเพศผู้ 2 ตัว (เบอร์ 243, 251) และเพศเมีย 3 ตัว (เบอร์ 216, 237, และ 241) และกลุ่มทดลองที่จะถูกกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน [Testosterone-3-(o-carboxymethyl)oxime-human serum albumin, T4-HSA] มี 5 ตัวเพศผู้ 2 ตัว (เบอร์ 248, 254) และเพศเมีย 3 ตัว (เบอร์ 235, 240, และ 250)

แม่โคนมูกผสมพื้นเมือง x ไฮลสไดน์ สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟจำนวน 5 ตัวประกอบด้วยกลุ่มควบคุม 2 ตัว (เบอร์ 001 และ 109) และกลุ่มที่ถูกฉีดแอนติบอดีต่อ T4-HSA ที่ผลิตได้จากลูกวัว จำนวน 3 ตัว (เบอร์ 015, 175 และ Q2).

การเตรียมแอนติเจนต่อฮอร์โมนเพศทดสอบต่อโรนตามวิธีของ Erlanger *et al.*, (1957) โดยย่อดังนี้ ละลาย 200 มก. Testosterone, 200 มก. (O-Carboxymethyl) Hydroxylamide hydrochloride, 740 มก. Potassium acetate ใน 80 มล. 75 % 2-Propanol (Merk) จากนั้น reflux ที่อุณหภูมิ 100-110°ซ (ภาพที่ 1), นาน 3 ชม. ต่อมาเติม 500 มล. 3% NaHCO₃ แล้วสะกัดด้วย 500 มล. Ethyl acetate 2 ครั้ง จากนั้นระเหยชั้น Ethyl acetate ด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่ 37°ซ แล้วตกผลึกด้วย Acetone ได้ Testosterone-3-(O-Carboxymethyl) Oxime จากนั้นนำไปเชื่อม กับ Human Serum Albumin ดังนี้ : ละลาย 100 มก. Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime ใน 9 มล. Dimethyl formamide (Sigma D-4254) ค่อยมาเติมสารละลายที่มี 100 มก. 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-carbodiimide (Sigma H-4633) ในน้ำ 10 มล. ปั่นให้เข้ากันนาน 20 นาทีแล้วเติม 200 มก. Human

Serum Albumin fraction V (Sigma A-1653) ในน้ำ 10 มล. Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.8 ปั่นที่ 4°ซ, นาน 3 วัน ต่อมาย้ายสารละลายลงใน dialyze tubing ขนาดที่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12,000-14,000 ผ่าน ขนาดรู 20 µm, flat width 25 มม. (Membrane Filtration Product, Inc., USA; Part#1215-25) ใน 0.05M NaHCO₃ ที่ 4°ซ, นาน 1 วัน dialyze ต่อในน้ำกลั่นที่ 4°ซ, นาน 5 วัน ปั่นแยกตะกอน และส่วนของเหลวที่ 50,000 rpm ด้วย Microcentrifuge (Model Micro CENTRIFUGETTE 4214 A.L.C. International, S.r.l., Italy) แล้ว lyophilize ให้แห้งได้ Testosterone-3-(O-Carboxymethyl)Oxime-Human Serum Albumin หรือ T4-HSA สำหรับเป็นแอนติเจนกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเพศทดสอบต่อไป

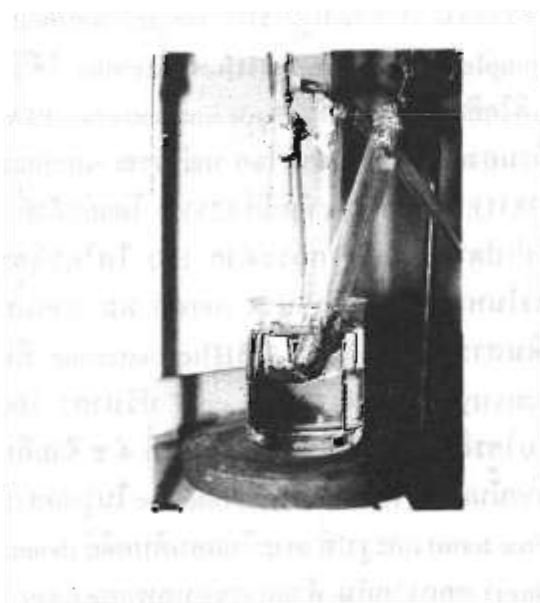


Figure 1 Depicted reflux of steroid with succinic anhydride and pyridin.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบแอคทีฟ (active Immunization)

