บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการผลิตแอนติบอดีต่อต้านแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ในไก่ไข่ เพื่อนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของลูกไก่ให้มีเพศเมียเพิ่มมากขึ้น พบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในแม่ไก่ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแม่ไก่ เพื่อสร้างแอนติบอดีต่อต้านแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) โดยพบว่า antibody titer จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังจากที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งแรก และเมื่อมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งที่ 2 (booster ครั้งที่ 1) พบว่ามีผลทำให้ระดับ antibody titer ในสัปดาห์ที่ 4 เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังจากที่มีการ booster ครั้งที่ 2

แอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อต้านแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ในไก่แม่พันธุ์กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA จัดว่าเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง โดยแอนติเจนในกลุ่มโปรตีนนี้สามารถฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองได้หลายทิศทาง ได้แก่ การฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) การฉีดเข้าชั้นผิวหนัง (intradermal) และการฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ (intravenous injection) ในการทดลองนี้เลือกใช้การฉีดกระตุ้นทางกล้ามเนื้อหน้าอกในปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับการทดลองในกระต่ายที่แนะนำให้ใช้ในปริมาณ 50 - 1,000 ไมโครลิตรเท่านั้น (Harlow and David, 1988) และพบว่าไก่แม่พันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ตอบสนองต่อปริมาณการกระตุ้นที่ระดับ 1,000 ไมโครลิตร ตั้งแต่การกระตุ้นในครั้งแรกที่ได้รับ

ในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) นั้นจะต้องมีความสะอาดและบริสุทธิ์ เพื่อป้องกันการปะปนของกลุ่มโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้อง หรือกลุ่มสารชนิดอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะนี้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ที่ได้มาใช้กระตุ้นในแม่ไก่ได้ทันที จะต้องผ่านการล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) หลายๆ ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าแอนติเจนที่ได้นั้นสะอาด และไม่มีสิ่งอื่นใดเจือปน เมื่อได้แอนติเจนที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฉีดในสัตว์ทดลองได้ โดยในการทดลองนี้มีการเตรียมแอนติเจนที่สะอาดและเตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการกระตุ้นในสัตว์ทดลอง เพื่อให้การกระตุ้นในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์สามารถตอบสนองต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ที่ได้รับและสามารถสร้างแอนติบอดีได้อย่างเต็มที่และมีประสิทธิภาพ

จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ร่วมกับ Freund's adjuvant โดยทำการฉีดกระตุ้นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ในไก่แม่พันธุ์กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ได้ตรวจพบลักษณะการบวมแดงและการอักเสบของผิวหนังบริเวณที่ทำการฉีดกระตุ้นของแม่ไก่บางตัวภาย หลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งที่สอง หลังจากที่ใช้ Freund's complete adjuvant ในครั้งแรกของการกระตุ้น ซึ่งเคยเกิดขึ้นกับการทดลองในกระต่ายโดยการฉีดกระตุ้นนี้อาจก่อให้เกิดการอักเสบของผิวหนังบริเวณที่ฉีดได้ (Manning *et al*., 1994) ทั้งนี้เนื่องจาก Freund's complete adjuvant ประกอบด้วย Bayal F (mineral oil) ผสมกับเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ตายแล้ว เมื่อนำแอนติเจนใดๆ มาผสมกับ Freund's complete adjuvant จะทำให้แอนติเจนนั้นมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด cell mediated immunity ได้ดีมาก แต่ในขณะเดียวกันก็อาจส่งผลให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนังและก่อให้เกิดก้อนเนื้อแข็ง (granuloma formution) ขึ้นมาได้ โดยปริมาณของ Freund's complete adjuvant ที่แนะนำให้ใช้อยู่ที่ 0.1 - 0.5 มิลลิลิตรต่อตำแหน่ง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ มีการใช้ปริมาณของ Freund's complete adjuvant 0.125 มิลลิลิตร ต่อตำแหน่ง (4 ตำแหน่ง) ซึ่งพบว่า มีค่าอยู่ระหว่างค่าที่ได้มีการแนะนำให้ใช้ได้ ในการทดลองกับไก่ อย่างไรก็ตามปริมาณของ Freund's complete adjuvant ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังคงก่อให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง ถึงแม้ว่าจะอยู่ในระดับต่ำและใช้เพียงครั้งเดียว คือในครั้งแรกเท่านั้น ดังนั้นการใช้ Freund's complete adjuvant ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อตำแหน่งควรใช้ในปริมาณน้อย โดยการเพิ่มจำนวนจุดของการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มากขึ้น จากเดิมที่กำหนดไว้ 4 จุด อาจเพิ่มเป็น 6 - 10 จุด ซึ่งสามารถช่วยทำให้การอักเสบของผิวหนังลดลงได้

