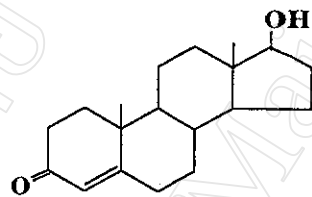


บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 บทบาทของฮอร์โมนเพศทดสอบโรนในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

ฮอร์โมนเพศทดสอบโรน (Testosterone) ชื่อทางเคมีคือ 17β -Hydroxyandrost-4-en-3-one, Δ^4 -androst-17 β -ol-3-one มีสูตรโครงสร้างทางเคมี $C_{19}H_{28}O_2$ (Kutsky, 1973; Budavari et al., 1989) จัดอยู่ในกลุ่มของฮอร์โมนแอนโดรเจน (Androgen) ซึ่งเป็นสารประเภทสเตียรอยด์ (Steroid) ที่มีคาร์บอน 19 ตัว (C_{19}) มี Ketone group และ Hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-17 ตามลำดับ โดยมีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 1.



ภาพที่ 1. แสดงโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนเพศทดสอบโรน

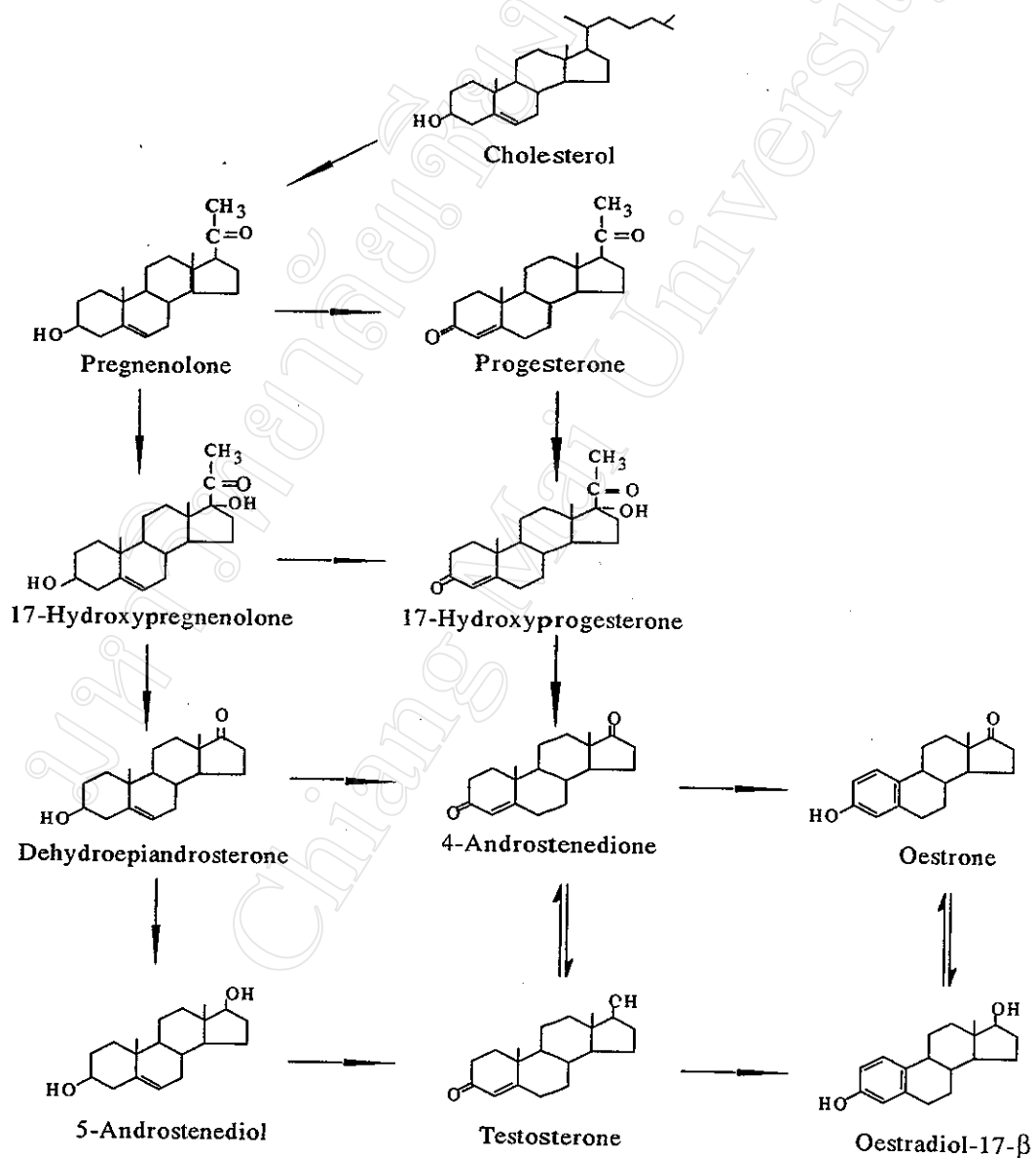
คุณสมบัติทางเคมี

- (1) มวลโมเลกุล 288.41
- (2) จุดหลอมเหลว (Melting point) 155°C (องศาเซลเซียส)
- (3) ละลายในสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ (Alcohol), อีเทอร์ (Ether)
- (4) ดูดกลืนแสง Ultraviolet (UV) สูงสุด 238 นาโนเมตร (nm)

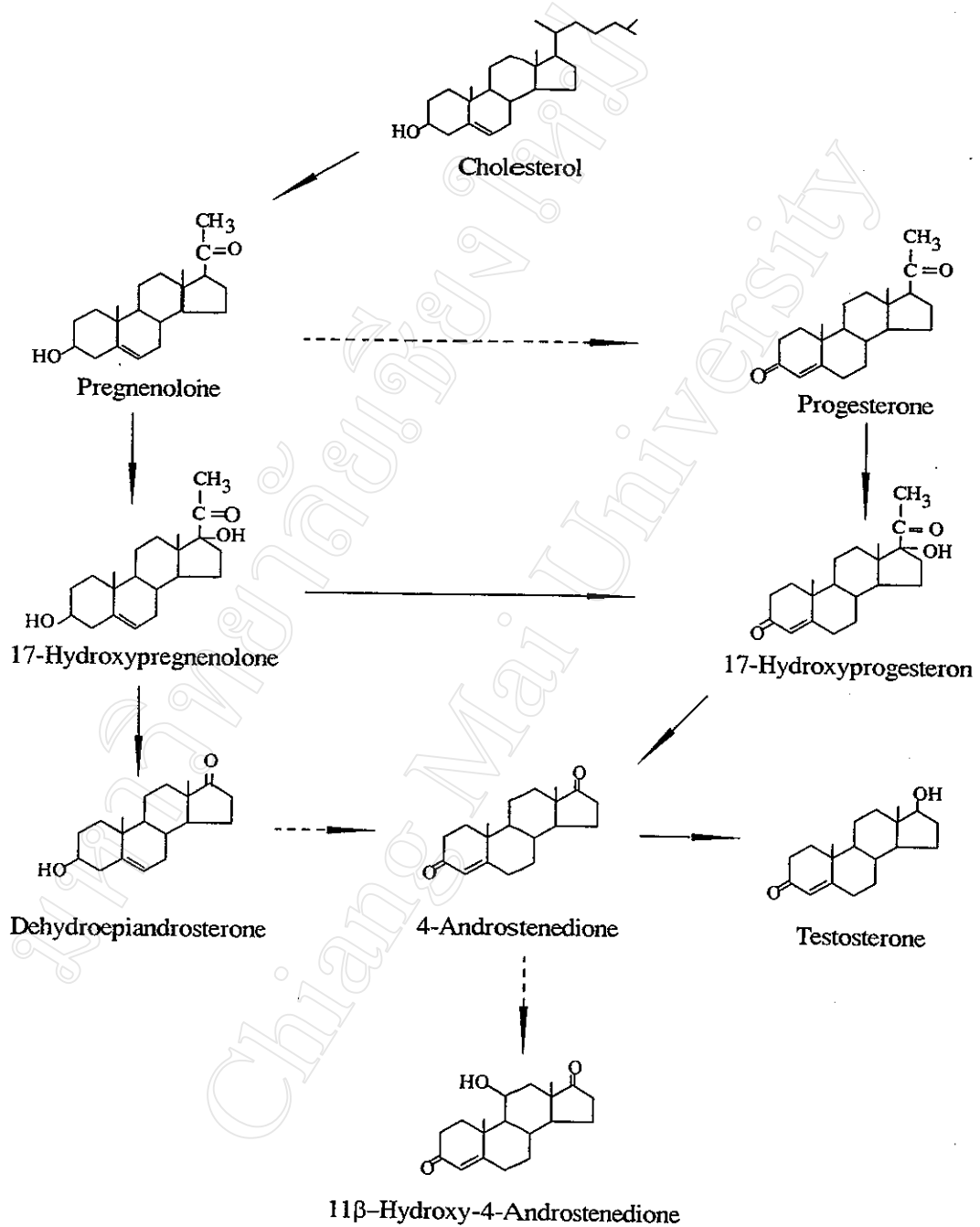
2.1.1. แหล่งสังเคราะห์ฮอร์โมนแอนโดรเจน (Biosynthesis of androgens) ในเพศเมีย

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนแอนโดรเจนจากรังไข่ และต่อมหมวกไต โดยในรังไข่ แอนโดรเจนจะผลิตจากกระเปาะไข่ ในรังไข่ของโค ม้า (Hansel and Fortune, 1977) แกะ (Baird et al., 1968; Baird, 1977) และสุกร (Tsang et al., 1985) ซึ่งมีขั้นตอนการ

สังเคราะห์ ดังภาพที่ 2. คล้ายกับในอวัยวะของเพศผู้ (Vermeulen, 1979). ส่วนที่ต่อมหมวกไต แอนโดรเจนจะผลิตจากบริเวณ Zona reticularis ซึ่งมีขั้นตอนการสังเคราะห์ ดังภาพที่ 3. (Vermeulen, 1979).