ในกระต่าย การกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อทดสอบเตอร์โรนโดยใช้แอนติเจนชนิด T4-HSA 500 ไมโครกรัมโดยละลายในสารละลาย PBS 200 ไมโครลิตร และ Complete Freund's Adjuvant (Sigma, F5881, CFA) 200 ไมโครลิตร แล้วผสมส่วนน้ำและน้ำมันให้เข้ากันในรูปโฮโมจีไนซ์ (homogenized) ด้วยการฉีดไขว้ครั้งผ่านท่อสามทาง (3-way stopcock, Nipro Medical Industries Ltd., Japan) กลับไปกลับมา 50-60 ครั้ง (ภาพที่ 2) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุกๆ 2 สัปดาห์จนครบ 10 สัปดาห์ ระหว่างนั้นทำการเก็บเลือดจากใบหูประมาณ 5 มล. โดยเก็บในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Fluka, 03620) 100 ไมโครลิตรปั่นเลือดที่ 2700 รอบต่อนาที เพื่อเก็บส่วนพลาสมาสำหรับวิเคราะห์ แอนติบอดีไคเตอร์ (Antibody titer) ต่อฮอร์โมนทดสอบเตอร์โรน การวัดปฏิกิริยา antigen-antibody complex กับ [1,2,6,7-3H]testosterone ใช้วิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) ทำนองเดียวกับรายงานโดย มณีวรรณ และคณะ (2531); เพทาย และทัศนีย์ (2533) โดยย่อดังนี้ : ไปเปิดพลาสมาจากกระต่าย 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 100x11 มม. จากนั้นเติมสารละลาย [1,2,6,7-3H]testosterone ที่มี activity ประมาณ 7,000 cpm ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 4°ซ ข้ามคืน จากนั้นแยก [1,2,6,7-3H]testosterone ในรูปอิสระ (free form) และรูปที่ เกาะกับแอนติบอดี (bound form) ออกจากกัน ด้วยการจุ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำแข็งเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน (Dextran sodium sulfate 0.0625 ก., charcoal 0.625

ก. และน้ำกลั่น 100 มล.) 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที บรรจุหลอดลงตะกร้าใส่หลอดแก้ว นำเข้าเครื่องปั่นแยกที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 4°ซ ปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที จากนั้นแยกส่วนของเหลวลงในขวดที่ใช้สำหรับวัดพลังงานของรังสี เติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ (ประกอบด้วย : *p*-terphenyl, Sigma T1250, 3 ก.; 2,2-*p*-phenylene-bis-(5-phenyloxazole), Merk 7249, 0.1 ก. ใน toluene, Merk 8325, 1 ล.) ขวดละ 1 มล. ทิ้งไว้ในที่มืดข้ามคืน จากนั้นวัดรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีเบต้า (1209 RACKBETA) ค่าที่วัดได้เป็น activity ของ [1,2,6,7-3H] testosterone ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ แอนติบอดีจากพลาสมาของกระต่าย จากนั้น นำมาคำนวณค่า %binding จากสูตร :

$$\%binding = \frac{\text{bound activity (cpm)} \times 100}{\text{total activity (cpm)}}$$



Figure 2 A tree-way stopcock connected with 2 syringes for homogenization the mixture of antigen and Complete Freund's Adjuvant.