ในขณะที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) กับ Freund's complete adjuvant ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (1:1) โดยทำการกระตุ้นในไก่แม่พันธุ์กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งแรก พบว่าแม่ไก่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี หลังจากที่ทำการวัดระดับแอนติบอดีซีรั่มที่เกิดขึ้น จึงได้ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อในครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีซีรั่มในแม่ไก่แต่ละตัว ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการตอบสนองต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ของแม่ไก่ทั้ง 10 ตัว (สองสายพันธุ์) มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติบอดีก่อนได้รับการกระตุ้น (วันที่ 0) โดยเฉพาะในสัปดาห์แรกและหลังจากการกระตุ้นในครั้งที่ 2 ระดับของแอนติบอดียังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระดับแอนติบอดีในครั้งแรก ทั้งนี้เป็นผลมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอม (foreignness) ที่เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิด adaptive immunity ในร่างกายของสัตว์ได้ โดยระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้เป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง และมีการจดจำลักษณะของสิ่งกระตุ้น โดยการสร้างแอนติบอดีจากบีเซลล์และจากเซลล์จดจำ การจดจำนี้จะเกิดขึ้นในรูปที่เมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนในครั้งแรก แอนติเจนจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้น และเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนตัวเดิมในครั้งที่สอง ระดับแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปริมาณมากและคงอยู่ในร่างกายเป็นระยะเวลานาน นอกจากผลของการใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) แล้วยังพบว่า ขนาดของแอนติเจนชนิดนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและประกอบกับการที่แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) เป็นโปรตีนซึ่งมีความซับซ้อนของโครงสร้างโมเลกุล จึงส่งผลให้สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าสารชนิดอื่นๆ ด้วยปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมานี้จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ระดับแอนติบอดีซีรั่มที่เกิดขึ้นในตัวแม่ไก่ทั้ง 10 ตัว ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 มีระดับสูงและต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 อย่างเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีซีรั่มที่แม่ไก่สร้างขึ้นหลังจากได้รับแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันทั้งในไก่เพศผู้และในไก่เพศเมีย หลังจากที่มีการตรวจวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับเซลล์ม้ามไก่เพศผู้และเซลล์ม้ามไก่เพศเมีย แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่เกิดขึ้นนั้น สามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์ม้ามไก่เพศผู้ได้ดีกว่าเซลล์ม้ามไก่เพศเมีย ทั้งนี้เป็นผลมาจากแอนติเจนที่ได้รับนั้นเป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ แต่เนื่องจากแอนติเจนหนึ่งๆ จะประกอบด้วยหลาย epitope ดังนั้นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะประกอบด้วยแอนติบอดีหลากหลายชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ epitope ที่แตกต่างกันบนแอนติเจนที่ฉีด ดังนั้นความจำเพาะของแอนติบอดีซีรั่มหลังการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนจึงเป็นผลรวมของปฏิกิริยาของแอนติบอดีแต่ละชนิดที่อยู่ในซีรั่มนั้นกับ epitope บนแอนติเจนนั้นๆ (วัชระ, 2551) นั่นคือ แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) อาจมีบางส่วนไปเหมือนกับ epitope ที่อยู่บนแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศเมีย ดังนั้นหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแอนติบอดีซีรั่มบางส่วนสามารถไปทำปฏิกิริยาได้กับแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศเมีย

จากนั้นแอนติบอดีซีรั่มจากแม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ทั้ง 10 ตัวอย่างได้ถูกนำมาตรวจสอบเพศด้วยวิธี Indirect ELISA ใน WBC ไก่เพศผู้ 10 ตัว และ WBC ไก่เพศเมีย 10 ตัว ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีซีรั่มที่ต้องการตรวจ พบว่าแอนติบอดีซีรั่มจากแม่ไก่ที่ได้รับการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติเจน WBC ไก่เพศผู้ได้ดีกว่าในไก่เพศเมีย หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งที่ 1 จะเห็นความแตกต่างระหว่างสัดส่วนเพศที่เกิดขึ้นยังไม่ค่อยชัดเจน แต่หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นในครั้งที่ 2 และ 3 แล้วเห็นได้ว่าสัดส่วนเพศระหว่างเพศผู้กับเพศเมียนั้นค่อนไปทางเพศผู้ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D$) ก่อนการกระตุ้น (วันที่ 0) และหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 2), ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 8) ของแอนติบอดีซีรั่มจากไก่แม่พันธุ์แต่ละตัวทำปฏิกิริยากับ WBC ในเพศผู้ มีค่าความต่างเฉลี่ย 0.135 ± 0.002, 0.139 ± 0.003, 0.349 ± 0.019 และ 0.455 ± 0.009 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในเพศเมียมีค่า 0.128 ± 0.002, 0.130 ± 0.002, 0.258 ± 0.005 และ 0.359 ± 0.007 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลโดยตรงจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ซึ่งมีความจำเพาะต่อเพศผู้ จึงทำให้แอนติบอดีซีรั่มสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติเจน WBC ของไก่เพศผู้ได้ดีกว่าใน WBC ของไก่เพศเมีย