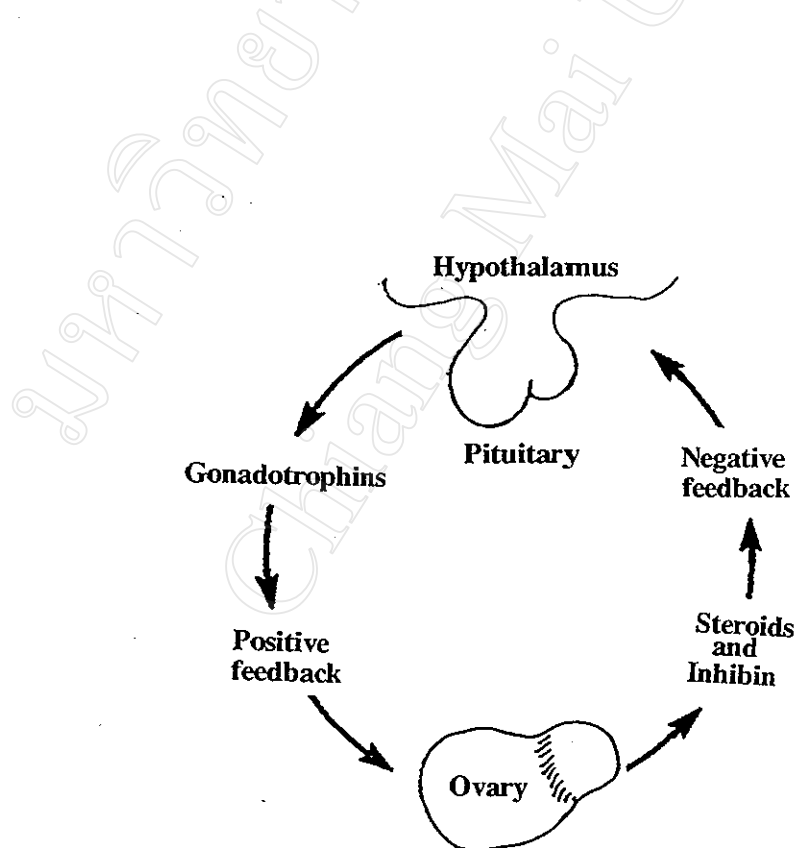
ภาพที่ 2. ขั้นตอนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่
(ที่มา : Gower and Fotherby, 1975).



ภาพที่ 3. ขั้นตอนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในต่อมหมวกไต,
 — วิธีหลัก (Major pathway); - - - วิธีรอง (Minor pathway)
 (ที่มา : Gower and Fotherby, 1975).

2.1.2. ฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศทดสอบเตอร์โรนในสัตว์เพศเมีย

ฮอร์โมนเพศทดสอบเตอร์โรน มีฤทธิ์ทั้งกระตุ้น และยับยั้งการทำงานของรังไข่ ทั้งทางตรง และทางอ้อม กล่าวคือ เทสทดสอบเตอร์โรน เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) ในรังไข่ (Baird *et al.*, 1968) ดังภาพที่ 2. ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ทีคา อินเตอร์นา (Theca interna) และกรานูโลซา (Granulosa cells) ในกระเปาะไข่ (Leung and Armstrong, 1980) และเอสโตรเจนมีฤทธิ์กดการทำงาน (Negative feedback) ของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotrophin) ที่ต่อมใต้สมอง (Pituitary gland) ในโคที่อยู่ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Prepuberty) (Day *et al.*, 1984) และช่วงที่ไม่มีรอบการเป็นสัดหลังคลอด (Postpartum anestrous) (Acosta *et al.*, 1983) ดังภาพที่ 4. แอนโดรเจนอาจมีฤทธิ์ไปเปลี่ยนแปลงกลไกของเอสโตรเจน ในการควบคุมการหลั่งโกนาโดโทรปิน (Martensz, 1980).



ภาพที่ 4. ความสัมพันธ์ของสเต็มรอยด์ ที่มีผล Negative feedback ต่อต่อมใต้สมอง (ที่มา : Webb *et al.*, 1984).

มีรายงานว่าฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัด (Oestrus) (Lindsay and Robinson, 1961), กระตุ้นการหลั่งลูทีไนซิงฮอร์โมน (Lutenizing hormone, LH) (Pant, 1977; Clarke and Scaramuzzi, 1978), ฟอลลิเคิล สติมูเลตติ้ง ฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone, FSH) และการตกไข่ (Ovulation) (Radford and Wallace, 1971) ในแกะได้ ตรงกันข้ามกับในโค และม้า เทสโทสเตอโรน มีฤทธิ์กดการหลั่ง LH (Thompson *et al.*, 1984) แต่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง FSH ในม้า แต่ไม่มีผลกับโค (Thompson *et al.*, 1984). นอกจากนี้เทสโทสเตอโรน สามารถกระตุ้นการผลิตฮอร์โมนอินฮิบิน (Inhibin) (Henderson and Franchimont, 1983) ซึ่งเป็นฮอร์โมนประเภทโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์กรานูโลซา (Granulosa cells) ในกระเปาะไข่ (Henderson and Franchimont, 1981) มีฤทธิ์กดการหลั่ง FSH แต่ไม่มีผลต่อ LH ดังรายงานในแกะ (Cummins *et al.*, 1983) และโค (Ireland *et al.*, 1983) และยับยั้งการเจริญของกระเปาะไข่ในแกะ และโค (Miller *et al.*, 1979) ดังนั้นฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน จึงมีฤทธิ์กดการทำงานของรังไข่ โดยทางอ้อม.

การศึกษาเกี่ยวกับผลของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่มีต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ที่ทดลองในสัตว์ (In vivo) โดยศึกษาผลจากการเพิ่มระดับฮอร์โมน โดยตรงที่มีต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ดังรายงานในหนู ที่ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ (Immature rats) (Payne and Runser, 1958), แกะ (Radford and Wallace, 1971), โค (Thompson *et al.*, 1984), ม้า (Thompson *et al.*, 1984) และสุกรสาว (Torres and First, 1974) หรือศึกษาจากการควบคุมปริมาณฮอร์โมนที่มีอยู่ในร่างกาย โดยใช้ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ด้วยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ทั้งแบบแอคทีฟอิมมูไนเซชัน (Active immunization) และแบบพาสซีฟอิมมูไนเซชัน (Passive immunization) ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย และเพศผู้ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป.

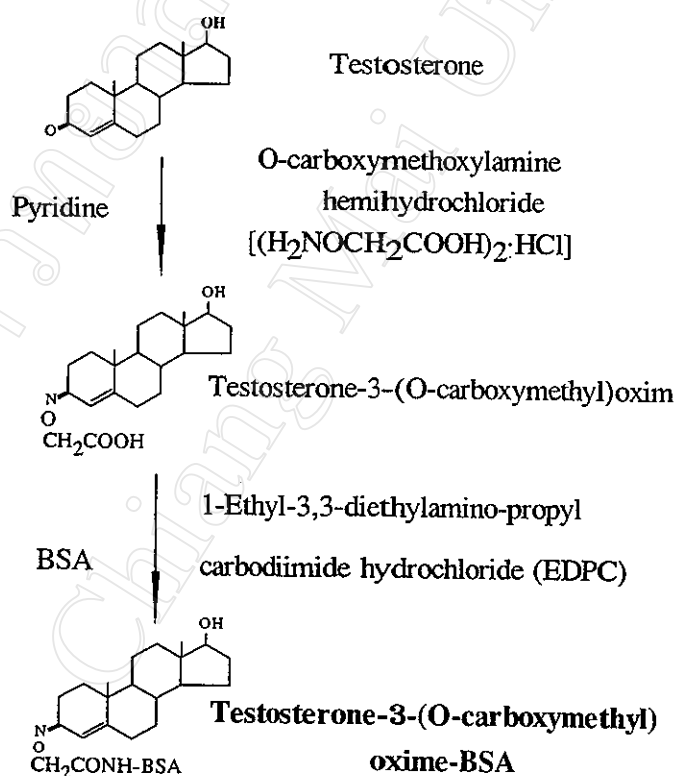
2.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเพศทดสอบในสัตว์

เนื่องจากฮอร์โมนเพศทดสอบมีมวลโมเลกุล 288.41 เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจัดเป็นสารประเภทเฮพเทน (Hapten) ที่มีคุณสมบัติ Immunogenicity ต่ำมาก โดยร่างกายสัตว์จะไม่ถือว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม (Reeves *et al.*, 1989) ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Kellie, 1975) แต่ถ้าเชื่อม (Conjugate) โมเลกุลของฮอร์โมนเข้ากับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่เรียกว่าตัวนำ (Carrier) เช่น Human serum albumin (HSA), Bovine serum albumin (BSA), Equine serum albumin (ESA), Keyhole limpet haemocyanin (KLH), Ovalbumin (Oval), Tetanus toxoid (TT) เป็นต้น (Midgley and Niswender, 1970; Thompson *et al.*, 1985; Meloen, 1995) จะทำให้ฮอร์โมนเพศทดสอบ มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunogen) หรือแอนติเจน (Antigen) ได้ ก็สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสัตว์สร้างแอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะ (Specific) กับฮอร์โมนเพศทดสอบ (Bosch *et al.*, 1974).