ในลูกโค การกระตุ้นครั้งแรก โคแต่ละตัวได้รับส่วนผสมของ T4-HSA 2 มิลลิกรัมละลายในสารละลาย PBS 500 ไมโครลิตร และ CFA 500 ไมโครลิตรแล้ว homogenized ให้เข้ากัน จากนั้นฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณข้างหัวไหล่ การกระตุ้นครั้งต่อมา โคแต่ละตัวได้รับส่วนผสมของ T4-HSA 1 มิลลิกรัมละลายใน PBS 500 ไมโครลิตร และ CFA 500 ไมโครลิตร แล้วโฮโมจิไนซ์ ให้เข้ากันฉีดเข้าใต้ผิวหนังเช่นเดียวกัน ระหว่างสัปดาห์ที่ 0 ถึง 6 ทำการกระตุ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการกระตุ้นทุกๆ 4 สัปดาห์ ทุกครั้งที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำการเก็บเลือดครั้งละ 2 มล. เพื่อตรวจค่าการเกาะระหว่างแอนติบอดีกับ [1,2,6,7-³H] Testosterone เช่นเดียวกับที่ทำในกระด่าย ถ้าพบว่ามีการเกาะติดมากกว่า 2,000 cpm ครั้งต่อไปจะเก็บเลือดโคตัวนั้น 200 มล.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟ (passive immunization) ในโคนมพื้นเมือง x โฮลสไตน์ จากการรวบรวมพลาสมาของลูกโคที่มีแอนติบอดีต่อต้าน T4-HSA ปริมาตร 515 มล. นำไปทำให้แห้งในสภาพแช่แข็งและแรงดันต่ำ (lyophilization) จากนั้นแบ่งแอนติบอดีออกเป็น 3 ส่วน แล้วละลายใหม่ด้วย PBS ส่วนละ 50 มล. นำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังให้กับแม่โค 3 ตัว ส่วนแม่โคกลุ่มควบคุม 2 ตัวได้รับพลาสมาที่เตรียมจากพลาสมาของวัวนมปกติ เตรียมจากพลาสมา 342 มล. ทำให้แห้งเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างบน แล้วเติม PBS 100 มล. แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

แผนการทดลอง และการเก็บตัวอย่าง

การวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งแม่โคนมลูกผสมเป็น 2 กลุ่มประกอบด้วยกลุ่มควบคุมที่ได้รับการฉีดพลาสมาของวัวนมปกติ และกลุ่มทดลองได้รับแอนติบอดีจากลูกโค การจัดสัตว์เข้าสู่กลุ่มการทดลองทำโดยการสุ่มแบบสมบูรณ์ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม 2 ครั้งต่อสัปดาห์ โดยทั่วไปเป็นทุกวันอังคารและพฤหัสบดี ด้วยหลอดโพลีโพรไพลีน (Polypropylene, Treff Lab, Switzerland) ขนาด 1.5 มล. ที่มีสารโปแตสเซียม ไดโครเมต (Potassium dichromate) 15 มก./หลอด เพื่อป้องกันการเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซซต่อไป

การวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนจากน้ำนม โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซซ

ตามวิธีที่รายงานโดย มณีวรรณ และคณะ (2531); เพฑาย และทัศนีย์ (2533)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวัดผลการเกาะติดของ Testosterone กับ Human Serum Albumin

คำนวณอัตราส่วนระหว่าง Testosterone กับ Human Serum Albumin ได้เท่ากับ 2.8:1 วิธีการคำนวณตามรายงานของ Erlanger *et al.* (1957), Dobson (1983) และศุภมิตร (2539) รายละเอียดการคำนวณแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Attachment of testosterone derivatives to Human Serum Albumin.

	T-3-HSA ^{1/}
Steroid-HSA, O.D.	0.5668
HSA, O.D.	0.0641
Difference	0.5027
Molar extinction of steroid-HSA conjugate	15360
Molecular weight of steroids	361.5
Molecular weight of HSA	70000
Concentration of Steroid-HSA, mole	3.27×10^{-45}
Concentration of Steroid-HSA, g/l	0.011831
Concentration of Steroid-HSA, g/l (weighing)	0.1625
Concentration of Steroid-HSA, mg/l (calculation)	11.83112
Concentration of HSA, mg/l	825
Concentration of HSA, mole	1.16×10^{-45}
Ratio of Steroid-HSA : HSA (calculation)	2.817312

^{1/} Testosterone-3(O-carboxymethyl)-Oxime-Human serum albumin

ผลการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ เทสทอสเตอโรน

ในกระต่าย การตอบสนองต่อ T4-HSA ของกระต่ายเบอร์ N104, N34 และ N85 หลังการกระตุ้น 2, 4, 6, 8, และ 10 สัปดาห์ วัดค่าการจับ [1,2,6,7-³H]testosterone ของแอนติบอดีได้ 1000-3000, 1200-3000, 2400-3500, 2800-3200 และ 2200-3400 cpm, ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานของ Witting *et al.* (1979), Younglai and Armstrong (1981) และ Versiere *et al.* (1984)

โดยเฉพาะ ผลงานของ Younglai and Armstrong (1981) ได้ชี้ให้เห็นว่าภายหลังการเกิดแอนติบอดีต่อเทสทอสเตอโรน หลังจากกระตุ้นด้วยเมียได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ มีการผลิตฮอร์โมน LH เพิ่มขึ้น และคอร์ปัส ลูเทียม (Corpus luteum) มีการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่ากลุ่มควบคุม เป็นหลักฐานแสดงว่าแอนติบอดีต่อเทสทอสเตอโรนในกระต่ายมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการหลั่ง LH จากต่อมใต้สมองทำให้คอร์ปัส ลูเทียมมีการตอบสนองในการทำงานเพิ่มขึ้น

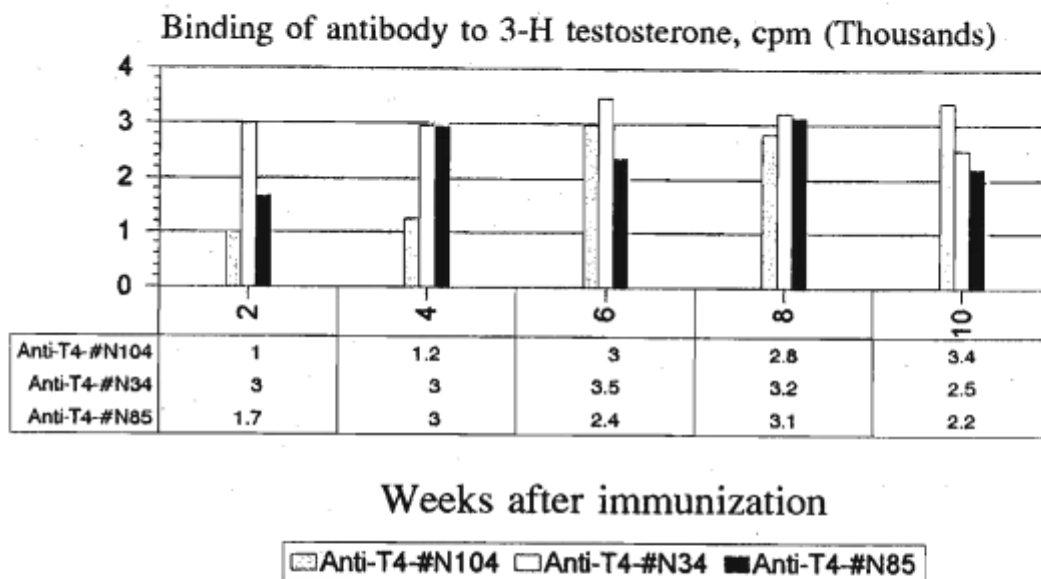


Figure 3 Measurement of antigen-antibody complex reaction between rabbit antibody to T4-HSA and tritiated testosterone.

ในลูกโค ลูกโคที่ถูกกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ T4-HSA (ภาพที่ 4) ให้แอนติบอดีเมื่อ 0, 2, 4, 6, และ 12 สัปดาห์ ที่สามารถจับกับ [1,2,6,7-3H]testosterone ได้ 4-5, 20-61, 43-62, 50-57 และ 30-46%, ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ค่า 4-6, 4-6, 3-4, 4-11 และ

4-5 % ตามลำดับ เป็นการยืนยันผลที่เกิดขึ้นกับกระต่าย ข้อมูลนี้ได้ชี้ให้เห็นแนวทางว่าในการทดสอบฤทธิ์ของแอนติเจนที่จะเกิดขึ้นกับตัวสัตว์ (*In vivo*) ขนาดใหญ่ เช่น โค สามารถทดสอบกับกระต่ายก่อนได้จะเป็นการประหยัดทั้งเวลาและทรัพยากร

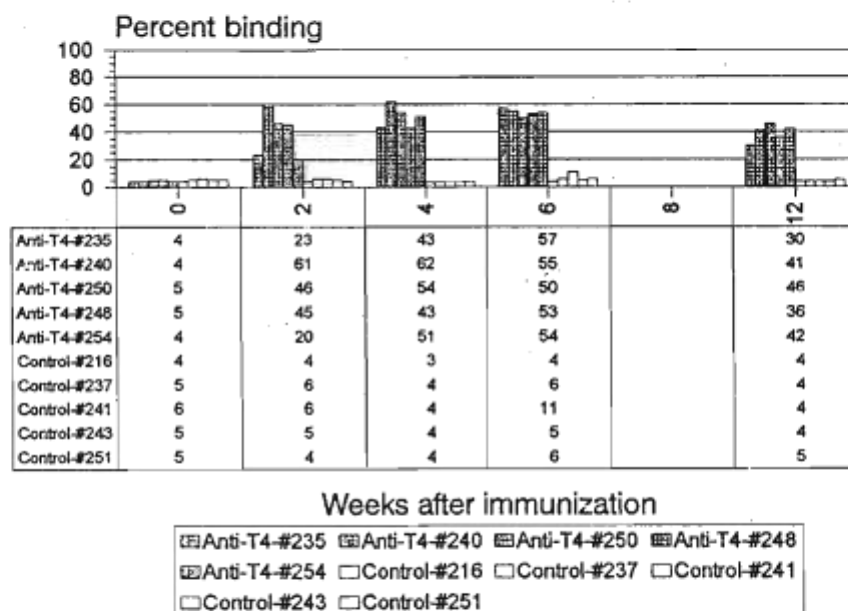


Figure 4 Measurement of antigen-antibody complex reaction between calve antibody to T4-HSA and tritiated testosterone.

ผลการกระตุ้นแบบพาสซีฟในแม่โค จากภาพที่ 5 แม่โคกลุ่มควบคุมเบอร์ 001 มีรอบการเป็นสัดชนิดรอบสั้น (11 วัน) ก่อนการทดลอง และรอบที่สองมีรอบการเป็นสัดประมาณ 22 วัน โคตัวที่สองเบอร์ 109 มีรอบการเป็นสัด 21, 21, และ 13 วัน หลังจากนั้นแม่โคเข้าสู่สภาพการตั้งท้อง ส่วนแม่โค กลุ่มถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เบอร์ 015 ภายหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1 รอบการเป็นสัดแม่โคเข้าสู่สภาพการตั้งท้องในทันที เช่นเดียวกับแม่โคเบอร์ 175 ส่วนแม่โคเบอร์ Q2 หลังจากการกระตุ้นมีรอบการเป็นสัดเกิดขึ้น 3 รอบมีความยาวรอบ 22, 16 และ 16 วันตามลำดับ แม่โคตั้งท้องในรอบที่ 4 ถึงแม่จะมีจำนวนสัตว์ทดลองน้อยเนื่องจากข้อจำกัดในการทดลองแต่

3/3 ของโคที่ได้รับภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อ เทสโทสเตอโรนมีรอบการเป็นสัดปกติ และเข้าสู่สภาพการตั้งท้องได้ทั้งหมด

ผลในทางบวกนี้ มีคำอธิบายจากงานทดลองของ Lermite *et al.* (1991) ที่ได้ให้ภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อเทสโทสเตอโรนกับแม่โคนมพันธุ์ Friesian x Holstein ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ พบว่าทำให้จำนวนคลื่นของ LH (pulsatile number) เพิ่มขึ้น และในทำนองเดียวกัน Lermite *et al.* (1993) พบว่าแม่โคนมที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำเมื่อได้รับภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อเทสโทสเตอโรนทำให้จำนวนคลื่นของ LH เพิ่มขึ้น จำนวนกระเปาะไข่ (Follicle)

ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มม. เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ Lermite *et al.* (1991) ได้เปรียบเทียบกับงานทดลองของ D' Occhio *et al.* (1988) ที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อสเดียรอยด์ฮอร์โมนชนิดโปรเจสโตเจน (Progestogen), เอสโตรเจน (Estrogen), และแอนโดรเจน (Androgen) โดยทดลองกับโคเพศเมียพบว่า ทำให้ระดับ LH เพิ่มขึ้น แสดงว่าการตอบสนองต่อแอนติบอดีที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นแบบจำเพาะเจาะจง เพราะเกิดจากการกระตุ้นจากสเดียรอยด์ต่างชนิดกัน และเป็นแอนติบอดีแบบ โพลีคลอนอล (Polyclonal antibody) งานของ Lermite *et al.* (1991) ได้ให้อีสตราไดออล (Estradiol-17 β)

แก่โคที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ พบว่าทำให้ค่าความเข้มข้นที่แนวกลางของเส้นกราฟ (baseline), ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย และจำนวนคลื่นของ LH ลดลง แสดงว่าอีสโตรเจนเป็นสเดียรอยด์ฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในการกวดการทำงานของไฮโปทาลามัส และต่อมาได้สมองทำให้การหลั่ง LH ลดลง ดังนั้น Lermite *et al.* (1991) จึงอธิบายกลไกการทำงานของแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ในการ กระตุ้นการหลั่ง LH ว่าอาจเป็นปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของสเดียรอยด์แอนติเจนต่างชนิดกัน แต่มีความสามารถจับกับอีสตราไดออลในเลือดได้เหมือนกัน เป็นผลทางอ้อมให้มีการหลั่ง LH เพิ่มขึ้น

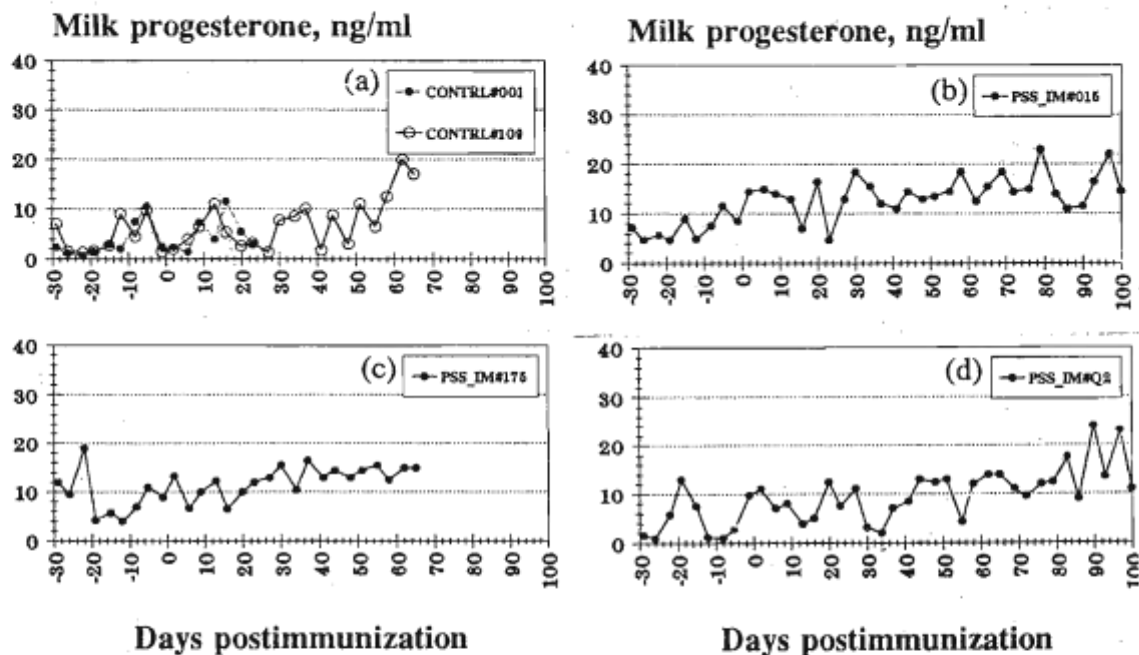


Figure 5 Effect of administration of calve antibody to T4-HSA on postpartum ovarian activity of Native x Holstein cows : (a) control group; (b), (c) and (d) were passively immunized cows.

โดยสรุปการทดลองครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟ โดยระบบผลิต แอนติบอดี ต่อเทสโทสเตอร์โรนจากลูกโค แล้วนำไปกระตุ้นให้แม่โคสามารถทำได้ และ ถ้ามีระบบการผลิตแอนติบอดี ได้มากพอควร ทำการทดลองในฝูง ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อวัดความคุ้ม ทางเศรษฐกิจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอนุตล สรวิสูตร ผู้อำนวยการศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่อำนวยความสะดวก ในการใช้สัตว์ทดลองของศูนย์ และสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุน การวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- มณีวรรณ กมลพัฒนะ, กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ และ โสภณ สรรเพชญ. 2531. การตรวจห้องโคนมระบบ บริการและผลงาน. ใน : บทบาทการตรวจ ห้องโคนมจากน้ำนม. หน้า 73-126. โรงพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- เพทาย พงษ์เพ็ญจันทร์ และ ทศนีย์ อภิชาติสร้างสุร. 2533. การประเมินประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของ โคนมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนโนเอสเซ. วารสารเกษตร 6(1):21-40.
- ศุภมิตร เมฆฉาย. 2539. ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโค และสุกร ภายหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โม นเทสโทสเตอร์โรน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Apichartsrungkoon, T. and P. Pongpiachan. 1990. Use of milk progesterone profile, for the study of fertility in the postpartum period of dairy cow. J. Agriculture 6(3):219-225.
- Dobson, H. 1983. A Radioimmunoassay Laboratory Handbook. Liverpool University Press, Liverpool.
- D' Occhio, M.J., D.R. Gifford, R.M. Hoskinson, T. Weatherly and B.P. Setchell. 1988. Gonadotrophin secretion and ovarian responses in prepubertal heifers actively immunized against androstenedione and oestradiol-17 β . J. Reprod. Fertil. 83:159-168.
- Erlanger, B.F., F. Borek, S.M. Beiser and S. Leiberman. 1957. Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem. 228:713-727.
- Lermite, V., J. Thimonier, R. Dufour and M. Terqui. 1991. Effect of the increase of steroid binding plasma levels after passive immunization against testosterone on the control of luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized underfed dairy heifers. Reprod. Nutr. Dev. 31(5):541-549.
- Lermite, V., L. Delaby, J. Thimonier, R. Dufour and N. Terqui. 1993. Effect of passive immunization against testosterone on reproductive hormone secretion and ovarian function in dairy cows and pubertal beef heifers. Theriogenology 39(2) : 507-526.
- Nieschlag, E., H.K. Usadel, H.K. Kley, U. Schwedes, K. Schoffling and H.L. Kruskemper. 1974. A new approach for investigating hypothalamo-pituitary-gonadal and adrenal feedback control mechanism : Active immunization with steroids. Acta Endocrinol. 76:556-569.

ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟด้วยฮอร์โมนเพศทดสอบต่อโรน ต่อการทำงาน
ของรังไข่หลังคลอดของแม่โคนมลูกผสม พื้นเมือง x ไฮลด์ไดน์

- Stoebel, D.P. and G.P. Moberg. 1979. Effect of ACTH and cortisol on estrus behavior and the luteinizing hormone surge in the cow. Fed. Proc. 38:1254.
- Versiere, G., M. Berger, Ch. Jean-Faucher, M. de Turchheim and Cl. Jean. 1984. Pituitary and gonadal function in pubertal and adult male rabbits with psuedohermaphrodisism secondary to immunization of mothers against testosterone. Acta Endocrinologica 107:550-555.
- Witing, Ch. E.J., E.J. Wickings and E. Nieschlag. 1979. Incidence of immune complex nephritis following active immunization with a testosterone-3-BSA conjugate or BSA alone. Acta Endocrinologica 90:562 - 567.
- Younglai, E.V. and B.W. Armstrong. 1981. Peripheral concentration of gonadotropins and progestins during pregnancy in rabbits after active immunization against testosterone. Fertility and Sterility 36(2) : 232-237.
- Zarrow, M.X., J.M. Yochim, J.L. McCarthy and R.C. Sanborn. 1964. Experimental Endocrinology : A Textbook of Basic Techniques. Academic Press, New York.