ในขั้นตอนการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์ม้ามไก่เพศผู้, เซลล์ม้ามไก่เพศเมีย (แอนติเจน) เพื่อนำไปใช้ในการวัดระดับแอนติบอดีต่อ MSA ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า ความเข้มข้นของสารแอนติเจนเซลล์ม้ามไก่เพศผู้, เซลล์ม้ามไก่เพศเมียที่เหมาะสม เท่ากับ 1:50,000 เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยากับซีรั่ม (แอนติบอดี) ส่วนความเข้มข้นของซีรั่ม (แอนติบอดี) ต่อ MSA ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนนั่นอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 1:25,000 ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 1:2,000 เนื่องจาก เมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 1:4,000 ซึ่งประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารแอนติเจนที่น้อยทำให้แอนติบอดีต่อต้านสารแอนติเจนดังกล่าวไม่สามารถแย่งจับกันได้หมด ส่งผลให้ระดับแอนติบอดีที่วัดได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็น แต่ถ้าหากมีระดับแอนติเจนที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ไม่สามารถเคลือบสารแอนติเจนได้ทั้งหมดหรือพื้นที่สัมผัสสำหรับการยึดเกาะของแอนติเจนมีจำกัดทำให้ไม่มีความแตกต่างกันของระดับแอนติบอดีในทางตรงกันข้าม (Crowther, 2001) ดังนั้นสัดส่วนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะต้องมีความเหมาะสมกันของคู่ปฏิกิริยาจึงจะช่วยลดการแปรผลปริมาณแอนติบอดีในซีรั่มที่ผิดพลาดได้

นอกจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA จะมีผลต่อการทำปฏิกิริยาภายนอกร่างกายสัตว์ทดลองแล้ว ยังมีผลต่อตัวสัตว์ทดลองโดยตรงอีกด้วย กล่าวคือผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA สามารถเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของลูกไก่จากแม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ได้ โดยหลังจากการเก็บไข่ของทั้งสองกลุ่มเข้าฟักเป็นระยะเวลา 21 วันโดยเฉลี่ยนั้น พบว่าในการเข้าฟัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของลูกไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มกระตุ้นในสัปดาห์ที่ 2 เป็นระยะที่มีการกระตุ้นในครั้งแรกนั้น สัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่ได้ของทั้งสองกลุ่มยังไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด (0.77 %) (กลุ่มควบคุม 54 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 56 ตัว) ทั้งนี้เนื่องจากร่างกายของสัตว์ทดลองได้รับแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) เข้าสู่ร่างกายเป็นครั้งแรก จึงเป็นช่วงที่ร่างกายมีการสร้างและพัฒนาระบบภูมิคุ้มกัน แต่หลังจากแม่ไก่กลุ่มกระตุ้นได้รับการฉีดกระตุ้นในครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) พบว่าสัดส่วนลูกไก่เพศเมียของกลุ่มกระตุ้นได้เพิ่มขึ้น (13.04 %) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มควบคุม 20 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 26 ตัว) ทั้งนี้เป็นผลต่อเนื่องมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA ในครั้งแรก โดยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของสัตว์ทดลองนั้นเริ่มมีความสามารถที่จะแสดงประสิทธิภาพการทำงานและจดจำแอนติเจนชนิดนั้นๆ ทันที ที่ได้รับแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ชนิดเดิมอีกครั้ง การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิด adaptive immunity ต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) จึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงกว่าการตอบสนองในครั้งแรก (primary immune response) จึงมีผลต่อการเกิดการเอนเอียงของสัดส่วนเพศในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA จากนั้นในสัปดาห์ที่ 6 สัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มกระตุ้นได้ลดลงจากเดิม (1.61 %) (กลุ่มควบคุม 49 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 55 ตัว) แต่ยังคงสูงกว่าสัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มควบคุม และได้เพิ่มสัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มกระตุ้นให้สูงขึ้นอีกครั้ง (3.48 %) (กลุ่มควบคุม 24 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 18 ตัว) หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 8) และต่อเนื่องไปจนถึงสัปดาห์ที่ 10 โดยพบว่าเป็นช่วงที่มีการเกิดการเอนเอียงของสัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA อย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุม กล่าวคือสัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA มีสัดส่วนเพศที่สูงกว่า (50 %) (กลุ่มควบคุม 18 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 5 ตัว) กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการที่สัดส่วนลูกไก่เพศเมียลดลงในสัปดาห์ที่ 6 และสัปดาห์ที่ 8 นั้น อาจเกิดจากการที่ระบบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์ทดลองมีการตอบสนองต่อ MSA ยังไม่เต็มที่ทำให้ประสิทธิภาพของการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันไม่สมบูรณ์ จึงมีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่ไม่ต่อเนื่องในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ได้ แต่หลังจากนั้น (สัปดาห์ที่ 10 ของการเข้าฟัก) สัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เป็นผลจากการที่แม่ไก่ได้รับแอนติเจนตัวเดิมซ้ำในครั้งที่ 3 และระบบภูมิคุ้มกันเกิดการกระตุ้นให้ทำงานอีกครั้งอย่างสมบูรณ์ในช่วงนี้ จึงทำให้สัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่ได้แตกต่างกัน 50 % อย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนลูกไก่เพศเมียในกลุ่มควบคุม จากนั้นประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นแอนติเจนในครั้งที่ 3 ลดลง หลังจากสัปดาห์ที่ 10 (3.85 %) (กลุ่มควบคุม 42 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 16 ตัว) และเริ่มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ในสัปดาห์ที่ 14 (9.64 %) (กลุ่มควบคุม 26 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 27 ตัว) และลดลงอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 16 (1.52 %) (กลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ควบคุม 45 ตัว, กลุ่มกระตุ้น 46 ตัว) แต่ยังคงให้สัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนลูกไก่เพศเมียให้เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ 20 % (กลุ่มกระตุ้น 59.98 ± 5.85 %, n = 249, กลุ่มควบคุม 49.69 ± 1.56 %, n = 278) และการกระตุ้นในแต่ละครั้งจะส่งผลต่อการเอนเอียงของสัดส่วนลูกไก่เพศเมียให้เพิ่มขึ้นทันทีหลังจากร่างกายสัตว์ทดลองได้รับการกระตุ้นและคงประสิทธิภาพในระยะเวลาเพียงสั้นๆ เท่านั้น ดังนั้นการที่ต้องการให้ลูกไก่ที่เกิดขึ้นมีการเอนเอียงของเพศไปทางเพศเมียอย่างสม่ำเสมอ ควรมีการกระตุ้นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในแม่ไก่กลุ่มกระตุ้นนั้นสามารถเพิ่มสัดส่วนหรือสามารถทำให้เกิดการเอนเอียงทางเพศได้เช่นเดียวกับการทดลองของ Blecher *et al.