2.2.1. การเตรียมแอนติเจน

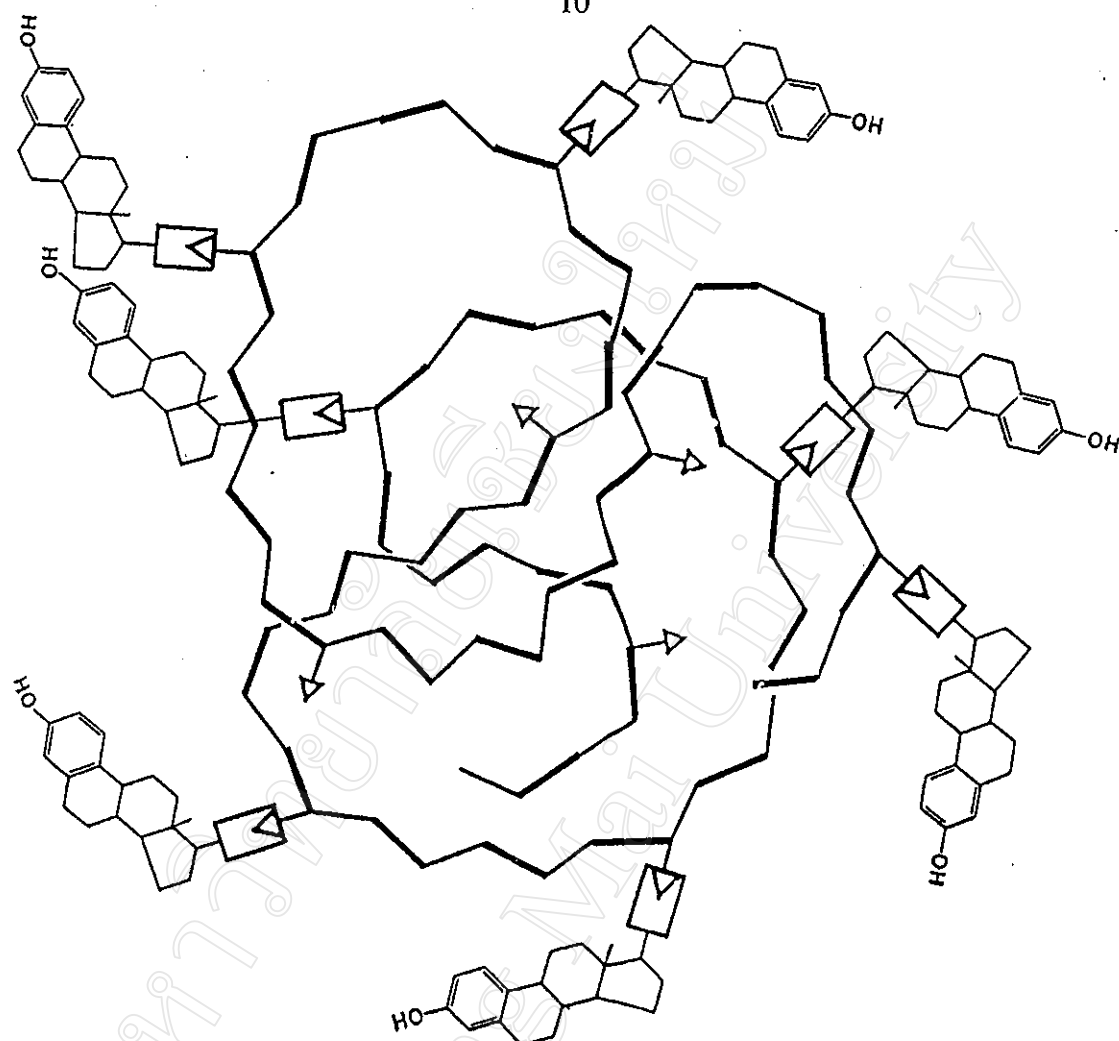
การเตรียมแอนติเจนจากสารประเภทสเตียรอยด์ โดยการเชื่อมโมเลกุลสเตียรอยด์เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน ตามวิธีการของ Erlanger *et al.* (1957, 1959, 1967) แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกเปลี่ยน Functional group ของสเตียรอยด์ เช่น Hydroxyl หรือ Ketone group ให้เป็น Carboxylic acid group ในกรณีการดัดแปลงสเตียรอยด์ฮอร์โมน ที่ตำแหน่ง Hydroxyl group อาศัยปฏิกิริยาของ Succinic anhydride จะได้อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ในรูป Hemisuccinate หรืออาศัยปฏิกิริยาของ Phosgene อนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ได้ จะอยู่ในรูป Chlorocarbonate หรือ Chloroformate ส่วน Ketone group จะอาศัยปฏิกิริยา (O-carboxymethyl) hydroxylamine จะได้ Carboxyl group อยู่ในรูป (O-carboxymethyl) oxime ดังตารางที่ 1. ในขั้นตอนที่สอง เป็นการเชื่อมอนุพันธ์ของสเตียรอยด์เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน โดยอาศัยปฏิกิริยา Schotten-Baumann สำหรับอนุพันธ์ Chlorocarbonates ส่วนอนุพันธ์ Carboxylic (Hemisuccinate และ Oxime derivatives) อาศัยปฏิกิริยา Mixed anhydride ซึ่งปฏิกิริยาทั้งสองจะใช้ Isobutyl chlorocarbonate (Erlanger *et al.*, 1957) หรือ Carbodiimide [1-Ethyl-3-(3-

dimethylamino-propyl)-carbodiimide hydrochloride] (Abraham and Grover, 1971; Lindner *et al.*, 1972; Weinstein *et al.*, 1972) เป็นตัวเชื่อม Chlorocarbonates หรือ Carboxylic group เข้ากับ ϵ -amino group ของ Lysine ในโมเลกุลของโปรตีน ด้วยพันธะเอไมด์ (Amind bond) ดังภาพที่ 5 (Lieberman *et al.*, 1959; Midgley and Niswender, 1970; Abraham and Grover, 1971; Condom and Emiliozzi, 1974; Kellie, 1975; Butt, 1976) ซึ่งมีโครงสร้างของสเตียรอยด์ หลังเชื่อมกับโมเลกุลของโปรตีน แสดงดังภาพที่ 6. แอนติเจนที่ได้ นำไปทำให้บริสุทธิ์ (Dialysis) และทำให้แห้งที่สภาวะบรรยากาศต่ำ (Lyophilization).



ภาพที่ 5. ขั้นตอนการเชื่อมสเตียรอยด์ เข้ากับ โมเลกุลของโปรตีน (Testosterone-3-BSA)

(ที่มา : Abraham and Grover, 1971; Kellie, 1975; Butt, 1976).



ภาพที่ 6. โครงสร้างของสเตียรอยด์หลังเชื่อมกับโมเลกุลของโปรตีน (ที่มา : Kellie, 1975).

นอกจากนี้มียางงานการเตรียมแอนติเจนจากสเตียรอยด์ โดยเชื่อมอนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ไม่ใช่ตำแหน่ง Functional group เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน อาทิเช่น Testosterone (Weinstein *et al.*, 1972; Tyler *et al.*, 1973; Bosch *et al.*, 1974; Miyaka *et al.*, 1990), Androstenedione (Besch *et al.*, 1986; Weinstein *et al.*, 1972), Estradiol (Dean *et al.*, 1971; Lindner *et al.*, 1972; Walker *et al.*, 1973), Estriol (Lindner *et al.*, 1972), Progesterone (Lindner *et al.*, 1972; Killie, 1975) ดังตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. แสดงตำแหน่งการเชื่อมสเตียรอยด์ เข้ากับโมเลกุลของโปรตีน.

สเตียรอยด์	ตำแหน่ง ที่เชื่อม	อนุพันธ์	แหล่งข้อมูล
Functional group			
Testosterone	3	Testosterone-3-(O-carboxymethyl)oxime	Erlanger <i>et al.</i> , 1957,1959, 1967
Testosterone	17	Testosterone 17- chlorocarbonate	Lieberman <i>et al.</i> , 1959
Testosterone	17	Testosterone 17- hemisuccinate	Bosch <i>et al.</i> , 1959
Estrone	17	Estrone 17-(O-carboxymethyl)oxime	Erlanger <i>et al.</i> , 1967
Progesterone	3	Progesterone 3-(O-carboxymethyl)oxime	Killie, 1975
Progesterone	20	Progesterone 20-(O-carboxymethyl) oxime	Erlanger <i>et al.</i> , 1967
Pregnenolone	20	Pregnenolone 20-(O-carboxymethyl) oxime	Erlanger <i>et al.</i> , 1967
Nonfunctional group			
Testosterone	7	Testosterone-7 α -carboxymethyl- thioether	Weinstein <i>et al.</i> , 1972
Testosterone	6	Testosterone-6 β -carboxymethyl	Tyler <i>et al.</i> , 1973
Testosterone	11	Testosterone-11-hemisuccinate	Bosch <i>et al.</i> , 1974
Testosterone	15	15 α -Carboxymethyltestosterone	Miyaka <i>et al.</i> , 1990
Testosterone	15	15 β -Carboxymethyltestosterone	Miyaka <i>et al.</i> , 1990
Androstenedione	7	Androstenedione 7 α -carboxymethyl thioether	Weinstein <i>et al.</i> , 1972
Androstenedione	11	Androstenedione 11 α -hemisuccinate	Besch <i>et al.</i> , 1986
Estradiol	6	Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime	Dean <i>et al.</i> , 1971
Estradiol	6	Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime	Lindner <i>et al.</i> , 1972
Estradiol	6	Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime	Walker <i>et al.</i> , 1973
Estriol	6	Estriol 6-(O-carboxymethyl)oxime	Lindner <i>et al.</i> , 1972
Progesterone	6	Progesterone 6-(Carboxymethyl) thioether	Lindner <i>et al.</i> , 1972
Progesterone	11	Progesterone 11 β -(carboxymethyl)oxime	Killie, 1975

2.2.2 วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อสเตียรอยด์ฮอร์โมน เพื่อให้เกิดแอนติบอดี ที่จะไปเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของฮอร์โมนในร่างกายสัตว์ แอนติบอดีอาจให้กับสัตว์โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟ หรือแอคทีฟอิมมูนไนเซชัน. พาสซีฟอิมมูนไนเซชัน เป็นการให้แอนติบอดีโดยตรงกับสัตว์ แอนติบอดีนั้น ได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน ในสัตว์ตัวอื่นๆ อาจเป็น Species เดียวกัน (Martensz and Everitt, 1982; Pathiraja *et al.*, 1984; Rhind *et al.*, 1985; 1986; 1987; Lermite *et al.*, 1991; 1993) หรือต่าง Species กัน (Neri *et al.*, 1964; Webb *et al.*, 1984) ส่วนแอคทีฟอิมมูนไนเซชัน คือการให้แอนติเจนในรูปของวัคซีน (Vaccine) กับสัตว์โดยตรง เพื่อให้ร่างกายสัตว์สร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ด้วยตัวเอง (Pell and Aston, 1995).

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบแอคทีฟอิมมูนไนเซชันที่ใช้ฮอร์โมนเชื่อมกับโปรตีน (Hormone-protein conjugate) เป็นแอนติเจน ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำ (Weak immunogen) ถ้าฉีดให้สัตว์โดยตรง ในเวลาไม่นานร่างกายสัตว์จะยอมรับว่าเป็นสารชนิดเดียวกับในร่างกาย (Endogenous substance) จำเป็นต้องให้แอนติเจนในปริมาณที่เหมาะสม (ตารางที่ 2.) ร่วมกับสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน (Immunostimulation) หรือแอดจูแวน (Adjuvant) และมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ (Booster immunization) เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองได้ดีขึ้น (Roberts *et al.*, 1990).

Alexander and Brewer (1995) ได้แบ่งสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน หรือแอดจูแวน ออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามคุณสมบัติทางกายภาพ คือ Surfactant adjuvant, Vesicle adjuvant และ Water soluble adjuvant ซึ่งแต่ละกลุ่ม สามารถแบ่งย่อยได้ ดังตารางที่ 3. Robert *et al.* (1990) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอดจูแวนในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ในโคสาว (Heifers) จำนวน 9 ชนิด คือ Saponin, Propylene glycol, Trehalose dimycolate ผสม Mono-phosphoryl lipid A [อีมีลซิไฟด์ (Emulsified) กับ Mineral oil 63% ซึ่งผสม Montanide 3 %],

ตารางที่ 2. แสดงปริมาณแอนติเจน ชนิดของแอดจูแวน และระยะเวลาที่กระตุ้นซ้ำ สำหรับ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อออร์โมนเพศ เอสโตรเจนแบบแอคทีฟ อิมมูนในเซชัน ในสัตว์ชนิดต่างๆ.

สัตว์	แอนติเจน	ปริมาณ/ครั้ง	แอดจูแวน	ฉีดแบบ	กระตุ้นซ้ำ	แหล่งข้อมูล
กระต่าย	T-3-BSA	100 มก.	CFA	S.C./I.M	ทุก 14 วัน	Armstrong <i>et al.</i> , 1978
กระต่าย	T-3-BSA	0.2 -1 มก.	CFA	S.C.	ทุก 1 เดือน	Thornycroft <i>et al.</i> , 1975
กระต่าย	T-3-albumin	100 มก.	CFA	S.C.	-	Nieschlag <i>et al.</i> , 1973
กระต่าย	T-3-KLH	50 มก.	M. tuberculosis	S.C.	-	Nieschlag <i>et al.</i> , 1973
กระต่าย	T-3-BSA	250 มก.	CFA	-	ทุก 14 วัน	Bosch <i>et al.</i> , 1974.
กระต่าย	T-3-BSA	75 มก.	B. pertusis	I.D.	-	Vaitukaitis <i>et al.</i> , 1971.
กระต่าย	T-3-KLH	100 มก.	B. pertusis	I.D.	-	Vaitukaitis <i>et al.</i> , 1971.
กระต่าย	T-15-BSA	1 มก.	CFA	S.C.	ทุก 1 เดือน	Miyake <i>et al.</i> , 1990.
หนู	T-3-BSA	100 มก.	-	-	ทุก 1 เดือน	Hillier <i>et al.</i> , 1974
หนู	T-3-BSA	150 มก.	CFA	S.C.	ทุก 1 เดือน	Bourtourault <i>et al.</i> , 1974
แกะ	T-3-BSA	1 มก.	CFA	S.C.	ทุก 14 วัน	Neri <i>et al.</i> , 1964
แกะ	T-3-BSA	2 มก.	CFA	-	2 ครั้ง	Martensz <i>et al.</i> , 1979
แกะ	T-3-BSA	2 มก.	CFA	-	0.7 มก.-2 ครั้ง	Scaramuzzi <i>et al.</i> , 1981
แกะ	T-3-HSA	1.1-1.5 มก.	IFA/ DEAE-dextran	S.C.	-	Cox <i>et al.</i> , 1982
แกะ	T-3-BSA	200 มก.	CFA/Pertussis	S.C.	ทุก 6 สัปดาห์	Schanbacher <i>et al.</i> , 1982
โค	T-3-Oval	8 มก.	IFA	I.M.	ทุกเดือน-2 ครั้ง	Price <i>et al.</i> , 1987
โค	T-17-HSA	15 มก.	CFA	S.C.	ทุกเดือน- 5 ครั้ง	Walker <i>et al.</i> , 1984
โค	T-3-BSA	-	CFA	I.D.	-	Lermite <i>et al.</i> , 1991
กระบือ	T-3-HSA	5 มก.	DEAE-dextran	S.C.	ทุกเดือน- 3 ครั้ง	Kamonpatana <i>et al.</i> , 1985
สุกร	T-3-ESA	10 มก.	CFA	I.M.	ทุกเดือน - 5 ครั้ง	Thompson <i>et al.</i> , 1985
ลิง	T-3-BSA	1 มก.	CFA	S.C.	ทุก 14 วัน-4 ครั้ง	Martensz and Everitt, 1982

T-3-BSA = Testosterone-3-Bovine serum albumin; HSA = Human serum albumin; ESA=Equine serum albumin; Ova I= Ovalbumin; KLH = Keyhole limpet hemocyanin; CFA= Complete Freund's adjuvant; IFA = Incomplete Freund's adjuvant; S.C. = Subcutaneous; I.M. = Intramuscular; I.D. = Intradermal; DEAE = diethylaminoethyl.

ตารางที่ 3. แสดงแอดจูแวน ชนิดต่างๆ จำแนกตามลักษณะทางกายภาพ.

1. Surfactant adjuvant

1.1 Inorganic surfactants : Aluminium hydroxide; Aluminium salts; Beryllium

1.2 Natural organic surfactants (and derivatives) : Trehalose dimycolate (TDM); Lipid A (LPS);
Saponin (Quil A, QS21); Retinoic acid; Vitamin E

1.3 Synthetic organic surfactants

- Cationic aliphatic nitrogenous bases : Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA)
- Non ionic surfactants : Block polymer surfactants (Pluronic[®], Tetronics[®]); Sorbitan trioleat (Span 85[®]); Polyethylene-glycolglycerol ricinoleate (Cremophor EL); Fatty acid esters
- Lipopeptide and lipid conjugated proteins
- Sulpholipopolysaccharides (SLPs)

2. Vesicle adjuvants

2.1 Water in oil emulsions : Complete/Incomplete Freund's adjuvant (CFA/FIA)

2.2 Oil in water emulsions : RIBI adjuvant system (RAS); Syntex adjuvant formulation (SAF);
Lipovant; Intralipid

2.3 Liposome

2.4 Immunostimulating complexes (ISCOM's)

2.5 Other particulate systems : Non-ionic surfactant vesicles (NISV); Nanoparticles; Microparticle;
Proteosome; Virus-like particles; Gamma inulin; Bentonite;
Dextran sulphates; Diethylaminoethyl (DEAE) dextran; Carbopols;
Solid matrix antibody-antigen (SMAA) complexes

3. Water soluble adjuvant and derivatives

3.1 Muramyl dipeptides

3.2 Cholera toxins

3.3 Cytokines : Interleukin 1 (IL-1); Interleukin 2 (IL-2); Interferon γ (IFN γ); Interleukin12 (IL-12)

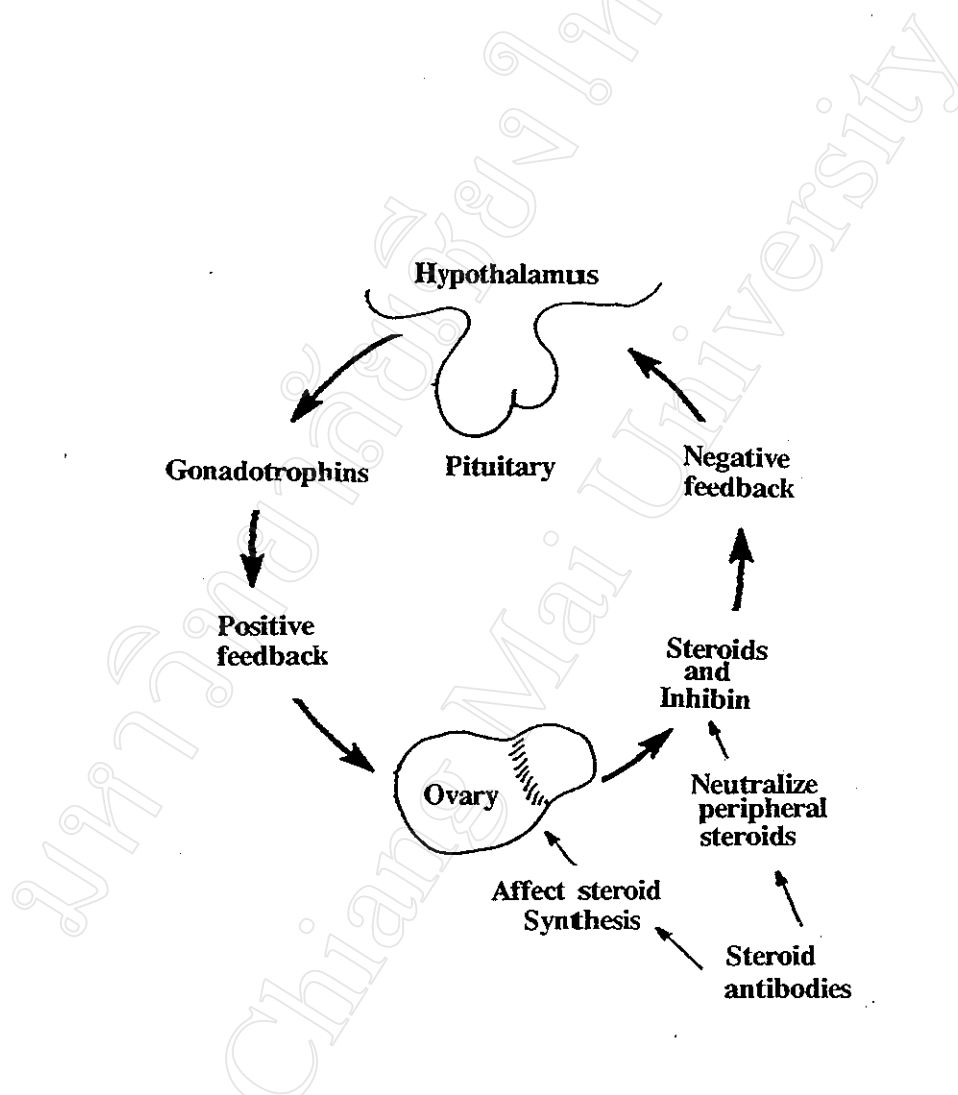
ที่มา : ดัดแปลงจาก Alexander and Brewer (1995).

Aluminum hydroxide, Carbopol, Ethylene maleic anhydride, Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, Trehalose dimycolate ผสม Monophosphoryl lipid A [อีมีลซิฟิเคชันกับ Mineral oil 5 % และส่วนผสมของ Tween 80 : Span 80 (70:30) 5 %] และ Mycobacteria (Complete Freund's adjuvant) โดยมี LH-Ovalbumin (LH-Oval) conjugate เป็นแอนติเจน พบว่าเมื่อใช้ Saponin ที่ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ใน Mineral oil 63 % เป็นสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน จะให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงสุด นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ Saponin เป็นสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ในสัตว์อื่นอีกหลายชนิด เช่น หนู (Kensil *et al.*, 1991; Newman *et al.*, 1992), สุกร (Houdayer *et al.*, 1978; Stewart-Tull, 1989) และโค (Opdebeeck *et al.*, 1988; Wong and Opdebeeck, 1989; Grierger *et al.*, 1990; Valentin *et al.*, 1993).

2.2.3 กลไกการทำงานของแอนติบอดี (Mode of action) ต่อสเตียรอยด์ฮอร์โมน

แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเพศทดสอบเตอร์โรน จะมีความจำเพาะต่อฮอร์โมนนั้น โดยอาศัยปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพลกซ์ (Antigen-antibody complex) แอนติบอดีจะจับกับฮอร์โมนในระบบหมุนเวียนเลือด ทำให้ฮอร์โมนไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Neutralization) ซึ่งเป็นการแก่งแย่งกับอวัยวะเป้าหมายของฮอร์โมน (Martensz, 1980; Scaramuzzi and Hoskinson, 1984) หรือกล่าวได้ว่า แอนติบอดีไปแทรกแซงกลไกการทำงานของ Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis (Nieschlag *et al.*, 1974; McKinnie *et al.*, 1988) เมื่อฮอร์โมนในกระแสเลือดไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ จึงเป็นการลดการทำงานของฮอร์โมนที่ไปยับยั้งการทำงาน (Negative feedback) ของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) และต่อมใต้สมอง (Pituitary gland) ทำให้การหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำงานของรังไข่ ดังภาพที่ 7. นอกจากนี้ Edwards (1974) ได้รายงานว่าแอนติบอดีสามารถเข้าไปในช่องเหลวของกระเปาะไข่ (Follicular fluid) ได้ แอนติบอดีจะจับกับฮอร์โมนเพศทดสอบเตอร์โรน ทำให้ระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอรอล-17 บีตา (Estradiol-17 β) จากรังไข่ลดลง (Baird, 1977) เนื่องจากเพศทดสอบเตอร์โรนเป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในขบวนการ

การสังเคราะห์สเตอรอยด์ในกระเปาะไข่ การที่ระดับเอสโตรเจนลดลงทำให้ขบวนการ
Negative feedback ที่มีต่อต่อมใต้สมอง ลดลงด้วย.



ภาพที่ 7. แสดงบริเวณที่แอนติบอดีออกฤทธิ์ เป็นการเปลี่ยนแปลง Steroid negative feedback โดย Neutralization ในระบบหมุนเวียนเลือดหรือเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์สเตียรอยด์ ที่รังไข่ (ที่มา : Webb *et al.*, 1984).

2.3 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ที่มีผลต่อระบบการสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง.

การใช้ระบบภูมิคุ้มกัน ไปแทรกแซงการทำงานของระบบการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทั้งแบบแอคทีฟ และพาสซีฟในเซชัน ซึ่งมีผลต่อระบบการสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย และสัตว์เพศผู้ (ตารางที่ 4.) ดังรายงานในหนู Hillier *et al.* (1974) ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบแอคทีฟในเซชันด้วย Tetosterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime-bovine serum albumin (T-3-BSA) 100 ไมโครกรัม ในหนูพันธุ์สปาร์กคอลลีย์ (Sprague Dawley) อายุ 18 สัปดาห์ และกระตุ้นซ้ำทุกเดือน หลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 17 สัปดาห์ พบว่ารังไข่เกิดซิสติก ฟอลลิเคิล (Cystic follicle) และไม่มีการตกไข่ ขณะที่กลุ่มควบคุม กระเพาะไข่มีการพัฒนา และมีการตกไข่ตามปกติ สอดคล้องกับการทดลองของ Bourtourault *et al.* (1991) ซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-BSA ร่วมกับ 17β -Estradiol-6-carboxymethyloxime-BSA (E_2 -6-BSA) 150 และ 100 ไมโครกรัม ผสมกับ Complete Freund's adjuvant (CFA) โดยกระตุ้นซ้ำ 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ BSA พบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนทั้งสอง ทำให้รังไข่เกิดซิสติก ฟอลลิเคิล, Haemorrhagic follicle และไม่มีการตกไข่ และทำให้ระดับ LH และฮอร์โมนโพรแลคติน (Prolactin) เพิ่มขึ้น ขณะที่ Mori *et al.* (1977) รายงานว่าการให้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ร่วมกับ Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) และ Human chorionic gonadotropin (hCG) ในหนูที่ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ และหนูที่ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ และตัดต่อมใต้สมองออก (Hypophysectomized immature rats) ทำให้อัตราการตกไข่ลดลง และระงับการตกไข่ ตามลำดับ.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอโรนในกระต่ายเพศผู้ ทำให้ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มขึ้น และน้ำหนักรังไข่เพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนเซลล์เลย์ดิก (Leydig cells) เพิ่มขึ้น (Nieschlag *et al.*, 1973). Nieschlag *et al.* (1974) รายงานว่าอวัยวะมีการทำงานมากขึ้น (Hyperfunction) เพราะระดับ LH และ FSH หลังเพิ่มขึ้น จากการควบคุมกลไก Feedback

ตารางที่ 4. การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนแบบแอคทีฟและพาสซีฟในหมูในเซชันในสัตว์เพศผู้และเพศเมีย.

สัตว์	เพศ	วิธีการกระตุ้น	ประเด็นที่ศึกษา	แหล่งข้อมูล
หนู	เมีย	AI ¹	ผลต่อการพัฒนา Polycystic ovaries	Hillier et al., 1974
หนู	เมีย	PI ²	ฤทธิ์ของแอนโดรเจนที่มีต่อขบวนการตกไข่	Mori et al., 1977
หนู	เมีย	AI	การทำงานของต่อม Pituitary และรังไข่	Bourtourault et al., 1991
กระต่าย	ผู้	AI	ผลต่อการทำงาน และรูปสัณฐานของอวัยวะ	Nieschlag et al., 1973
กระต่าย	ผู้	AI	ผลต่อกลไก feedback control hypothalamo-pituitary adrenal and testicular axis	Nieschlag et al., 1974
กระต่าย	ผู้	AI	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอนติบอดี เทสโทสเตอโรน และ LH	Thomeycroft et al., 1975
กระต่าย	ผู้	AI	ผลต่อ Metabolic clearance (MCR) ของเทสโทสเตอโรน	Wickings et al., 1976
กระต่าย	เมีย	AI	ผลต่อระดับฮอร์โมนเพศ และ โกลาโดโทรปิน	Armstrong et al., 1978
กระต่าย	เมีย	AI	การทำงานของไทรไธในระหว่างการตั้งท้อง	Younglai et al., 1981
สุกร	เมีย	AI	การแสดงอาการเป็นสัด	Elsaesser and Parvizi, 1977
สุกร	ผู้	AI	ลักษณะของอวัยวะ และการทำงานของต่อมไทรไธหลังวัยเจริญพันธุ์	Thompson et al., 1985
ลิง	เมีย	AI	การแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด	Martensz and Everitt, 1982
แกะ	เมีย	AI	ระดับฮอร์โมน LH, FSH และ P4 ในช่วงที่มีรอบการเป็นสัด	Martensz and Scaramuzzi, 1979
แกะ	เมีย	AI	ระดับฮอร์โมน LH, FSH ในช่วงที่ไม่มีรอบการเป็นสัด	Martensz et al., 1979
แกะ	เมีย	AI	รอบการเป็นสัด, การตกไข่, ระดับฮอร์โมนในรังไข่	Scaramuzzi et al., 1981
แกะ	เมีย	AI	อัตราการผลิตไข่ และจำนวนลูกต่อครอก	Cox et al., 1982
แกะ	เมีย	PI	อัตราการผลิตไข่ และจำนวนลูกต่อครอก	Land et al., 1982
แกะ	เมีย	PI	อัตราการผลิตไข่	Land et al., 1983

¹ AI = Active Immunization, ² PI = Passive Immunization

ตารางที่ 4. (ต่อ)

