บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษา การเหนี่ยวนำให้ไก่เกิดภาวะ acute phase response โดยการทำให้เกิดลำไส้อักเสบโดยการติดเชื้อบิดพบว่า ไก่ที่ติดเชื้อแสดงอาการของการติดเชื้อบิดแต่ไม่รุนแรงจนถึงตาย แสดงอาการป่วย ท้องเสีย อุจาระปนเลือด และเมื่อผ่าซากพิสูจน์ พบรอยโรคของการติดเชื้อบิดที่ให้ เมื่อนำซีรัมที่เก็บจากไก่ทั้งสองกลุ่ม ก่อนและหลังการทดลอง นำมาตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับ TSP พบว่า ในไก่กลุ่มควบคุมและไก่ที่ติดเชื้อไม่มีการเปลี่ยนของระดับ TSP เนื่องจากร่างกายสัตว์พยายามที่จะรักษา homeostasis และ osmotic pressure ภายในกระแสเลือด ปัจจัยบางอย่างที่ส่งผลในการเพิ่มหรือลดระดับ TSP เช่น ปริมาณโปรตีนในอาหารที่กินเข้าไป ช่วงอายุของสัตว์ ไก่ในระยะให้ไข่จะมีระดับ TSP สูงกว่า ไก่ที่ยังไม่ให้ไข่ ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้ในการตรวจระดับของ APPs ในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง เราสามารถใช้ค่าของ TSP เป็นค่าอ้างอิงในตรวจวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงได้

ในไก่ Trf มีหน้าที่เป็นโปรตีนในการจับกับ iron เพื่อนำส่งให้กับเซลล์เป้าหมาย ซึ่งมีชื่อเรียกในชื่อ ovotransferrin (Otr) และ conalbumin เนื่องมาจากแหล่งที่พบ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า Trf มีขนาดโปรตีนใหญ่กว่า Otr เล็กน้อย ซึ่ง Otf กับ Trf มาจาก precursor protein เดียวกันและมี amino acid sequence เหมือนกัน แต่ต่างกันในส่วนของ glycosylation และ carbohydrate moiety (Thibodeau et al., 1978) และอวัยวะที่พบ (otr พบในไข่ขาว) ส่วนการตรวจระดับของ Trf ในซีรัมของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าในไก่ที่มีปัญหาลำไส้อักเสบมาจากการติดเชื้อบิดมีค่า Trf สูงขึ้นกว่าของไก่กลุ่มปรกติ ภายหลังจากการติดเชื้อไปแล้ว 7 วัน การเพิ่มขึ้นของ Trf ในซีรัมได้มีการศึกษากันพอสมควร พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ Trf ที่มากหรือน้อยยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อโรคด้วย การติดเชื้อ *Eimeria* spp แบคทีเรีย ไวรัส และภาวะการอักเสบรุนแรง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Trf ในซีรัม ส่วนปัญหา ภาวะความผิดปรกติของเมตาบอลิซึม เช่น Tibial dyschondroplasia pulmonary hypertension syndrome ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า Trf (Rath et al., 2009; Xie et al., 2002b)

การผลิตส่วน Alb ในสัตว์ปีกมีหน้าที่ในการขนส่ง Zinc ในกระแสเลือด (Stewart et al., 2003) ซึ่งโดยปรกติปริมาณของ Alb ในกระแสเลือดจะมีสูงถึง 50- 60% ของ TSP จากการทดลองครั้งนี้พบว่า Alb ในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อบิด มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับไก่กลุ่มปรกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Alb เป็น slow negative APP จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจระดับของ Alb ด้วยการใช้ชุดตรวจของ bromcresol