* (1999) ที่ได้ทำการฉีดกระตุ้นกระต่ายเพศผู้และกระต่ายเพศเมียด้วยนำเชื้อแช่แข็งของโคเพศผู้ที่ผสมรวมกับ Freund's adjuvant เพื่อผลิต antisperm antiserea จากกระต่ายเพศผู้และกระต่ายเพศเมีย หรือ anti-Y antisera และ anti-X antisera ตามลำดับ แล้วทำการแยกสเปิร์มจากน้ำเชื้อโคแช่แข็ง จากนั้นทำการผสมสเปิร์มที่แยกได้ด้วย antifemale antiserum พบว่า สเปิร์มบางส่วนเกิดการจับตัวกันจึงได้ทำการแยกสเปิร์มส่วนที่ปนกับน้ำออกแล้วนำมาสผมกับไข่เลี้ยงจนเป็นตัวอ่อน โดยตัวอ่อนมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ภายใน 7 วัน แล้วทำการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากสเปิร์มที่ไม่จับตัวกันให้ผลเป็นลูกโคเพศผู้ถึง 92 % และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gardon *et al.* (2004) ที่ได้ผลิตเอชวายแอนติซีรั่มจากหนู โดยการฉีดกระตุ้นหนู Wistar เพศเมีย ด้วยเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้เข้าสู่ช่องท้องก่อนที่จะมีการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดระดับแอนติซีรั่มที่เกิดขึ้น จากนั้นเตรียมตัวอ่อนในระยะ 4 - 8 เซลล์, ตัวอ่อนระยะน้อยกว่า 32 เซลล์ และตัวอ่อนระยะมากกว่า 32 เซลล์ นำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ของการพัฒนาการของตัวอ่อนระหว่างตัวอ่อนเพศผู้ที่ถูกยับยั้งการพัฒนาและตัวอ่อนเพศผู้ที่มีการเจริญเป็นปกติในตัวอ่อนทั้ง 3 ระยะ โดยพบว่าตัวอ่อนระยะน้อยกว่า 32 เซลล์ ในกลุ่มคอมพลีเมนต์ร่วมกับเอชวายแอนติซีรั่มจะมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของตัวอ่อนเพศผู้ที่ถูกยับยั้งการพัฒนาและตัวอ่อนเพศผู้ที่มีการเจริญเป็นปกติ เท่ากับ 81.9 : 22.6 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับตัวอ่อนระยะมากกว่า 32 เซลล์ ที่มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของตัวอ่อนเพศผู้ที่ถูกยับยั้งการพัฒนาและตัวอ่อนเพศผู้ที่มีการเจริญเป็นปกติ เท่ากับ 81.7 : 24.0 จากงานทดลองทั้งสองเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้เอชวายแอนติเจนมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์และยับยั้งการพัฒนาของตัวอ่อนในเพศที่ไม่ต้องการได้ เช่นเดียวกับการทดลองกระตุ้นในแม่ไก่โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (MSA) ที่สามารถพัฒนาระบบไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศหรือมีผลต่อการเกิดการเอนเอียงทางเพศของไก่ไข่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในแม่ไก่กลุ่มกระตุ้น นอกจากให้ผลที่ดีทางด้านการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของลูกไก่ให้ได้เพศเมียเพิ่มขึ้นแล้ว ยังพบว่าในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA มีผลด้านลบต่อตัวแม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นอีกด้วย คือมีผลต่อสภาพร่างกายและการให้ผลผลิต โดยพบว่าแม่ไก่มีร่างกายที่ซูบโทรมลงหลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) ซึ่งดูได้จากความสมบูรณ์ของกล้ามเนื้อหน้าอกที่ลดลงไปจากเดิม น้ำหนักตัวและน้ำหนักไข่ไก่ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากการสังเกตลักษณะภายนอกแล้ว โดยก่อนการทดลองได้ทำการชั่งน้ำหนักตัวของแม่ไก่ก่อนทำการกระตุ้น พบว่าน้ำหนักตัวของแม่ไก่ในกลุ่มควบคุม (2.29±0.22 กิโลกรัม) มีมากกว่ากลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA (2.07±0.19 กิโลกรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากแม่ไก่ที่ใช้ทำการทดลองมีน้ำหนักตัวค่อนข้างต่างกันในครั้งแรก ดังนั้นจึงทำการขุนแม่ไก่เพื่อให้มีน้ำหนักตัวใกล้เคียงกันก่อนทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA หลังจากการกระตุ้นในครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 2) พบว่าน้ำหนักตัวของไก่กลุ่มควบคุม (2.34±0.19 กิโลกรัม) และกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA (2.11±0.31 กิโลกรัม) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องจากการขุนไก่ในช่วงแรกและเป็นช่วงเริ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อต้าน MSA จึงทำให้น้ำหนักของแม่ไก่ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน แต่หลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 6) และ 3 (สัปดาห์ที่ 8) น้ำหนักไก่ในกลุ่มควบคุม(2.41±0.17, 2.46±0.18 กิโลกรัม ตามลำดับ) เริ่มมากกว่ากลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA (2.13±0.24, 2.21±0.20 กิโลกรัม ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่แม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ได้รับการฉีดกระตุ้นแอนติเจนซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอม เมื่อเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่มากในแต่ละครั้งทำให้ร่างกายเกิดการต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ เช่นเดียวกับการได้รับวัคซีนต่างๆ แต่จะเกิดในระยะเวลาเพียงสั้นๆ เท่านั้น จากนั้นแม่ไก่ก็จะเข้าสู่สภาวะปกติ แต่การกระตุ้นที่บ่อยครั้งรวมไปถึงการดูดเก็บตัวอย่างเลือดในปริมาณที่มากพอ และมีระยะความถี่ในการเก็บเลือดหลังจากการฉีดกระตุ้นเพื่อวัดระดับแอนติบอดีที่เปลี่ยนแปลงในร่าง กายสัตว์ จากกิจกรรมที่ปฏิบัติต่อแม่ไก่ทำให้ต้องมีการสัมผัสและจับตัวแม่ไก่ค่อนข้างบ่อย ด้วยเหตุเหล่านี้สามารถทำให้แม่ไก่เกิดสภาวะเครียดได้ โดย Goldstein (2009) ได้ศึกษางานของ Walter Cannon ศาสตราจารย์ด้านสรีรวิทยา พบว่า เวลาที่คนหรือสัตว์มีอารมณ์เครียดร่างกายจะมีการหลั่งสารเคมี ที่เรียกว่า catecholamines ซึ่งหลั่งมาจากระบบประสาท sympathetic และต่อมหมวกไตส่วนใน (adrenal medulla) โดยเมื่อกระตุ้นต่อมหมวกไตส่วนในจะมีการหลั่งสาร catecholamines (epinephrine และ norepinephrine) ออกมาในกระแสเลือด ซึ่งสารเคมีตัวนี้ออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในร่างกาย ได้แก่ ทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้น ความดันโลหิตสูงขึ้น หายใจเร็ว กล้าม เนื้อหดเกร็ง ร่างกายใช้ออกซิเจนมากขึ้น มีการนำเอาน้ำตาลกลูโคสจากตับไปยังกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร่างกายมีพลังงานในการต่อสู้กับความเครียด Walter Cannon เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยาสู้หรือหนี (Fight Flight response) สารเคมีที่หลั่งออกมาในกระแสเลือดในเวลาเครียด ถ้าเกิดขึ้นในเวลาสั้นๆ เป็นชั่วโมงก็จะเกิดผลดีต่อร่างกาย ทำให้ร่างกายเกิดพลังงานขึ้นสามารถต่อสู้เอาชนะความเครียดได้ แต่ถ้าความเครียดเกิดขึ้นในระยะยาวเกิดเป็นความเครียดเรื้อรังก็จะเป็นผลเสียต่อร่างกายทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาได้ Selye (1950) ได้ศึกษาการตอบสนองของร่างกายเวลามีความเครียด ซึ่งเกี่ยวข้องกับทฤษฎีที่เรียกว่า The General Adaptation Syndrome (GAS) โดยพบว่า ร่างกายจะตอบสนองต่อความเครียดเป็น 3 ระยะ คือ ระยะเตรียมความพร้อม (Alarm reaction) ในระยะแรกเมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น ร่างกายจะเตรียมพร้อมเพื่อต่อสู้กับความ เครียดโดยผ่านทางระบบประสาท sympathetic มีการหลั่ง adrenaline ออกมาทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้น ความดันสูงขึ้น ชีพจรเร็วขึ้น การหายใจเร็ว กล้ามเนื้อตึงตัวขึ้น เลือดจากอวัยวะภายในจะไปเลี้ยงกล้ามเนื้อมากขึ้น ระยะนี้จะเกิดขึ้นช่วงสั้นๆ ในระยะฉุกเฉิน จากนั้นเข้าสู่ระยะต่อต้าน (Resistance stage) เมื่อความเครียดดำรงอยู่นาน ร่างกายจะปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้ แต่การปรับตัวนี้สักระยะหนึ่ง การทำงานของร่างกายจะเริ่มผิดปกติในระบบประสาทและฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อ แต่ยังไม่ปรากฏอาการของโรค ถ้าระยะนี้ดำรงอยู่นานจะปรากฏอาการต่างๆ ให้เห็น เช่น โรคกระเพาะอาหาร โรคลำไส้แปรปรวน โรคหอบหืด โรคความดันโรคหัวใจ โรคต่อมไทรอยด์ทำงานมากเกิน และถ้าระยะนี้อยู่นานก็จะทำให้ภูมิต้านทานของร่างกายเริ่มอ่อนแอลง ติดเชื้อได้ง่ายขึ้น และพัฒนาเข้าสู่ระยะอ่อนล้า (Exhaustion stage) เมื่อร่างกายต่อสู้กับความเครียดอยู่นานก็จะเริ่มอ่อนล้าและมีโรคเกิดขึ้นอย่างชัดเจน การทำงานของระบบประสาท parasympathetic ซึ่งเป็นตัวปรับสมดุลของร่างกายเริ่มทำงานลดลงกว่าปกติ อาการอ่อนล้านี้อาจจะนำไปสู่ภาวะซึมเศร้า ในที่สุดก็จะเสียชีวิตลงได้ ซึ่งอาการบางอย่างที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นได้เกิดขึ้นกับตัวแม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้น เช่น หัวใจ เต้นเร็วขึ้น ความดันโลหิตสูงขึ้น หายใจเร็ว กล้ามเนื้อหดเกร็ง ร่างกายใช้ออกซิเจนมากขึ้น เพื่อต่อสู้กับความเครียดและความกดดันที่เกิดขึ้นกับตัวแม่ไก่เองในขณะที่ผู้ปฏิบัติงานได้มีการกระทำต่อตัวแม่ไก่ ทำให้แม่ไก่เกิดปฏิกิริยาต่อสู้หรือหนีเพื่อความอยู่รอด ซึ่งพฤติกรรมและอาการดังกล่าวจัดเป็นความเครียดระยะเตรียมความพร้อม โดยความเครียดที่เกิดขึ้นกับแม่ไก่จัดเป็นความเครียดทางกายภาพที่เกิดจากการสัมผัสตัว, การถูกจับ, การฉีดกระตุ้นสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการให้วัคซีนหรือยา และการขนส่ง จากการกระทำดังกล่าวทำให้แม่ไก่เกิดความเครียดทางด้านจิตใจตามมา โดยเกิดความหวาดกลัวและระแวงต่อสิ่งต่างๆ ที่เกิดขึ้นรอบข้างไม่ว่าจะเป็นความรุนแรงที่อาจเกิดขึ้นได้จากการจับตัวแม่ไก่เพื่อทำการฉีดกระตุ้น และการดูดเก็บเลือดซึ่งทำให้แม่ไก่ได้รับบาดเจ็บ (Rosales, 1994) ด้วยสาเหตุต่างๆ ที่ได้กล่าวมาล้วนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้แม่ไก่เกิดภาวะเครียดได้ และความเครียดที่เกิดขึ้นมีผลต่อตัวแม่ไก่อย่างมาก โดยทำให้แม่ไก่ไม่กินอาหารเบื่ออาหารและเกิดภาวะขาดสารอาหารตามมา ร่างกายแม่ไก่จึงอ่อนแอ เซลล์ต่างๆ ในร่างกาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่สามารถซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอจากการฉีดกระตุ้นและการดูดเก็บเลือดได้ ด้วยเหตุนี้เป็นผลให้น้ำหนักตัวของแม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ด้วยสาเหตุนี้จึงวางแผนการกระตุ้นในครั้งที่ 3 ช้าออกไปอีก 3 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 8) และจากการวัดระดับแอนติบอดีหลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 3 พบว่าระดับแอนติบอดีที่ตัวไก่สร้างนั้นเพิ่มสูงขึ้นภายหลัง ผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 3 ครั้งนี้ แสดงถึงการตอบสนองของแม่ไก่ในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ได้รับและร่างกายสัตว์ก็ได้รับการพักฟื้นหลังจากที่ได้ยืดระยะเวลาในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันออกไป

ผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ MSA ในแม่ไก่กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA นอกจากทำให้น้ำหนักตัวของแม่ไก่ลดลงแล้วยังส่งผลต่อการสร้างผลผลิตและคุณภาพของไข่ ทั้งนี้เนื่องจากแม่ไก่ได้รับภูมิคุ้มกันต่อ MSA เกิดภาวะเครียด ความอยากอาหารลดลงส่งผลให้แม่ไก่มีสภาพร่างกายที่อ่อนแอไปจากปกติ ด้วยสาเหตุนี้ส่งผลทำให้น้ำหนักไข่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA หลังจากได้รับการกระตุ้นในครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 (44.48±4.00, 45.83±4.05 กรัม ตาม ลำดับ) มีน้ำหนักน้อยกว่าน้ำหนักไข่ในกลุ่มควบคุม (46.23±5.20, 47.52±5.08 กรัม ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับน้ำหนักไข่ไก่ที่ได้จากแม่ไก่ในช่วงที่ยังไม่ได้รับการกระตุ้น และได้รับการกระตุ้นในครั้งแรก ซึ่งน้ำหนักไข่ไก่จากทั้งสองกลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

หลังจากที่แม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ทั้งหมด 3 ครั้ง ได้มีการเก็บไข่ไก่ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มกระตุ้นเข้าฟัก พบว่าในการเข้าฟักไข่ไก่ของกลุ่มควบคุม 92 % (n=492) นั้นมีเปอร์เซ็นต์การฟักออกตรงกำหนด (ระยะเวลาในการฟักไข่ 21วัน) ค่อนข้างดีกว่ากลุ่มกระตุ้น 60 % (n=315) ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกตรงกำหนดลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟักออกที่ช้ากว่ากำหนดไปถึง 4 วัน ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลยกำหนดแค่ 1 วันเท่านั้น โดยมีหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุทำให้ลูกไก่ฟักออกช้าเกินกำหนด ได้แก่ การจัดการฟักไข่ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิในการเก็บรักษาไข่ฟักไม่เย็นพอ, ไข่ฟองใหญ่กว่าปกติ, เก็บไข่ฟักไว้นานเกินไป, อุณหภูมินอกตู้ฟักไม่คงที่, อุณหภูมิในตู้ฟักไข่ต่ำเกินไป, ความชื้นในตู้ฟักไข่ต่ำเกินไป และอุณหภูมิในตู้เกิดต่ำเกินไป แต่เนื่องจากการจัดการฟักไข่ของทั้งสองกลุ่มการทดลองได้จัดการในช่วงระยะเวลา และสถานที่เดียวกัน ดังนั้นปัญหาที่ได้กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับการจัดการฟักไข่นั้นไม่น่าจะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟักออกช้าในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA แต่อย่างใด นอกจากนี้การที่ลูกไก่ฟักออกช้าเกินไปในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA มีผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกี่ยวเนื่องต่ออัตราการตายในกลุ่มทดลองนี้ จากการศึกษาพบว่าอัตราการตายโคมที่เกิดขึ้นในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA มีอัตราลูกไก่ตายโคมเฉลี่ย 3.875 ± 0.934 (n=31, 7 %) ในขณะที่กลุ่มควบคุมนั้นมี 3.375 ± 0.595 (n= 27, 5 %) ซึ่งไม่แตกต่างกันมากแต่อย่างใด ($p > 0.05$) แต่อัตราการตายโคมในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ก็ยังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยความแตกต่างของความสมบูรณ์พันธุ์ สุขภาพ และอาหารที่แม่ไก่ได้รับมีผลต่ออัตราการฟักออกที่แตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งสามารถทำให้เกิดอัตราการสูญเสียได้ตั้งแต่ 30 % ไปจนถึง 87 % (Deeming and Ar, 1999) จากการจัดการไข่ไก่เข้าฟัก พบว่าการตายของตัวอ่อนที่เกิด ขึ้นนั้นอยู่ในระยะที่ 2 ของการฟัก (ช่วงอายุ 8 - 18 วัน) ซึ่งการตายในช่วงนี้เกิดจากการที่ตัวอ่อนขาดโภชนะอาหารเป็นส่วนใหญ่ อาหารและโภชนะอาหารที่แม่ไก่ควรได้รับนั้นมีผลอย่างยิ่งต่อการพัฒนาการของตัวอ่อน พบว่า ระดับวิตามินต่างๆ ที่แม่ไก่ได้รับหากน้อยเกินไปจะทำให้ตัวอ่อนตายมากในระยะนี้ (มานิตย์, 2538) ทั้งนี้แม่ไก่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA นั้นมีปัญหาทางด้านสุขภาพ โดยมีระบบความสมบูรณ์พันธุ์และการเจริญเติบโตของร่างกายต่ำกว่าแม่ไก่ในกลุ่มควบคุม เนื่องจาก ผลจากการถูกรบกวนในระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมไปถึงการที่แม่ไก่ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากสภาวะความเครียดทำให้ความสามารถของความอยากอาหารลดลง จึงกินอาหารได้น้อยลง จากสภาวะขาดสารอาหารนี้ทำให้ร่างกายทำงานผิดปกติไปจากเดิม ส่งผลต่อลูกไก่ให้มีระยะเวลาในการฟักออกที่นานขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีภาวะรบกวนใดๆ จะเห็นได้ว่าการจัดการทางด้านอาหารและน้ำค่อนข้างมีความสำคัญอย่างมากต่อการป้องกันและแก้ไขการเกิดปัญหาความเครียดในแม่ไก่ ซึ่งถ้าการจัดการไม่ดีจะส่งผลต่อตัวแม่ไก่ทำให้เกิดความเครียดอย่างต่อเนื่องจากปัญหาอื่นๆ เป็นสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดความเครียด ส่งผลกระทบต่อการมีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปจากเดิม เช่น การจิกขนกัน ความเจริญเติบโตของร่างกายไม่สม่ำเสมอและมีพัฒนาการช้า ขนหยาบ แข็งกระด้าง ที่สำคัญมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ที่ไม่ดี จึงเป็นสาเหตุทำให้การผลิตไข่ลดลง ความสามารถในการฟักออกต่ำ อัตราการตายของตัวอ่อนสูง และลูกไก่แรกเกิดมีสุขภาพไม่ดี ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมานี้ล้วนแต่เป็นผลมาจากสภาวะการขาดสารอาหารและน้ำ เนื่องจากตัวสัตว์ไม่มีความสามารถที่จะควบคุมศูนย์ความอยากอาหารได้ ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลกระทบมาจากความเครียดในตัวสัตว์ ถ้าแม่ไก่ได้รับการจัดการที่ดีในการป้องกันและลดปัญหาการเกิดความเครียดได้นั้นจะส่งผลดีอย่างมากต่อตัวแม่ไก่ โดยทำให้แม่ไก่และลูกไก่มีความเจริญเติบโตและมีพัฒนาการที่ดี มีความสามารถในการดำรงชีพและมีระบบสืบพันธุ์ที่ดี ส่งผลต่อความสามารถในการฟักออกที่สูง ทำให้ได้ลูกไก่แรกเกิดทีมีสุขภาพดีตามมาด้วย ดังนั้นแนวทางที่จะลดช่วยปัญหาเปอร์เซ็นต์การฟักออก ระยะเวลาของการฟักออกและอัตราลูกไก่ตายโคมลงนั้น นอกจากการจัดการด้านสภาวะแวดล้อมและการจัดการของผู้ปฏิบัติงานแล้ว ยังต้องมีการจัดการทางด้านอาหารและน้ำ ในแม่ไก่กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA อีกด้วย เพื่อป้องกันและแก้ไข