สัตว์	เพศ	วิธี การ กระตุ้น	ประเด็นที่ศึกษา	แหล่งข้อมูล
แกะ	เมีย	PI ²	อัตราการตกไข่, ระดับ LH และ FSH เมื่อกระตุ้น ภูมิคุ้มกันเป็นระยะเวลานาน	Pathiraja <i>et al.</i> , 1984
แกะ	เมีย	PI	อัตราการตกไข่, การสูญเสียไข่, น้ำหนักลูกแรกเกิด, ของแกะที่มีคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายแตกต่างกัน ในช่วงผสมพันธุ์	Rhind <i>et al.</i> , 1985
แกะ	เมีย	PI	การแสดงอาการเป็นสัด, อัตราการตกไข่, อัตราการผสม- ติด และ อัตราการอยู่รอดของคัพภะ ที่มีความสมบูรณ์ ของร่างกายแตกต่างกันในช่วงผสมพันธุ์	Rhind <i>et al.</i> , 1986
แกะ	เมีย	PI	การแสดงอาการเป็นสัด, จำนวนลูกต่อครอกที่มีความ สมบูรณ์ของร่างกายแตกต่างกันในช่วงผสมพันธุ์ และ ปริมาณของแอนติบอดีที่ให้ในระดับแตกต่างกัน	Rhind <i>et al.</i> , 1987
แกะ	เมีย	PI	ระดับแอนติบอดีในช่วงผสม ที่มีผลต่อสมรรถภาพการ สืบพันธุ์, การมีชีวิตรอดของคัพภะ และระดับโปรเจส- เตอร์โรน	Alabart <i>et al.</i> , 1991
แกะ	เมีย	PI	การมีชีวิตรอดของคัพภะ ที่ย้ายฝากไปให้แกะที่ได้รับ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนแอนโดรเจน (กลไก เหนี่ยวนำการสูญเสียคัพภะ หลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน)	Folch <i>et al.</i> , 1991
แกะ	ผู้	AI ¹	ระดับเทสโทสเตอร์โรน, FSH, LH และการผลิตสเปิร์ม	Auclair <i>et al.</i> , 1995
โค	ผู้	AI	ขนาดอวัยวะ และอัตราการผลิตสเปิร์ม	Walker <i>et al.</i> , 1984
โค	ผู้	AI	ระดับเทสโทสเตอร์โรน, FSH และ LH	D' Occhio <i>et al.</i> , 1987
โค	เมีย	AI	อัตราการตกไข่, รอบการเป็นสัดและฮอร์โมน FSH, LH	Price <i>et al.</i> , 1987
โค	เมีย	PI	ผลต่อ Negative feedback ของเอสตราไดออล	Lermite <i>et al.</i> , 1991
โค	เมีย	PI	ระดับ LH และการทำงานของรังไข่หลังคลอดในโค ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ	Lermite <i>et al.</i> , 1993
กระบือ	เมีย	AI	การทำงานของรังไข่ของกระบือที่มีการทำงานผิดปกติ	Kamonpatana <i>et al.</i> , 1985

¹ AI = Active Immunization, ² PI = Passive Immunization

control hypothalamo-pituitary-gonadal axis ของแอนติบอดีต่อเทสทอสเตอโรน ระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอโรนที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดี แต่ระดับ LH ไม่มีความสัมพันธ์กับแอนติบอดีที่เกิดขึ้น (Thornycroft et al., 1975) แอนติบอดีในระบบหมุนเวียนเลือด ทำให้อัตราการขจัดเทสทอสเตอโรนออกนอกร่างกาย (Metabolic clearance rate) ลดลง และทำให้ Negative feedback ที่สมองส่วนไฮโปธาลามัส และต่อมใต้สมอง ลดลงเป็นสาเหตุทางอ้อม ในการเพิ่มอัตราการผลิตฮอร์โมนเทสทอสเตอโรน (Wickings et al., 1976). ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสทอสเตอโรนในกระต่ายเพศเมีย ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น ระดับฮอร์โมนแอนโดรเจน และเอสตราไดออล-17 บีตา เพิ่มขึ้น (Armstrong et al., 1978). Younglai and Armstrong (1981) รายงานว่ากระต่ายที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสทอสเตอโรน ในช่วงที่ตั้งท้อง ทำให้ระดับ LH เทสทอสเตอโรน และโปรเจสเตอโรน เพิ่มขึ้น และจำนวนลูกต่อครอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น.

ในสุกร Elsaesser and Parvizi (1977) กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-BSA ในสุกรเพศเมีย พันธุ์ก๊อตติงเกน (Göttingen strain) อายุ 3 สัปดาห์ กระตุ้นซ้ำทุก 4 สัปดาห์ เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ ปรากฏว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกวดการแสดงอาการเป็นสัด ถึง 60 เปอร์เซ็นต์. ขณะที่ Thompson et al. (1985) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในสุกรเพศผู้ อายุ 1 เดือน ด้วย Testosterone-3-Equine serum albumin (T-3-ESA) 10 มก. ผสมกับ CFA กระตุ้นซ้ำด้วยแอนติเจนในปริมาณเท่ากับการกระตุ้นครั้งแรก แต่ผสมกับ IFA แทน จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน ผลปรากฏว่าการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทั้ง LH และ FSH ลดการทดลอง 12 เดือน แต่ไม่มีผลต่อการผลิตสเปิร์ม (Sperm) และขนาดของอวัยวะ เมื่อสุกรถึงวัยเจริญพันธุ์.

ในลิง Martensz and Everitt (1982) ได้ให้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสทอสเตอโรน ที่มีไคเตอร์ 1: 10,000 จำนวน 2 มล. โดยฉีดเข้าเส้นเลือด ในลิงวอก (Rhesus monkeys) เพศเมียที่ตัดรังไข่ออก (Ovariectomized) แล้วให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน จะทำให้การแสดงพฤติกรรมทางเพศลดลง.

แกะที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในช่วงที่มีรอบการเป็นสัด และไม่มีรอบการเป็นสัด ทำให้ระดับ LH เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลกับระดับ FSH และพบว่ามีผลขัดขวางการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด ในแกะที่อยู่ในช่วงที่มีรอบการเป็นสัด (Martensz *et al.*, 1979; Martensz and Scaramuzzi, 1979). Scaramuzzi *et al.* (1981) รายงานว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ทำให้อัตราการตกไข่ และระดับสเต็มรอยด์ฮอร์โมนจากรังไข่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าวัดระดับแอนติบอดีสูงเกินไป กลับทำให้แกะมีรอบการเป็นสัดผิดปกติ เกิดซีสติก ฟอลลิเคิล และขัดขวางการตกไข่ แต่มีบางรายงานพบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ทำให้แกะมีอัตราการตกไข่ และเปอร์เซ็นต์การตกลูกเพิ่มขึ้น (Cox *et al.*, 1982; Land *et al.*, 1982; 1983) เช่นเดียวกับ Pathiraja *et al.* (1984) ให้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน กับแกะพันธุ์เวลช์-เมาเทน (Welsh Mountain) ทำให้อัตราการตกไข่ และอัตราการตกลูกเพิ่มขึ้น ระดับ LH เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลกับระดับ FSH. Rhind *et al.* (1985) ให้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน มีระดับไตเตอร์ (Titer) 1:96,000 จำนวน 32 มล. กับแกะพันธุ์สก๊อตทิส-แบล็กเฟส (Scottish Blackface) ที่มีคะแนนความสมบูรณ์พันธุ์ของร่างกาย (Body condition scores, BCS) ขณะผสมพันธุ์ ตั้งแต่ 2.00 ลงไป, 2.25-2.50 และตั้งแต่ 2.75 ขึ้นไป ทำให้อัตราการตกไข่ในกลุ่มที่มีค่า BSC ตั้งแต่ 2.5 ลงมา เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลกับอัตราการตายของคัพภะ (Embryo), อัตราส่วนลูกเพศเมียหรือเพศผู้ น้ำหนักแรกเกิด และจำนวนลูกแกะที่มีชีวิตหลังคลอด 1 สัปดาห์ และผลการทดลองกับแกะพันธุ์เกรฟเฟส (Greyface) ที่มีค่า BCS ในช่วงการผสมพันธุ์ ตั้งแต่ 1.75 ลงไป, 2.00-2.50, 2.50-2.75 และตั้งแต่ 3.00 ขึ้นไป ได้รับแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ที่มีไตเตอร์ 1:410,000 จำนวน 7.5 มล. หรือ 1: 100,000 จำนวน 32 มล. ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้นทุกค่า BCS แต่อัตราการตกลูกเพิ่มขึ้นเฉพาะกลุ่มที่มีค่า BCS 2.50 ขึ้นไป (Rhind *et al.*, 1986). Rhind *et al.* (1987) ศึกษาผลของปริมาณแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ที่ขนาด 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 5.0 เท่าของแอนติบอดีที่มีไตเตอร์ 1:100,000 จำนวน 32 มล. จะเรียกว่าปริมาณแอนติบอดีมาตรฐาน (Standard dose) ในแกะพันธุ์สก๊อตทิส-แบล็กเฟส ที่มีค่า BCS ตอนผสมพันธุ์ ตั้งแต่ 2.00 ลงมา, 2.25-2.50 และตั้งแต่ 2.75 ขึ้นไป พบว่าจำนวนแกะที่ตกลูก และจำนวนลูกต่อครอกเพิ่มขึ้นทุกค่า BCS โดยขนาดแอนติบอดีที่เหมาะสม คือประมาณ 1.5 เท่าของปริมาณมาตรฐาน แกะจะตอบสนองสูงสุด. Alabart *et al.* (1991) ให้แอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ที่มีไตเตอร์ 1:131,500-1:199,900 จำนวน 0.8 มล. ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

กับแกะพันธุ์ราชา อะราโกเนีย (Rasa Aragonesa) ในช่วงผสมพันธุ์ ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น แต่จำนวนคัพภะที่มีชีวิตลดลง เมื่อระดับแอนติบอดีสูงขึ้น และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น. Folch et al. (1991) ศึกษากลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียคัพภะหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอร์โรนในแกะพันธุ์ราชา อะราโกเนีย ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัตว์ และให้แอนติบอดีต่อเทสโทสเตอร์โรน ที่มีไคเตอร์ 1:44,900 จำนวน 35 มล. ฉีดเข้าเส้นเลือด และได้รับคัพภะจำนวน 2 ตัว ตอนแสดงอาการเป็นสัตว์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้แอนติบอดี พบว่าจำนวนคัพภะในกลุ่มที่ได้รับแอนติบอดี มีการสูญเสียมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น. สำหรับแกะเพศผู้ Auclair et al. (1995) ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-BSA ในแกะเพศผู้พันธุ์เมอร์รีโน (Merino) อายุ 18 เดือน โดยกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 เดือน พบว่าทำให้ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน และโกนาโดโทรปินเพิ่มขึ้น หลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 12 เดือน แต่ไม่มีผลต่ออัตราการผลิตสเปิร์มต่อวัน และน้ำหนักอวัยวะ.

ในโค Walker et al. (1984) ได้ทดลองกับลูกโคพันธุ์ โฮลสไตน์ เพศผู้ อายุ 1 เดือน กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย Testosterone-17-Human serum albumin (T-17-HSA) 15 มก. และกระตุ้นซ้ำทุกๆเดือน ด้วยแอนติเจน 10, 7.5, 5 และ 5 มก. ตามลำดับ เมื่ออายุ 6 เดือนให้แอนติเจนอีก 15 มก. ปรากฏว่าเมื่อโคถึงวัยเจริญพันธุ์ อวัยวะมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีการผลิตสเปิร์มมากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ D'Occhio et al. (1987) ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอร์โรน ในลูกโคเพศผู้ ที่อายุ 3 เดือน และกระตุ้นซ้ำ 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน ผลปรากฏว่าระดับ LH, FSH และเทสโทสเตอร์โรน ในช่วงอายุ 3-10 เดือน เพิ่มขึ้น อวัยวะมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ มีการผลิตสเปิร์มมากขึ้น. Price et al. (1987) กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย T-3-Ovalbumin (T-3-Oval) 8 มก. ที่ผสม Incomplete Freund's adjuvant (IFA) และ *Bordetella pertussis* และ *Corynebacterium parvum* กระตุ้นซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 4 เดือน ในโคสาวพันธุ์ ลูกผสมชาร์โรเลย์ x ซิมเมนทอล (Charolais x Simmental) อายุ 1 ปี ผลปรากฏว่าเกิดซีสติก ฟอลลิเคิล และไม่มีรอบการเป็นสัตว์ หลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 หลังจากนั้น 25 สัปดาห์ต่อมา มีอัตราการตกไข่ และระดับ LH เพิ่มขึ้น. Lermite et al. (1991) ทดลองกับโคสาวพันธุ์โฮลสไตน์-ฟรีเซียน อายุ 18 เดือน ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ และตัดรังไข่ออก พร้อมกับฝังเอสตราไดออล-17 บีตา ที่ใต้ผิวหนัง และให้แอนติบอดีต่อเทสโทสเตอร์โรน ผลปรากฏว่า จำนวน Pulses ของ LH เพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อนให้แอนติบอดี ซึ่งไม่ปรากฏจำนวน Pulses ของ LH. ขณะที่ Lermite *et al.* (1993) ทดลองกับแม่โคหลังคลอดลูก ที่ได้รับอาหารพลังงานต่ำ และให้แอนติบอดีต่อ เทสโทสเตอโรน 100 ± 9 มล. ในวันที่ 10-15 หลังคลอดลูก ทำให้ LH หลังออกมาเพิ่มขึ้น กระเปาะไข่มีการพัฒนามากขึ้น เปรียบเทียบกับแม่โคที่ได้รับอาหารพลังงานสูง หรือต่ำ แต่ได้รับอิมมูโนโกลบูลินที่ไม่ได้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Normal immunoglobulin).

ในกระป๋อง Kamonpatana *et al.* (1985) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในกระป๋องที่รังไข่ ไม่มีการทำงานหลังคลอดเป็นเวลานาน (Subfertile) ด้วย Tetosterone-3-Human serum albumin (T-3-HSA) 5 มก./มล. ที่มี DEAE-dextran เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยฉีด 3 ครั้งๆละ 3 มล. ห่างกัน 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าทำให้รังไข่กลับมาทำงานได้ตามปกติ.

แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน จะไปทำให้ สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ หรือในระบบหมุนเวียนเลือด ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เป็นการเปลี่ยนแปลงกลไกการควบคุมย้อนกลับแบบยับยั้ง (Negative feedback control) ที่ต่อมใต้สมอง ซึ่งมีผลเพิ่มระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน การทำงานของรังไข่ การพัฒนาของกระเปาะไข่ อัตราการตกไข่ และการตกไข่.

2.3.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ที่มีผลต่อระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ทั้งแบบแอกทีฟ และพาสซีฟอิมมูโนไนเซชัน ในสัตว์เพศเมียทำให้ระดับ LH เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 5 ในกระด้าย (Armstrong *et al.*, 1978; Younglai and Armstrong, 1981), แกะ (Pathiraja *et al.*, 1984) ทั้งที่อยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ และนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งไม่มีรอบการเป็นสัด (Anoestrus) (Martensz and Scaramuzzi, 1979; Martensz *et al.*, 1979), โค (Price *et al.*, 1987; Lermite *et al.*, 1983) แต่ไม่มีผลกับหนู (Rat) (Hillier *et al.*, 1974). การหลัง LH ในแกะ และโคที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

เพิ่มขึ้นทั้ง Basal level, Pulse frequency และ Pulse amplitude (Martensz and Scaramuzzi, 1979; Martensz *et al.*, 1979; Lermite *et al.*, 1993) แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน ไม่มีผลต่อระดับ FSH ในแกะ (Martensz and Scaramuzzi, 1979; Martensz *et al.*, 1979; Pathiraja *et al.*, 1984), โค (Price *et al.*, 1987) แต่ในหนู กลับพบว่าระดับ FSH เพิ่มขึ้นประมาณ 140 เปอร์เซ็นต์ (Hillier *et al.*, 1974) และในกระต่าย พบว่าระดับ FSH เพิ่มขึ้น หลังผสมพันธุ์ไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Armstrong *et al.*, 1978; Younglai and Armstrong, 1981).

ตารางที่ 5. แสดงระดับฮอร์โมนโกนาโดทรอปินในพลาสมา ของสัตว์ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน.

สัตว์	ระดับ LH (นกก./มล.)		ระดับ FSH (นกก./มล.)		แหล่งข้อมูล
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	กลุ่มควบคุม	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	
หนูเพศเมีย	75±17	62±47	465±186	1110±127***	Hillier <i>et al.</i> , 1974
หนูเพศเมีย	0.53±0.02	1.10±0.11***	-	-	Bourtourault <i>et al.</i> 1991
กระต่ายเพศผู้	3.9	5.9	353	1012	Nieschlag <i>et al.</i> , 1974
กระต่ายเพศเมีย	-	สูงกว่า*	-	สูงกว่า*	Younglai and Armstrong, 1981
สุกรเพศผู้	-	ต่ำกว่า*	-	ต่ำกว่า*	Thompson <i>et al.</i> , 1985
แกะเพศเมีย	<2	8.9-18.5*	-	60.9-117.9	Martensz and Scaramuzzi, 1979
แกะเพศผู้	2.1±0.2	5.7±0.9**	81±10	141±16	Schanbacher, 1982
โคเพศผู้	-	สูงกว่า*	-	สูงกว่า*	Walker <i>et al.</i> , 1984
โคเพศเมีย	0.45±0.06	1.01±0.03**	-	-	Price <i>et al.</i> , 1987
โคเพศเมีย	0.7±0.3	1.1±0.3*	-	-	Lermite <i>et al.</i> , 1993

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.002.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในสัตว์เพศผู้ ต่อการตอบสนองของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีความแตกต่างกัน ในสัตว์แต่ละชนิดกล่าวคือ ในกระต่าย (Nieschlag *et al.*, 1974) และแกะ (Schancher, 1982) ทำให้ระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทั้ง LH และ FSH เพิ่มขึ้น แต่สำหรับลูกโคเพศผู้ อายุ 1 เดือน ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA และกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ เมื่ออายุ 2, 3, 4 และ 5 เดือน ไม่มีผลต่อระดับ LH และ FSH จนกระทั่งโคมีอายุ 11-12 เดือน ระดับ LH และ FSH เพิ่มขึ้น แม้ว่าระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้น หลังฉีดแอนติเจนครั้งแรก 42 วัน และสูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดการทดลองก็ตาม ส่วนสุกรเพศผู้ อายุ 1 เดือน ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-ESA ปรากฏว่ามีผลไปกดการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทั้ง LH และ FSH (Thompson *et al.*, 1985).

2.3.2 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่มีต่อโครงสร้างของรังไข่

การทำงานของรังไข่ การพัฒนาของกระเปาะไข่ และระดับสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากรังไข่.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน มีผลต่อโครงสร้าง (Ovarian morphology) และการทำงานของรังไข่ (Ovarian activity) โดย Scaramuzzi *et al.* (1981) รายงานว่า แกะพันธุ์เวลช์-เมานท์ ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-BSA มีผลทำให้น้ำหนักรังไข่เพิ่มขึ้น [5.62 ± 2.15 และ 1.19 ± 0.3 กรัม สำหรับกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ] และ มีจำนวนกระเปาะไข่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 3 มม. ในแต่ละรังไข่เพิ่มขึ้น [6.7 ± 0.9 และ 1.2 ± 0.3 สำหรับกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ] เช่นเดียวกับ Lermite *et al.* (1993) รายงานว่า โคนมหลังคลอดที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอโรนแบบพาสซีฟ ทำให้การพัฒนาของกระเปาะไข่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และจำนวนกระเปาะไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มม.ขึ้นไป มีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย ขณะที่ Scaramuzzi *et al.* (1981) รายงานว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ที่มากเกินไปในแกะ ทำให้เกิด ซีสติก ฟอลลิเคิล และแสดงอาการเป็นสัดผิดปกติ.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในสัตว์เพศเมีย และเพศผู้ ทำให้สเตียรอยด์ฮอร์โมนจากรังไข่ และอัตรา ทั้งโปรเจสเตอโรน (Younglai and Armstrong,

1981; Scaramuzzi *et al.*, 1981; Kamonpatana *et al.*, 1985) เอสโตรเจน (Armstrong *et al.*, 1978; Scaramuzzi *et al.*, 1981) และ เทสโทสเตอโรน (Nieschlag *et al.*, 1973; 1974; Hillier *et al.*, 1974; Thorneycroft *et al.*, 1975; Wickings *et al.*, 1976; Armstrong *et al.*, 1978; Scaramuzzi *et al.*, 1981) หลังออกมาเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 6. ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้น ยังไม่สามารถอธิบายกลไกที่ชัดเจนได้ แต่มีบางรายงานอธิบายว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากจำนวนคอร์ปัสลูเทียม (Corpus luteum) ที่เกิดการตกไข่เพิ่มขึ้น (Younglai and Armstrong, 1981; Kamonpatana *et al.*, 1985). ส่วนระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่เพิ่มขึ้น Haynes and Southee (1984) อธิบายว่าระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทั้งหมดในซีรัม (Total serum testosterone) ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีอัตราการผลิต (Production rate) เพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันค่าครึ่งชีวิต (Half life) ของเทสโทสเตอโรนยาวขึ้น แต่มีอัตราการขับออกนอกร่างกายลดลง (Wickings *et al.*, 1976) และระดับเทสโทสเตอโรนที่อยู่ในรูปอิสระ (Free testosterone) ในระบบหมุนเวียนเลือดลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการจับของแอนติบอดี (Hillier *et al.*, 1974).