green dye binding (BCG) ในระยะแรกของการศึกษาเพราะเป็นวิธีที่มีใช้อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ พบว่าวิธีนี้วัดค่าได้ไม่แม่นยำต่อ Alb ของไก่ โดยการสังเกตพบว่าค่าที่วัดได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มของแถบโปรตีนของ Alb บน SDS-PAGE gel มีค่าไม่สอดคล้องกัน จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนวิธีตรวจด้วยการใช้ cellulose acetate gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอนและยุ่งยากกว่า แต่ให้ผลค่อนข้างแม่นยำและสอดคล้องกับความเข้มของแถบโปรตีน Alb บนแผ่นเจล เช่นเดียวกันกับการศึกษาการตรวจ Alb ในนกพิลาปโดยการใช้วิธี BCG ก็พบว่าวิธี BCG นั้นใช้ไม่ได้ผลในการ Alb ในซีรัมของนกพิลาบเช่นกัน (Lumeij et al., 1990) จากการตรวจหาระดับ Alb ในซีรัมไก่นี้ จะเห็นได้ว่า วิธีการตรวจที่ใช้กันเป็นปรกติสำหรับ ซีรัมคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อนำมาใช้ตรวจในสัตว์ปีก ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบวิธีการและผลที่ได้ ต้องหาวิธีมาตรฐานให้เหมาะสมต่อการตรวจตัวอย่างในสัตว์ปีกต่อไป

โปรตีน SAA ถูกจัดว่าเป็น biomarker ที่สำคัญหลักของการอักเสบหรือการติดเชื้อ ในสัตว์หลายชนิด (Hulten et al., 2003; Lannergard et al., 2003a; Lannergard et al., 2003b; Nielsen et al., 2004; Ogasawara et al., 2004; Sasaki et al., 2003; Sondergaard et al., 2004) วิธีการตรวจและชุดตรวจสำหรับ SAA เป็นที่ทราบกันดีว่าค่อนข้างยุ่งยากในการพัฒนาเพราะว่า โปรตีน AA และ SAA เป็นโปรตีนที่เป็น immunogens ต่ำ และวิธีการสกัด SAA ก็ยุ่งยากและได้ปริมาณน้อย ในการศึกษานี้ได้แนวทางเลือกในการผลิตโปรตีน SAA ให้ได้ปริมาณมากพอในการสร้างชุดตรวจ คือการผลิตโปรตีน recombinant ของ SAA (rchSAA) โดยการใช้เทคนิคพันธุวิศวะกรรม โดย *E. coli* ผลิต แล้วนำไปฉีดให้กระต่ายให้สร้าง anti-SAA antibodies ที่สามารถนำมาพัฒนาชุดตรวจต่อไป จากการตรวจด้วย Western blot analysis (รูปที่ 5) พบว่าในซีรัมของไก่ปรกติ ระดับของ SAA มีน้อยมากจนถึงตรวจไม่พบด้วยวิธีนี้ แต่ในไก่ที่ติดเชื้อพบ การเพิ่มขึ้นของ แถบโปรตีน SAA อย่างเด่นชัด (Heegaard et al., 2000; Jacobsen et al., 2005)

เป็นที่ทราบกันดีว่า ตับเป็นอวัยวะหลักที่สร้าง SAA ในสัตว์หลายชนิด แต่ก็มีรายงานพบการสร้างในอวัยวะอื่นๆ ด้วย (Ovelgönne et al., 2001; Upragarin et al., 2005b) ในกระแสโลหิต SAA จะเกาะติดรวมอยู่ในโมเลกุลของ HDL เมื่อร่างกายเกิดภาวะติดเชื้อหรืออักเสบ (Coetzee et al., 1986; Shephard et al., 1987) SAA มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน การขนส่งไขมัน เป็น chemotaxis และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (Badolato et al., 1994; Badolato et al., 2000; Hatanaka et al., 2004; Kumon et al., 2002; Liang et al., 1996; Liang and Sipe, 1995; Olsson et al., 1999; Ribeiro et al., 2003; Steinmetz et al., 1989; Syversen et al., 1994; Zimlichman et al., 1990) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีการแบ่งชนิดของ isotype ของ SAA ที่เป็น amyloidogenic SAA (Yamamoto and Migita, 1985) และนอกจากนี้ยังมี SAA ที่เป็น non-acute phase protein หรือเรียกว่า constitutive SAA (de Beer et al., 1994; Steel et al., 1996; Steel et al., 1993; Whitehead et al., 1992) แต่ในสัตว์ปีก (ไก่ เป็ด ห่าน) พบว่า SAA มียีนเพียงชุดเดียวและมี SAA เพียวชนิดเดียวที่เป็น acute phase SAA (Ericsson et al., 1987; Gorevic et al., 1977; Guo et al., 1996; Ovelgönne et al., 2001)

แถบโปรตีน ApoA-I มีขนาดประมาณ 28 kDa และอยู่ในกลุ่มของ negative APPs ในไก่ ApoA-I เป็นโปรตีนหลักที่ประกอบอยู่ในโมเลกุลของ high-density lipoprotein ApoA-I ของไก่จะมีโครงสร้างของกรดอะมิโนที่เหมือนกับ ApoA-I ของคนถึง 49% (Yang et al., 1987) ในไก่ ApoA-I จะสร้างมาจากเนื้อเยื่อทั่วไปของร่างกาย ซึ่งแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่จะจำกัดการผลิตมาจากตับและลำไส้เท่านั้น อาจเพราะว่า ในไก่ไม่มี apolipoprotein E (ApoE) ดังนั้น ApoA-I ของไก่จะทำหน้าที่เหมือน ApoA-I และ ApoE ร่วมกัน (Rajavashisth et al., 1987) ในส่วนของ antibodies ที่ผลิตมาจากการฉีด AA amyloid fibrils ของไก่ ที่ให้ผลบวกต่อแถบโปรตีน ApoA-I เพราะว่า ApoA-I เป็นองค์ประกอบร่วมกับ amyloid fibrils ซึ่งอาจมีบทบาทร่วมกันในการส่งเสริมการสะสม amyloid ในอวัยวะต่าง ๆ ของ สัตว์ปีก (Hermann et al., 1998) เช่นเดียวกันกับ ApoE ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีรายงานว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการสะสมโปรตีน amyloid ในอวัยวะต่าง ๆ (Kindy and Rader, 1998) ส่วนการผลิต antibodies จาก ApoA-I ไม่ได้ผลนั้นอาจเป็นเพราะว่าการตัดแถบโปรตีนของ ApoA-I จากแผ่นเจลนั้นมีปริมาณโปรตีนน้อย และ adjuvant ที่ใช้นั้นเป็น dl-α-tocopheryl acetate ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าสามารถฉีดเข้าตัวสัตว์ในปัจจุบันได้ ซึ่งจะก่อความเจ็บปวดต่ำ แต่ผลเสียคือจะให้ระดับ antibodies ที่ต่ำลงด้วยจึงทำให้ antibodiesที่ได้มีคุณภาพต่ำ ในการทดลองครั้งต่อไปควรเพิ่มปริมาณโปรตีน หรือเปลี่ยนวิธีสกัด ApoA-I เพื่อให้ได้โปรตีนมากขึ้น ส่วนการวัดระดับความเข้มข้นของ ApoA-I นั้น พบว่า ระดับแถบโปรตีน ApoA-I ลดลงมากจนไม่สามารถวัดความเข้มข้นได้

หลังจากการตรวจค่า TSP Trf และ Alb ที่ได้มาคำนวณหาค่า API จากสูตรที่กำหนดไว้เพื่อที่จะเพิ่มความแตกต่างผลของการเปลี่ยนแปลงของระดับ APPs ดังกล่าว และประเมินผลที่ได้ว่ามีแนวโน้มที่จะใช้สูตร API ที่กำหนดนี้ในการประเมินสุขภาพสัตว์ในระดับฝูง ในสภาวะปรกติของไก่ทดลองที่ 14 วัน และที่ 21 วัน พบว่า API มีค่าประมาณ 4 หน่วย แต่ในกลุ่มไก่ที่ติดเชื้อค่า API เพิ่มขึ้นถึง 8.44 หน่วย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด จากการศึกษาครั้งนี้พอจะเห็นแนวทางในการใช้ค่า API จากสูตรที่กำหนด สามารถนำไปปรับใช้ในการประเมินสุขภาพของฝูงสัตว์ปีกได้