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัญหาความเครียดที่เกิดขึ้นให้ลดลงได้ และสามารถควบคุมเพื่อไม่ให้เกิดเป็นความเครียดระยะยาวจนไปทำลายตัวสัตว์และความสามารถในการดำเนินชีวิตและการให้ผลผลิตได้ โดยการให้อาหารเสริมบางชนิด (feed supplement feeding) ซึ่งได้แก่ การเพิ่มโปรตีนให้สูงขึ้นจากที่ได้รับปกติ หรือกรดอะมิโน เช่น การเสริมปลาป่น เนื้อป่น กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากเมล็ดทานตะวัน และกากมะพร้าว การเสริมแร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ เพื่อไปกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ให้ดีขึ้น ป้องกันรักษาโรค ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอในร่างกาย รวมไปถึงการเกิดความสมดุลของโภชนะในอาหารสัตว์ เช่น วิตามิน B2 หรือ ไรโบฟลาวิน วิตามิน C หรือ กรด ascorbic acid รวมไปถึง Stress vitamin packages ซึ่งประกอบด้วย วิตามิน A, D, E, K, C และ B complex จากการศึกษาของ Kucuk *et al.* (2003) พบว่าการเสริมวิตามิน C และวิตามิน E อย่างละ 250 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในแม่ไก่ มีผลอย่างมากต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว และส่งผลให้แม่ไก่มีความสามารถในการให้ผลผลิตไข่ที่ยาวขึ้น เมื่อเทียบกับการไม่เสริมวิตามินใดๆ และเสริมด้วยวิตามิน C และวิตามิน E อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมวิตามิน C และวิตามิน E มีผลต่อคุณภาพของไข่ที่ได้ โดยทำให้ไข่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น เปลือกไข่หนาและแข็งแรง และที่สำคัญคุณภาพภายในไข่ เช่น โปรตีนไข่ขาว (albumen) ค่อนข้างดี จากการทดลองเห็นได้ว่าการเสริมวิตามินมีผลต่อการแก้ไขปัญหาทางด้านทุพโภชนาการด้านอาหารค่อนข้างสูง นอกจากนี้การกระตุ้นให้สัตว์กินอาหารได้บ่อยๆ โดยการให้น้อยๆ แต่บ่อยครั้ง ให้อาหารที่ใหม่และสดจะทำให้กระตุ้นการกินของไก่ได้ดีขึ้นเนื่องจากมีกลิ่นของอาหารที่ยังหอมและการกระตุ้นด้วยรูปทรงขนาดและสีของเม็ดอาหาร สามารถดึงดูดให้ไก่กินได้มากขึ้น รวมไปการให้น้ำและอาหารที่เพียงพอและครบถ้วนส่งผลต่อระบบการทำงานต่างๆ ภายในร่างกายให้ทำงานได้อย่างปกติและมีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดีขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในแม่ไก่กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยแอนติบอดีซีรั่มที่แม่ไก่ผลิตขึ้นมามีความสามารถในการต่อต้านเม็ดเลือดขาวจากไก่เพศผู้ (ZZ โครโมโซม) ของไก่ไข่ได้ โดยพบว่าแอนติบอดีซีรั่มจากแม่ไก่ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจน WBC ของไก่เพศผู้ได้ดีกว่า WBC ของไก่เพศเมีย หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 3 ครั้ง แล้วเห็นได้ว่าสัดส่วนเพศที่เกิดขึ้นนั้นเอียงไปทางเพศเมียมากกว่าเพศผู้ ซึ่งมีความแตก ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ S.D) ก่อนการกระตุ้น (วันที่ 0) และหลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ในครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 2), ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 8) ของแอนติบอดีซีรั่มจากไก่แม่พันธุ์แต่ละตัวทำปฏิกิริยากับ WBC ในเพศผู้มีค่าความต่างของค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.135 ± 0.002, 0.139 ± 0.003, 0.349 ± 0.019 และ 0.455 ± 0.009 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในเพศเมียมีค่า 0.128 ± 0.002, 0.130 ± 0.002, 0.258 ± 0.005 และ 0.359 ± 0.007 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของลูกไก่ที่มีเพศเมียเพิ่มขึ้น โดยมีผลหลังจากที่แม่ไก่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นการให้แอนติเจนตัวเดิมซ้ำ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้สัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่ได้มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่เกิดขึ้นทั้งหมดใน (สัปดาห์ที่ 2 - สัปดาห์ที่ 16) พบว่าสัดส่วนการเกิดลูกไก่เพศเมียในกลุ่มควบคุม (n = 278) และกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA (n = 249) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นั่นคือ กลุ่มควบคุมมีสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่เกิดขึ้นทั้งหมดเฉลี่ย 49.69 ± 1.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA ที่มีค่าเฉลี่ยถึง 59.98 ± 5.85 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ลูกไก่เพศเมียเพิ่มขึ้นทั้งหมด 20 %

จากการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการทดลองตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้ โดยสรุปได้ว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ในไก่เพศเมียสามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านเม็ดเลือดขาวจากไก่เพศผู้ได้ (ZZ โครโมโซม) โดยสามารถวัดได้ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิค Indirect ELISA ซึ่งเป็นเทคนิคและวิธีการผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ในการเพิ่มสัดส่วนเพศของลูกไก่ในฟาร์มได้อย่างเหมาะสม และการประยุกต์ใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ในไก่ไข่สามารถเพิ่มสัดส่วนเพศลูกไก่ไข่เพศเมียในฟาร์มปศุสัตว์สัตว์ปีกให้ได้มากกว่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการการผลิตสัตว์ปีกที่ต้องการเพิ่มสัดส่วนการเกิดลูกไก่เพศเมียให้สูงขึ้นได้ตามความต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อเสนอแนะ