2.3.3 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่มีต่ออัตราการตกไข่ และการตกไข่

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทั้งแบบแอคทีฟและพาสซีฟในเซชัน และพาสซีฟในเซชัน ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น ดังรายงานของ Armstrong *et al.* (1978) กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบแอคทีฟต่อ T-3-BSA ในกระต่ายเพศเมีย ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ BSA (8.0 ± 2.1 , 4.4 ± 1.9 ตามลำดับ) Cox *et al.* (1982) รายงานว่าแกะพันธุ์เมอร์ริโน ที่ใช้ T-3-HSA เป็นแอนติเจน สำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้นประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (จาก 1.14 เป็น 1.52) เช่นเดียวกับรายงานของ Scaramuzzi *et al.* (1981) กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในแกะพันธุ์เวลช์-เมานเทน ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้นประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ (จาก 1.5 ± 0.20 เป็น 2.8 ± 0.25).

ตารางที่ 6. แสดงระดับฮอร์โมนจากกรังไข่ หรืออวัยวะ ในระบบหมุนเวียนเลือดของสัตว์ที่ กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน.

สัตว์	ฮอร์โมน	ความเข้มข้นของฮอร์โมนใน		แหล่งข้อมูล
		กลุ่มควบคุม	กลุ่มกระตุ้น ภูมิคุ้มกัน	
กระต่ายเพศเมีย (ยังไม่โตเต็มวัย)	เทสโทสเตอโรน ¹	-	2.28±0.69*	Armstrong et al., 1978
กระต่ายเพศเมีย (โตเต็มวัย)	เทสโทสเตอโรน ¹	-	5.77±0.80**	Armstrong et al., 1978
กระต่ายเพศเมีย	เอสโตรเจน ³	87.3±8.5	118.50±2.50*	Armstrong et al., 1978
กระต่ายเพศเมีย	เอสโตรเจน ³	78.6±11.5	157.50±30.3*	Armstrong et al., 1978
กระต่ายเพศผู้	เทสโทสเตอโรน ¹	4.3±0.84	153±2.7**	Thomeycroft et al., 1975
หนู (Rat)	เทสโทสเตอโรนรวม ²	27±18	90±23***	Hillier et al., 1974
หนู (Rat)	เทสโทสเตอโรนอิสระ ²	9.8±2.5	1.72±0.68***	Hillier et al., 1974
กระต่ายเพศผู้	เทสโทสเตอโรน ²	214-674	8,410-32,000	Nieschlag et al., 1973
กระต่ายเพศผู้	เทสโทสเตอโรน ²	419	21,870	Nieschlag et al., 1974
กระต่ายเพศผู้	เทสโทสเตอโรน ²	455±197	11,850±2,734****	Wickings et al., 1976
กระต่ายเพศเมีย	โปรเจสเตอโรน	-	สูงกว่ากลุ่มควบคุม*	Younglai and Armstrong, 1981
สุกรเพศผู้	เทสโทสเตอโรน	-	สูงกว่ากลุ่มควบคุม*	Thompson et al., 1985
แกะเพศผู้	เทสโทสเตอโรน ²	2.4±0.5	121.0±14.4**	Schanbacher, 1982
แกะเพศเมีย	เอสโตรเจน ³	19±2	66±19**	Scaramuzzi et al., 1981
แกะเพศเมีย	เอสตราไดออล-17 บีตา ³	33±4	105±26**	Scaramuzzi et al., 1981
แกะเพศเมีย	แอนโดรสตินไดโอน ³	125±71	45,908±18,432***	Scaramuzzi et al., 1981
แกะเพศเมีย	เทสโทสเตอโรน ³	44±15	7,364±2777***	Scaramuzzi et al., 1981
แกะเพศเมีย	โปรเจสเตอโรน ¹	3.1±0.2	5.2±2.1	Scaramuzzi et al., 1981
กระบือเพศเมีย	โปรเจสเตอโรน ¹	0.74±0.45	2.51±1.25	Kamonpatana et al., 1985
กระบือเพศเมีย	เอสโตรเจนซัลเฟต ³	36±5	72±34	Kamonpatana et al., 1985

¹ นนค./มล. (ng/ml); ² นนค./100 มล. (ng/100ml); ³ พกค./มล. (pg/ml)

* p< 0.05; ** p<0.01; *** p<0.0025; **** p<0.0005

Land *et al.* (1982) ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน โดยให้แอนติซีรั่มต่อเทสโทสเตอโรนในแกะพันธุ์เวลช์-เมาเทิน ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (จาก 1.3 เป็น 1.8) ทั้งนี้เป็นเพราะว่า จำนวนแกะที่ตกไข่แฝด (2 ใบ) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (78 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Land *et al.* (1983) และ Pathiraja *et al.* (1984) ที่ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในแกะพันธุ์เดียวกัน. Alabart *et al.* (1991) รายงานว่าแกะพันธุ์ราชา-อะราโกเนีย ที่ได้รับแอนติซีรั่มต่อเทสโทสเตอโรน มีอัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ (เพิ่มขึ้นจาก 1.7 เป็น 2.3) นอกจากนี้อัตราการตกไข่ของแกะที่ศึกษาระดับภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ยังขึ้นอยู่กับค่าคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย (BCS) ที่ช่วงเวลาการผสมพันธุ์ Rhind *et al.* (1985) รายงานว่าแกะพันธุ์สก็อตทิส-แบล็กเฟส ที่มี BCS ตั้งแต่ 2.50 ลงไปจะตอบสนองต่อแอนติบอดีได้ดีกว่าแกะที่มีค่า BCS มากกว่า 2.50 ขึ้นไป เช่นเดียวกับแกะพันธุ์ลูกผสมเกรเฟส ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อเทสโทสเตอโรน อัตราการตกไข่ขึ้นอยู่กับ BCS เช่นเดียวกัน (Rhind *et al.*, 1986).

ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบพาสซีฟต่อเทสโทสเตอโรน เพื่อควบคุมการตกไข่ในโคสาว โดยให้แอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ที่เตรียมได้จากแกะ พบว่าแอนติบอดีมีผลต่ออัตราการตกไข่ในโค แต่การตอบสนองมีความแปรปรวนมากกว่าแกะ กล่าวคือมีทั้งกระตุ้นการตกไข่เพิ่มขึ้น และขัดขวางการตกไข่ แสดงให้เห็นว่ากลไกควบคุมการเจริญ และการพัฒนาของกระเปาะไข่ในโค และแกะมีความแตกต่างกัน (Webb *et al.*, 1984).

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน นอกจากจะทำให้การพัฒนาของกระเปาะไข่ และการตกไข่เพิ่มขึ้น ยังมีผลต่ออัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น ดังรายงานในแกะ (Cox *et al.*, 1982; Land *et al.*, 1982; Pathiraja *et al.*, 1984; Scaramuzzi and Hoskinson, 1984; Rhind *et al.*, 1985; Rhind *et al.*, 1987) พบว่าทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น 18-87 เปอร์เซ็นต์ และในโค ทำให้อัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น 45 เปอร์เซ็นต์ (Lermite *et al.*, 1993) ทั้งนี้เป็นเพราะแกะ และโคมีการตกไข่แฝด มากกว่ากลุ่มควบคุม (Cox *et al.*, 1982; Land *et al.*, 1982; Scaramuzzi and Hoskinson, 1984; Lermite *et al.*, 1993) ส่วนกระต่าย มีแนวโน้มว่าจำนวน

ลูกต่อครอก (Litter size) เพิ่มขึ้น (10.3 ± 0.88 และ 8.25 ± 0.63 ตัว) (Younglai and Armstrong, 1981).

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนแอนโดรเจน มีรายงานว่าทำให้เกิดการสูญเสียของการสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นในระยะการตั้งท้องช่วงแรก ซึ่งพบในแกะที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนแอนโดรสเตนไดโอน (Androstenedione) ทำให้อัตราการปฏิสนธิ (Fertilization rate) การมีชีวิตของคัพภะ (Embryo viability) ลดลง และทำให้พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic development) ล่าช้าออกไป (Boland et al., 1984; Boland et al., 1986) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alabart et al. (1991) พบว่าจำนวนคัพภะที่มีชีวิต ในวันที่ 5-7 ของการตั้งท้องในแกะที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นลดลง เมื่อระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น Folch et al. (1991) ได้อธิบายกลไกการชักนำให้เกิดการสูญเสียคัพภะในแกะที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันว่า อาจเป็นเพราะภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมากเกินไป ทำให้สภาพแวดล้อมของท่อไข่ และมดลูกไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของคัพภะ แต่ Rhind et al. (1985) รายงานว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอโรน ไม่มีผลต่ออัตราการตายของคัพภะในแกะ และระดับไคเตอร์ต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในช่วงเวลาผสมพันธุ์ ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของแกะ (Rhind et al., 1986).