5.2 สรุปผล

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาค่า Trf Alb SAA และ ApoaA-I ซึ่งเป็น APPs ที่สำคัญของไก่สายพันธุ์เนื้อ ที่มีการเลี้ยงอยู่ในอุตสาหกรรมไก่ในประเทศไทย ที่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการติดเชื้อบิด และได้ศึกษาค่า API มาบ่งชี้ สภาวะการติดเชื้อบิดในไก่เนื้อ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Trf มีค่าเพิ่มขึ้นภายหลังจากการติดเชื้อบิด ส่วน Alb และ ApoA-I มีค่าลดลง ส่วนการผลิต โปรตีน recombinant SAA โดยใช้เชื้อ E. coli สามารถนำไปใช้สร้าง antibodies ในกระต่ายและสามารถนำ anti-rchSAA antibodies มาใช้ตรวจ SAA ในซีรัมได้ ส่วน การนำค่า APPs ที่ได้มาคำนวณค่า API จากสูตรที่กำหนด พบว่าค่า API ของไก่ที่ติดเชื้อบิดมีค่าสูงขึ้นกว่า ของไก่ปรกติ

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ค่า APPs ที่นำมาศึกษานี้เมื่อคำนวณเป็นค่า API สามารถนำไปใช้ประเมินสุขภาพของฝูงไก่เนื้อได้ แต่การศึกษาในรายละเอียดของภาวะการติดเชื้อแต่ละชนิดยังต้องมีการศึกษาในอนาคตต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาค่า Trf ด้วยการตรวจแถบโปรตีน Trf จาก 15% SDS-PAGE เป็นวิธีที่ให้ผลดีแต่สามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละไม่เกิน 20 ตัวอย่าง และใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมงต่อการตรวจแต่ละครั้ง ซึ่งหากมีการนำไปใช้ในทางปฏิบัติ ควรต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจที่สามารถตรวจตัวอย่างได้คราวละหลายตัวอย่าง ในเบื้องต้น ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิค ELISA พบว่าระดับ Trf ในตัวอย่างซีรัมมีปริมาณสูง (ระดับมากกว่า มิลลิกรัม/ ml) ทำให้เป็นอุปสรรคในการเจือจางตัวอย่าง ซึ่งจะต้องหาแนวทางต่อไป

ส่วนการตรวจระดับ Alb พบว่าการตรวจด้วย cellulose acetate gel electrophoresis ให้ผลที่แม่นยำต่อตัวอย่างซีรัมสัตว์ปีก แต่มีข้อเสียคือ ต้นทุนในการตรวจมีค่าสูง (ประมาณ 150 บาทต่อตัวอย่าง) ดังนั้นควรหาวิธีอื่นที่สามารถลดต้นทุนในการตรวจต่อไป

การตรวจ SAA นั้น ในส่วนของการบ่งชี้ว่าในซีรัมมีระดับ SAA เพิ่มขึ้นหรือไม่ ไม่เป็นปัญหา เพราะ rchSAA anti-SAA ที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้ได้ดี แต่จะตรวจตัวอย่างได้ครั้งละไม่เกิน 20 ตัวอย่าง และใช้เวลา 2 วันในการตรวจ เพราะวิธีการตรวจต้องใช้ SDS-urea-PAGE ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่ตรวจได้และค่อนข้างกินเวลาและต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของผู้ตรวจ รวมทั้งต้นทุนในการตรวจยังสูงอยู่ ในเบื้องต้น ผู้วิจัยได้พัฒนาชุดตรวจ ELISA ไว้ แต่ผลในการตรวจยังไม่แน่นอน ยังต้องมีการปรับเทคนิคพอสมควร แต่ถ้าชุดตรวจนี้ผลิตได้ดี จะมีประโยชน์ต่อการวิจัยอย่างสูง

สำหรับการตรวจ ApoA-I นั้น ถ้าตรวจจากแถบโปรตีน ก็จะไม่มีปัญหาเช่นกัน แต่ถ้าต้องการตรวจตัวอย่างครั้งละปริมาณมากควรจะต้องพัฒนาวิธีการตรวจต่อไป ในเบื้องต้นควรต้องมีการพัฒนา anti-ApoA-I antibodies เพื่อในการพัฒนาเทคนิคอื่น ๆ ต่อไป

สุดท้าย สูตรคำนวณ ค่า API ที่กำหนดขึ้นเองในการศึกษาครั้งนี้พบว่า มีแนวโน้วในการนำไปใช้ดีมาก