1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลองควรเป็นไก่ที่เมื่อผสมพันธุ์กันแล้วลูกที่เกิดมาสามารถคัดเพศได้อย่างถูกต้องแม่นยำภายในระยะเวลาที่สั้นโดยไม่ต้องรอให้ลูกไก่โตพอที่จะเห็นความแตกต่างระหว่างเพศ เช่นใช้ไก่พ่อพันธุ์โร๊ดไอส์แลนด์แดง (Rhode Island Red) ผสมพันธุ์กับไก่แม่พันธุ์บาร์พลีมัทร๊อค (Barred Plymouth Rock) หรือไก่แม่พันธุ์ไทยพลีมัทร๊อค (Thai Barred Plymouth Rock) ลูกไก่ที่ได้สามารถคัดเพศได้อย่างถูกต้องทันที โดยดูจากสีขนลูกไก่แรกเกิด (Color sexing /sex linked color) สังเกตได้จากจุดบาร์ที่หัว (pale head spot) หรือลักษณะบาร์ ที่ขนที่กำลังงอก (barred plumage) ในช่วงอายุ 1-2 สัปดาห์ แต่วิธีการคัดเพศนี้จะใช้ไม่ได้ผลกับไก่พ่อพันธุ์บาร์พลีมัทร๊อคที่ผสมพันธุ์กับไก่แม่พันธุ์โร๊ดไอส์แลนด์แดง เพราะลูกไก่ที่ได้มีสีขนปะปนกันไม่สามารถคัดเพศได้ในอายุ 1 วันจะต้องอาศัยการคัดเพศด้วยวิธีอื่นแทน
2. ควรเพิ่มปริมาณสัตว์ทดลองให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการทดลองให้มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น
3. แอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ที่ใช้จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความซับซ้อนของโมเลกุลมากกว่าสารอื่นๆ เนื่องจากว่าโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่หลากหลายชนิดจึงสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าสารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนหรือประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ซ้ำๆ ดังนั้น MSA ที่เลือกใช้จึงเหมาะสมต่อการผลิตแอนติบอดีต่อต้านเม็ดเลือดขาวจากไก่เพศผู้
4. ในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) นั้นจะต้องมีความสด สะอาดและบริสุทธิ์ เพื่อป้องกันการปะปนของกลุ่มโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง หรือกลุ่มสารชนิดอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ ดังนั้นจะต้องผ่านการล้างด้วย Phosphate buffer saline (PBS) เป็นอย่างดีเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งอื่นเจือปน
5. การกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ในแม่ไก่ตัวล่ะ 1 มิลลิลิตร พบว่าเป็นปริมาตรที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในแม่ไก่ ซึ่งการให้แอนติเจนที่มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันลดลง (immunological tolerance)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. จำนวนครั้งของการกระตุ้นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ในแม่ไก่ควรมีการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (มากกว่า 3 ครั้ง) ทั้งนี้มีผลต่อประสิทธิภาพของการผลิตแอนติบอดีต่อต้านเม็ดเลือดขาวจากไก่เพศผู้ต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่เกิดขึ้น
7. เนื่องจาก Freund's complete adjuvant ประกอบด้วย Bayal F ผสมกับเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ตายแล้วเมื่อนำแอนติเจนมาผสมกับ Freund's complete adjuvant จะทำให้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด cell mediated immunity ได้ดีมาก แต่ขณะเดียวกันก็อาจจะส่งผลให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนังและก่อให้เกิดก้อนเนื้อแข็ง (granuloma formution) ขึ้นมาได้ ดังนั้นปริมาณของ Freund's complete adjuvant ที่ใช้ควรให้เหมาะสมกับขนาดของสัตว์ทดลองและในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อตำแหน่งควรใช้ในปริมาณน้อยโดยการเพิ่มจำนวนจุดของการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มากขึ้น จากเดิมที่กำหนดไว้ 4 จุด อาจเพิ่มเป็น 6-10 จุด ซึ่งช่วยทำให้การอักเสบของผิวหนังลดลง
8. การกระตุ้นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) ในแม่ไก่ จะต้องมีการปฏิบัติโดยตรงกับตัวแม่ไก่ เช่น การจับ การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA และการเจาะเลือด ฯลฯ ส่งผลทำให้แม่ไก่เกิดความเครียด ดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานควรมีการจัดการและปฏิบัติต่อตัวแม่ไก่ในขณะทำการทดลองอย่างระมัดระวัง ควรกระทำอย่างอ่อนโยนไม่รุนแรง เพื่อป้องกันไม่ให้แม่ไก่ตื่นตกใจ หวาดกลัว กดดัน จนสามารถเกิดความเครียดและได้รับบาดเจ็บได้
9. ความเครียดส่งผลต่อการลดความอยากอาหารของแม่ไก่ ทำให้น้ำหนักของแม่ไก่ลดลงมีผลต่อสุขภาพของแม่ไก่โดยตรงและมีผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตไข่ไก่ที่ได้ รวมไปถึงสุขภาพของลูกไก่แรกเกิด จึงควรมีการจัดการทางด้านอาหารและอาหารเสริม รวมไปถึงการให้วิตามินต่างๆ เช่น Stress vitamin packages ซึ่งประกอบด้วย วิตามิน A, D, E, K, C และ B complex ทันทีหลังจากการปฏิบัติงานต่อแม่ไก่ เช่น การจับ การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA และการเจาะเลือดจากผู้ปฏิบัติงาน เนื่องจากการจัดการทางด้านต่างๆ ที่ได้กล่าวมามีผลค่อนข้างมากต่อการช่วยป้องกันและลดความเครียดที่เกิดขึ้นกับตัวแม่ไก่ได้
10. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ (Male-specific antigen, MSA) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของลูกไก่ที่มีเพศเมียเพิ่มขึ้นทั้งหมด 20 % นั่นคือ กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ MSA มีค่าเฉลี่ย 59.98±5.85 เปอร์เซ็นต์ (n = 249) ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสัดส่วนลูกไก่เพศเมียที่เกิดขึ้นทั้งหมดเฉลี่ย 49.69±1.56 เปอร์เซ็นต์ (n = 278) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งวิธีการนี้ให้ผลค่อนข้างดีต่อการเพิ่มสัดส่วนเพศเมียของลูกไก่แต่มีข้อเสียในด้านการจัดการสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) กล่าวคือ แม่ไก่ที่ใช้ทดลองมีคุณภาพชีวิตที่ถูกคุกคามจากการปฏิบัติการทดลองจากผู้ปฏิบัติงาน ส่งผลเสียต่อสภาพร่างกายสรีรวิทยาและสภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทางจิตใจของสัตว์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้สัตว์เกิดความกดดันและความเครียดอันเป็นเหตุทำให้สัตว์ไม่สามารถดำรงชีพแบบปรกติสุขได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved