

การพัฒนาวิธีการตรวจออกซีไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ โดยใช้เทคนิคการตรวจวัดบน
กระดาษร่วมกับ Immunogold Silver Enhancement



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2566

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN
DETERMINATION BY PAPER-BASED ASSAY WITH IMMUNOGOLD SILVER ENHANCEMENT



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology
Faculty Of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2023

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ โดยใช้เทคนิคการตรวจวัดบนกระดาษร่วมกับ Immunogold Silver Enhancement
โดย	น.ส.สุจิตรา ต๊ะยามัน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรศักดิ์ โจรนราธา)

สุจิตรา ต๊ะยามัน : การพัฒนาวิธีการตรวจออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ โดยใช้เทคนิคการตรวจวัดบนกระดาษร่วมกับ Immunogold Silver Enhancement. (DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN DETERMINATION BY PAPER-BASED ASSAY WITH IMMUNOGOLD SILVER ENHANCEMENT) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์

โรคหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery Disease, CAD) เป็นโรคไม่ติดต่อชนิดเรื้อรังที่เกิดจากหลอดเลือดแดงที่กล้ามเนื้อหัวใจตีบหรือตัน สาเหตุหลักเกิดจากไขมันและเนื้อเยื่อสะสม มีผลทำให้เยื่อผนังหลอดเลือดชั้นในหนาตัวขึ้นและเกิดการอุดตัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ox-LDL เป็นจุดเริ่มต้นของโรคดังกล่าว เนื่องจากมีคุณสมบัติต่างจาก normal LDL โดยไม่สามารถจับได้กับ LDL receptor ได้ แต่สามารถจับได้กับ scavenger receptor ที่ผิวเซลล์แมคโคฟาจจึงทำให้ ox-LDL สามารถเข้าเซลล์ได้อย่างไม่มีสิ้นสุด เกิดเป็นโฟมเซลล์ (foam cells) สะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดเกิดเป็นรอยขีดไขมัน (fatty streak) ประกอบกับการกระตุ้นเกล็ดเลือดและเซลล์ภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดเป็นลิ่มเลือดอุดตันทางเดินของเส้นเลือด แม้ว่า ox-LDL จะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคแต่การตรวจวัดระดับไขมัน ox-LDL ยังไม่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ เนื่องจากชุดตรวจมีราคาแพง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และยังต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดระดับ ox-LDL ด้วยเทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ immunogold silver enhancement โดยออกแบบกระดาษกรองให้มีรูปแบบเป็น microtiter plate อาศัยเทคนิค wax printing ในการสร้างขอบเขต หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับออกซิไดซ์กระดาษ เพื่อให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการตรึงแอนติบอดี โดยเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นหมู่แอลดีไฮด์ งานวิจัยนี้ได้นำสารละลายลิเทียมคลอไรด์มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการออกซิไดซ์ร่วมกับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท พบว่ากระดาษที่ออกซิไดซ์แล้วสามารถคงสภาพนาน 72 ชั่วโมง และแอนติบอดีที่ตรึงไว้คงสภาพนานที่สุด 4 ชั่วโมง ทดลองวิเคราะห์หัตถปริมาณ std. ox-LDL และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการด้วยสภาวะเทคนิคดังกล่าว พบว่าสีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่ชัดเจน อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของความจำเพาะของแอนติบอดี การทำให้เกิดสีด้วย silver enhancement ซึ่งยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไปเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความชัดเจน นอกจากนี้ได้พัฒนากล่องถ่ายภาพเพื่อใช้เก็บผลการวิเคราะห์บนฐานกระดาษ ที่สามารถถ่ายภาพด้วยแสงและระยะที่คงที่ สามารถเคลื่อนย้ายได้ง่ายในภาคนานม อย่างไรก็ตามแม้การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ox-LDL ยังไม่ประสบผลสำเร็จ แต่ยังพอมองเห็นแนวทางและต้นแบบในการศึกษาต่อไปในอนาคต

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2566	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6270013337 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Coronary Artery Disease ox-LDL Paper based assay

Sujitra Tayamun : DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OXIDIZED LOW-DENSITY LIPOPROTEIN DETERMINATION BY PAPER-BASED ASSAY WITH IMMUNOGOLD SILVER ENHANCEMENT .

Advisor: Asst. Prof. RAVEENAN MINGPAKANE, Ph.D.

Coronary Artery Disease (CAD) is a chronic Non-Communicable Disease (NCD) caused by obstruction in the arteries that supply the heart muscle. Previous studies found that ox-LDL is the starting point for such diseases. Due to it having properties different from normal LDL, it cannot be uptake by LDL receptors, but it can be taken up by scavenger receptors on macrophages. Scavenger receptors uptake ox-LDL continuously and become lipid-laden. Plaque formation originates from the accumulation of cholesterol, platelets, and immune complexes which can obstruct blood circulation. Although ox-LDL is an important cause of disease, ox-LDL level measurement is not available in a routine laboratory due to the cost, time consumption, and specialized equipment required. Therefore, the objective of this study is to develop a method for ox-LDL determination by paper-based assay with immunogold silver enhancement by designing filter paper in a microtiter plate pattern using a wax printing technique to create boundaries. Find suitable conditions for antibody immobilization by oxidizing paper. This research used lithium chloride solution to increase oxidation efficiency together with sodium periodate solution to change cellulose into an aldehyde group. It was found that the oxidized paper was stable for 72 hours and the immobilized antibody was stable for as long as 4 hours. Experiments were conducted to measure the level of std. ox-LDL and in-house ox-LDL such it was found that the color of the reaction that occurred was not clear. Due to the limitations of this study including the specificity of the antibody and silver enhancement technique. In addition, a photographic box has been developed to store analysis results on a paper base that can take pictures with constant light and distance and is easily moved in the field. However, even the development of a method for ox-LDL determination has not been successful. However, there are still enough guidelines as a prototype for further study.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2023 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ อันเนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลือของ ผศ.ดร.ระวีพันธ์ มิ่งภักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ซึ่งให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้ความเอาใจใส่ร่วมแก้ไข ปัญหาต่าง ๆ และสนับสนุนให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าตลอดมาในทุก ๆ ด้าน จนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิริพร ชี้อิวาลกุล ประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.ธีรศักดิ์ ไรจนราธา กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล และคณะที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ แนวทางการพัฒนางานวิจัยให้ดียิ่งขึ้น และให้ความช่วยเหลืออนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี แก่ ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ของหน่วยปฏิบัติการบริการ วิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สิ่งส่งตรวจที่ เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ เพื่อนำมาทดลองใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรในคณะสหเวชศาสตร์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก ที่ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สุจิตรา ต๊ะยามัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
3. ขอบเขตงานวิจัย.....	3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. โรคหัวใจและหลอดเลือด.....	4
2. ไกลโคโปรตีน.....	6
2.1 ลักษณะทั่วไปของ LDL.....	8
2.2 กระบวนการสร้าง LDL.....	8
2.3 Oxidized – LDL.....	9
2.4. ความสัมพันธ์ระหว่าง ox-LDL กับโรคหลอดเลือดหัวใจ.....	12
2.5 การตรวจวิเคราะห์ระดับ ox-LDL.....	15
3 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษ.....	18
3.1 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษ.....	18

3.2 เทคนิค ELISA บนฐานกระดาษ	19
3.3 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ immunogold silver enhancement	20
3.4 หลักการของ silver enhancement.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.1.1 ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน	24
3.1.2 สิ่งส่งตรวจ.....	24
3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	24
3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.2.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ประดิษฐ์กล้องถ่ายภาพ	25
3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.2.5 แอนติเจน และแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.2.6 สูตรที่ใช้คำนวณค่าความเข้มสี.....	26
3.3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.3.1 การผลิตอุปกรณ์ต้นแบบบนฐานกระดาษ.....	27
3.3.1.1 การผลิตอุปกรณ์ต้นแบบบนฐานกระดาษ โดยเทคนิคการพิมพ์แวกซ์.....	27
3.3.1.2 การทดสอบระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการละลายแวกซ์บนกระดาษ27	
3.3.1.3 การทดสอบหาปริมาตรสารที่เหมาะสม	28
3.3.2 การทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการออกซิไดซ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐาน กระดาษ.....	28
3.3.2.1 การทดสอบเพื่อหาความเข้มขั้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเพอร์รืออ เดท.....	29
3.3.2.2 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลาย โซเดียมเพอร์รืออเดท	30

3.3.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษ	30
3.3.2.4 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลายผสม	31
3.3.3 การตรึงแอนติบอดี	32
3.3.3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่มสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์	32
ในการช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ	32
3.3.3.2 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่ม 1° Ab (anti ox-LDL)	32
3.3.3.3 การทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษ	33
3.3.3.3.1 การทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษภายหลังจากออกซิไดซ์	33
3.3.3.3.2 การทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษ ภายหลังจากตรึงแอนติบอดี	33
3.3.3.4 การส่งทดสอบ FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer)	34
3.3.4 การทดลอง Paper base immunoassay	35
3.3.4.1 แอนติบอดีคู่ที่ 1 ทดสอบระหว่าง 1° Ab: anti ox-LDL (Abcam) กับ 2° Ab: gold conjugated anti Apo B (Abcam)	35
3.3.4.1.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab (anti ox-LDL)	35
3.3.4.1.2 การทดสอบกับ std. ox-LDL	36
3.3.4.1.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ gold conjugated anti apo B	37
3.3.4.2 การทดสอบกับแอนติบอดีคู่ที่ 2 ระหว่าง 1° Ab: anti-HNE (goat/polyclonal/Bethyl Laboratories และ 2° Ab: gold conjugated anti apo B-100 Ab (mouse/monoclonal/ Santa Cruz)	38
3.3.4.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti HNE (1° Ab) ...	38

4.1.2.4 ผลการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลาย ผสม	51
4.1.3 ผลการตรึงแอนติบอดี	53
4.1.3.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารละลาย โซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดต์ ในการช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ.....	53
4.1.3.2 ผลการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่ม 1° Ab (anti ox-LDL)	54
4.1.3.3 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษ.....	56
4.1.3.3.1 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษภายหลังจากออกซิไดซ์..	56
4.1.3.3.2 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษ ภายหลังจากตรึง แอนติบอดี.....	57
4.1.3.4 ผลการส่งทดสอบ FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) ...	59
4.1.4 ผลการทดลอง Paper base immunoassay.....	60
4.3.4.1 ผลการทดสอบแอนติบอดีชุดที่ 1 ระหว่าง anti ox-LDL (Abcam) กับ gold conjugated anti Apo B (Abcam)	60
4.1.4.1.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab (anti ox- LDL).....	60
4.3.4.1.2 ผลการทดสอบกับ std. ox-LDL	61
4.1.4.1.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab (gold conjugated anti apo B) มี 2 การทดลอง	63
4.1.4.2 ผลการทดสอบกับแอนติบอดีชุดที่ 2 ระหว่าง 1° Ab: anti HNE (goat/polyclonal/Bethyl Laboratory) กับ 2° Ab: anti apo B-100 (mouse/monoclonal/Santacruz)	66
4.3.4.2.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab.....	66
4.1.4.2.2 ผลการทดสอบเปรียบเทียบกระดาษกรองแต่ละชนิด	73

4.1.4.2.2.1 ผลการเปรียบเทียบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษกรองแต่ละชนิด	73
4.1.4.2.2.2 ผลการเปรียบเทียบการวัด ox-LDL บนกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิด	75
4.1.4.2.2.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2.....	81
4.1.4.2.2.4 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม ox-LDL และ 2° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2	82
4.2 ผลการประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพ	84
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	86
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	86
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	90
ภาคผนวก.....	103
บรรณานุกรม.....	111
ประวัติผู้เขียน	121

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด.....	6
ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบหลักของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด.....	7
ตารางที่ 3 แสดงค่าอ้างอิง ox-LDL ในกลุ่มคน 2 กลุ่ม.....	14
ตารางที่ 4 แสดงค่าอ้างอิง ox-LDL ในกลุ่มคน 4 กลุ่ม.....	14
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบ 4 วิธีการตรวจวัดระดับ ox-LDL.....	17
ตารางที่ 6 แสดงการคำนวณเพื่อเจือจางสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	29
ตารางที่ 7 แสดงการคำนวณเพื่อเจือจางสารละลายผสม	31
ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดของสารที่ใช้ในแต่ละครั้งของการทดลองที่ 3.3.4.2.1.....	39
ตารางที่ 9 แสดงรายละเอียดของสารที่ใช้ในแต่ละครั้งของการทดลองที่ 3.3.4.2.2.....	41
ตารางที่ 10 แสดงรายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัย	87

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะหลอดเลือดที่มีก้อนพลาต.....	4
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ LDL.....	8
รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างที่เปลี่ยนไปของ ox-LDL	9
รูปที่ 4 แสดงการเกิด Schiff base ของไขมัน	10
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของส่วนประกอบของ ox-LDL ที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับ normal LDL.....	11
รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง oxidized-LDL กับการเกิดโฟมเซลล์	13
รูปที่ 7 แสดงหลักการ ELISA เพื่อตรวจวัดระดับ ox-LDL ในแต่ละวิธี	16
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ immunogold silver enhancement	22
รูปที่ 9 แสดงภาพจำลองการเกิดอะตอมของธาตุเงิน	23
รูปที่ 10 แสดงวิธีการและรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ	27
รูปที่ 11 แสดงรูปแบบกระดาษ แผ่นอลูมิเนียม และลักษณะการให้ความร้อนบนกระดาษ	28
รูปที่ 12 แสดงสี และลักษณะของวงทดสอบที่ใช้ปริมาตรแตกต่างกัน	28
รูปที่ 13 แสดงลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้ในการยึดติด ครอบกระดาษ และแผ่นซับขณะหยดล้าง.....	30
รูปที่ 14 แสดงการนำกล้องรักษาความชื้นมาใช้ในการทดลอง	33
รูปที่ 15 แสดงเครื่องมือและรูปแบบของกระดาษก่อนนำไปทดสอบ FTIR assay.....	35
รูปที่ 16 แสดงหลอดไฟแต่ละชนิด ที่นำมาประดิษฐ์กล้องถ่ายภาพแต่ละรุ่น	43
รูปที่ 17 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการประดิษฐ์กล้องถ่ายภาพ.....	44
รูปที่ 18 แสดงตัวอย่างรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษหลังพิมพ์แว็กซ์	45
รูปที่ 19 แสดงลักษณะการให้ความร้อนบนกระดาษ.....	46
รูปที่ 20 แสดงสีและลักษณะของวงทดสอบที่ใช้ปริมาตรแตกต่างกัน	46

รูปที่ 21 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาศด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท ที่เวลา 1 ชั่วโมง.....	47
รูปที่ 22 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท บ่มที่เวลา 1 ชั่วโมง.....	48
รูปที่ 23 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาศด้วย 0.5 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท เวลาต่างๆ	49
รูปที่ 24 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) กับเวลาต่าง ๆ เมื่อออกซีไดซ์กระดาศด้วย 0.5 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท.....	49
รูปที่ 25 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาศ ด้วยสารละลายผสม ที่เวลา 1 ชั่วโมง.....	50
รูปที่ 26 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ที่ผสมอยู่กับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท เข้มข้น 0.4 โมลาร์..	51
รูปที่ 27 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาศ ด้วยสารละลายผสม	52
รูปที่ 28 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับระยะเวลาการบ่มด้วยสารละลายผสม.....	52
รูปที่ 29 แสดงผลการตรึงแอนติบอดีบนกระดาศ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ ที่ระยะเวลา 20 30 50 นาที ภายหลังจากการหยุดแอนติบอดี ...	53
รูปที่ 30 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดด์ ที่ระยะเวลา 20 30 50 นาที.....	54
รูปที่ 31 แสดงผลการบ่มแอนติบอดีบนกระดาศที่ระยะเวลาต่าง ๆ	55
รูปที่ 32 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับระยะเวลาต่าง ๆ ของการบ่มแอนติบอดี	55
รูปที่ 33 แสดงผลการทดสอบสภาพความคงอยู่ของหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาศ.....	56
รูปที่ 34 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับระยะเวลาต่าง ๆ ที่ตั้งกระดาศไว้ ภายหลังจากถูกออกซีไดซ์.....	57
รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาศเพื่อตรวจสอบสภาพความคงอยู่ของแอนติบอดีเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	58

รูปที่ 36 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี ΔRGB กับระยะเวลาต่าง ๆ ที่ทิ้งกระดาษไว้หลังจากถูกตรึงแอนติบอดี.....	58
รูปที่ 37 แสดงผลการทดสอบ FTIR assay.....	59
รูปที่ 38 แสดงผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab.....	60
รูปที่ 39 แสดงผลการทดสอบครั้งที่ 1 กับ std. ox-LDL	61
รูปที่ 40 แสดงผลการทดสอบที่ 2 กับ std. ox-LDL.....	62
รูปที่ 41 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 1	63
รูปที่ 42 แสดงผลบนกระดาษเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ทดสอบครั้งที่ 2.....	64
รูปที่ 43 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 2	65
รูปที่ 44 แสดงผลของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 3.....	66
รูปที่ 45 แสดงผลปฏิกิริยาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 1.....	67
รูปที่ 46 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 1.....	68
รูปที่ 47 แสดงผลปฏิกิริยาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 2.....	69
รูปที่ 48 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 2.....	70
รูปที่ 49 แสดงผลปฏิกิริยาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 3.....	71
รูปที่ 50 แสดงกราฟหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบครั้งที่ 3.....	72
รูปที่ 51 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 3.....	72
รูปที่ 52 แสดงผลการทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษแต่ละชนิด ด้วย anti HNE 1:500.....	74
รูปที่ 53 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี ระหว่างก่อนและหลังตรึงแอนติบอดี anti HNE 1:500 บนกระดาษแต่ละชนิด.....	74
รูปที่ 54 แสดงผลการทดสอบการวัด ox-LDL ครั้งที่ 1 บนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3).....	76
รูปที่ 55 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3)..	76
รูปที่ 56 แสดงกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3) ครั้งที่ 1	77

รูปที่ 57 แสดงผลของการทดสอบปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 บนกระดาษเบอร์ 1 และ 2.....	78
รูปที่ 58 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 และ 2) ผลครั้งที่ 2.....	78
รูปที่ 59 แสดงกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยาบนกระดาษเบอร์ 2 ผลครั้งที่ 2	79
รูปที่ 60 แสดงผลของการทดสอบปฏิกิริยา ครั้งที่ 3 บนกระดาษเบอร์ 2	80
รูปที่ 61 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยา ผลครั้งที่ 3 บนกระดาษ เบอร์ 2	80
รูปที่ 62 แสดงผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2 เมื่อตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:250 1:500 1:1000.....	81
รูปที่ 63 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2 (Gray scale) เมื่อ ตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:250 1:500 1:1000	82
รูปที่ 64 แสดงผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ เมื่อทดลองบ่ม ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ และ 2° Ab anti apo B-100 ที่ระยะเวลา 30 45 60 นาที.....	83
รูปที่ 65 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2	83
รูปที่ 66 แสดงรูปแบบอุปกรณ์ถ่ายภาพ ทั้ง 3 โมเดล	84
รูปที่ 67 แสดงรูปแบบอุปกรณ์สำหรับใช้ถ่ายภาพ โมเดล #3.....	85
รูปที่ 68 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายที่ได้จากกล้องถ่ายภาพ	85
รูปที่ 69 แสดงแผนภาพการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษของงานวิจัย	89
รูปที่ 70 แสดงตัวอย่างสีของปฏิกิริยาของการทดสอบด้วยน้ำยาเฟห์ลิง	91
รูปที่ 71 แสดงปฏิกิริยาการเกิดพันธะ imine	92
รูปที่ 72 แสดงผลการทดสอบน้ำยาจากชุด ELISPOT บนกระดาษกรอง	93
รูปที่ 73 แสดงโครงสร้างของแอนติบอดี.....	94
รูปที่ 74 แสดงลักษณะผลการนำเอา PVDF membrane และ nitrocellulose membrane มา ประยุกต์ใช้	95
รูปที่ 75 แสดงองค์ประกอบของโครงสร้างของอนุภาค LDL ที่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้	96

รูปที่ 76 แสดงการนำแอนติบอดีชนิด ๆ มาทดสอบวัด ox-LDL ด้วยเทคนิค ELISA.....	98
รูปที่ 77 แสดงลักษณะกระดาษก่อนและหลังล้าง 2° Ab และสีของ softex หลังหยด silver enhancement	101
รูปที่ 78 แสดงลักษณะการทดลองก่อนและหลังการหยดล้างบนผ้าก๊อซ.....	105
รูปที่ 79 แสดงลักษณะการทดลองก่อนและหลังการหยดล้างบนแผ่นรองซับชนิดมีเจล.....	106
รูปที่ 80 แสดงขั้นตอนโดยย่อของการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำ	107
รูปที่ 81 แสดงวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax รุ่น ABS Plus	108
รูปที่ 82 แสดงขั้นตอนการแยกอนุภาคไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL).....	109



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคกลุ่มไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable Disease, NCD) เป็นโรคที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อแต่เป็นโรคที่สัมพันธ์กับพฤติกรรมกรรมการดำเนินชีวิต และยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในอันดับต้น ๆ และยังก่อให้เกิดค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง โรคในกลุ่ม NCD ประกอบด้วย โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคอ้วน โรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery Disease, CAD) หรือโรคหัวใจขาดเลือด (Ischemic Heart Disease, IHD) เป็นต้น โดยจากรายงานสถิติขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในปี 2559 พบว่า กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของคนทั่วโลก มีผู้เสียชีวิตจากกลุ่มโรคนี้ประมาณ 17.9 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 31 ของอัตราการตายจากทั่วโลก (1) นอกจากนี้ในประเทศไทย ซึ่งในปี พ.ศ. 2560 กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข มีการประมาณสถานการณ์จำนวนผู้เสียชีวิต จากโรคดังกล่าวถึงร้อยละ 12 จากสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมด และในปี 2561 มีอัตราความชุกผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจในประชากรอายุ 15 ปีขึ้นไปมากกว่าจำนวนผู้ป่วยรวมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 – 2561 (2) สาเหตุของการเกิดโรคเกิดจากหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจตีบหรือตัน ได้แก่ โรคอ้วน โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน การสูบบุหรี่ และภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ได้แก่ ระดับ ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และไขมันไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำในเลือดสูง แต่ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง มีระดับต่ำ LDL ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ กลายเป็น ox-LDL ซึ่งสาเหตุสำคัญเกิดจากการออกตันของก้อนไขมันหรือก้อนพลาซมา ซึ่งเกิดจากไขมันชนิด ox-LDL ที่เกิดจากกระบวนการออกซิไดซ์ LDL ด้วยสารอนุมูลอิสระที่อยู่ภายในร่างกายและสิ่งแวดล้อม (3, 4) โดยปกติ LDL จะจับกับ LDL receptor เพื่อนำเอาเซลล์กลับเข้าสู่เซลล์ตับซึ่งเป็นกระบวนการนำกลับของ LDL ภายในร่างกาย (5) แต่เนื่องจาก ox-LDL มีโครงสร้างที่เปลี่ยนไปจากการถูกออกซิไดซ์ จึงทำให้ไม่สามารถจับได้กับตัวรับดั้งเดิมได้ แต่สามารถไปจับอยู่กับตัวรับบน scavenger receptor หรือตัวรับ acetyl LDL receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์แมคโครฟาจได้อย่างรวดเร็วและไม่มีที่สิ้นสุด เกิดการสะสมของคอเลสเตอรอลภายในเซลล์จนกลายเป็นโฟมเซลล์ (6) ที่ไปเบียดเสียดอยู่ภายในหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดเกิดการฉีกขาด เกิดเป็นภาวะอักเสบเกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เกิดการเคลื่อนของเซลล์โมโนไซต์เข้าสู่บริเวณดังกล่าว และเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์แมคโครฟาจไปจับกับ ox-LDL จนเป็นก้อนพลาซมาไปอุดตันกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน นอกจากนี้ ox-LDL ยังมีความเป็นแอนติเจนที่สามารถไปกระตุ้นให้ร่างกายเกิดการสร้างแอนติบอดี จากการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างทำให้เกิดเป็น neoantigen ที่ epitope ของ ox-LDL และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ox-LDL เป็นสาเหตุหลักและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีตลอดจนสามารถเป็นตัวชี้วัดกลุ่มโรคเมตาบอลิกซินโดรม (7) ได้อีกด้วย

ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ระดับ ox-LDL ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากชุดตรวจมีราคาค่อนข้างสูง ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ตลอดจนจำเป็นต้องมีเครื่องมือที่มีความจำเพาะ วิธีทั่วไปที่ใช้ตรวจเป็นเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้ monoclonal antibodies (mAbs) เช่น E06, FOH1a/DLH3 และ 4E6 (8, 9) และเมื่อมีการเติมสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาลงไป เอนไซม์จะย่อยสารตั้งต้นเกิดการเปลี่ยนสี ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากัน นำไปวัดผลโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) แม้ว่าหลักการ ELISA จะมีความจำเพาะและแม่นยำสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดของราคา ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตลอดจนความคงทนของเอนไซม์ที่ใช้ จึงเป็นข้อจำกัดของการนำมาใช้เป็นการทดสอบทั่วไปในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคอื่นเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจวัดระดับ ox-LDL ได้แก่ เทคนิค Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (10) เทคนิค Diene ที่ไปจับกับพันธะคู่ของ polyunsaturated fatty acid (PUFA) (11) เทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (12) เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) (13) เทคนิค Mass spectrometry (MS) (14) ต่อมาในปี 2012 จำรัสและคณะได้คิดค้นวิธีการตรวจ ox-LDL โดยใช้เทคนิค piezoelectric-based biosensor (15) แม้เทคนิคดังกล่าวจะเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำ ลดระยะเวลาได้ แต่ยังคงใช้เครื่องมือที่จำเพาะในการวิเคราะห์

เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษ (paper-based assay) เป็นหนึ่งในเทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย เนื่องจากเป็นวัสดุหาง่าย ราคาถูก มีความสามารถให้สารซึมผ่าน สามารถมองเห็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่า และยังสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างทางชีวภาพได้ ในปี 2010 Cheng และคณะได้นำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค ELISA ทดแทนการใช้ธาตุหลุม พบว่าสามารถลดงบประมาณ สารและตัวอย่าง รวมไปถึงลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (16) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ทางคลินิกได้ ซึ่งเป็นหนึ่งในอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ณ จุดที่ทำการรักษาหรือทดสอบ (point of care testing, POCT) สามารถทำการทดสอบภายนอกห้องปฏิบัติการได้ และให้ผลการทดสอบรวดเร็ว เช่น การตรวจวิเคราะห์หมู่เลือด (17) โรคระบาด (18, 19) งานแบคทีเรีย (20) งานอิมมูน (21) เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับ ox-LDL เพื่อลดระยะเวลา ต้นทุน ปริมาณน้ำยา และเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ให้มีความสะดวกมากขึ้น โดยการประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับเทคนิค immunogold silver enhancement

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ต้นแบบสำหรับตรวจวัดระดับ ox-LDL ด้วยเทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ Immunogold Silver Enhancement เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวัดด้วยเทคนิคประยุกต์เชิงสร้างสรรค์ต่อไปในอนาคต ที่สามารถใช้งานได้จริง สะดวก รวดเร็ว

3. ขอบเขตงานวิจัย

ผู้วิจัยทำการพัฒนาต้นแบบอุปกรณ์และเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ox-LDL ด้วยวิธีการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ Immunogold silver enhancement จากตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (std. ox-LDL) และตัวอย่าง ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ (ตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ของหน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์ สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

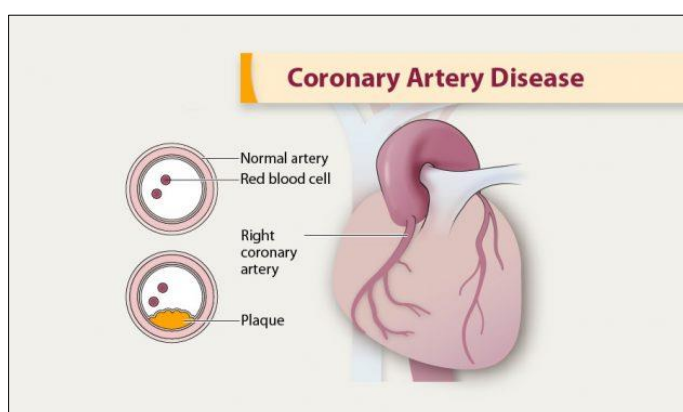
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ได้ต้นแบบอุปกรณ์ชุดวิเคราะห์ ox-LDL ด้วยวิธีการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ Immunogold silver enhancement เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดอุปกรณ์การตรวจวิเคราะห์ที่จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับของ ox-LDL ใช้ในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ทั่วไป รวมถึงการใช้ออกตรวจภาคสนามต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคหัวใจและหลอดเลือด



รูปที่ 1 แสดงลักษณะหลอดเลือดที่มีก้อนพลาต (22)

โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) เป็นคำที่ใช้แทนของโรคทุกประเภทที่มีผลต่อหัวใจหรือหลอดเลือด รวมไปถึงโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารีหรือหลอดเลือดแดงอุดตัน หรือโรคหัวใจขาดเลือด ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากหลอดเลือดแดงที่เลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจตีบหรือตัน ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจได้รับเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ ส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานผิดปกติ เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด หรือภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) เป็นสาเหตุให้เกิดหัวใจวายเฉียบพลัน (Heart attack) โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคหัวใจแต่กำเนิด (Congenital heart defects) และโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลาย (Peripheral artery disease) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากไขมันที่ไปสะสมที่ผนังหลอดเลือดแดงด้านใน และยังไปกระตุ้นทำให้เกิดลิ่มเลือดอุดตันเส้นเลือด และเนื้อเยื่อสะสมอยู่ในผนังของหลอดเลือด ส่งผลให้เยื่อผนังหลอดเลือดชั้นในตำแหน่งนั้นหนาตัวขึ้นจากการสะสมของไขมันและโมเลกุลอินทรีย์อื่น ๆ เกิดการพัฒนากลายเป็นก้อนไขมันหรือพลาต (Plaque) ไปอุดตันขวางทางเดินของหลอดเลือดส่งผลให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนในเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจลดลง (23) โดยกระบวนการเกิดก้อนพลาตเรียกว่า Atherosclerosis ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการปวดแค้นที่หน้าอก (หรือเรียกว่า angina) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหัวใจวายเฉียบพลัน (22) โดยคำว่า Atherosclerosis มาจากภาษากรีกโบราณ sclerosis แปลว่า แข็ง และคำว่า athero แปลว่า การสะสมของไขมันหรือลักษณะเหนียว ๆ (gruel)

อาการทั่วไปของโรคหลอดเลือดหัวใจ ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมักจะไม่ทราบว่ามีภาวะผิดปกติเกิดขึ้น จนกว่าเส้นเลือดมีการอุดตันจนเลือดไม่สามารถไหลได้ตามปกติจึงปรากฏอาการ ผู้ป่วยจะมีอาการปวดแสบที่บริเวณหัวใจ อาจร้าวไปที่แขน ไหล่ซ้าย ข้อศอก หรือไปที่หลัง และอาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น หายใจลำบาก แน่นหน้าอก ใจสั่น หน้ามืดคล้ายจะเป็นลม เหงื่อออกมาก ซีด ซึ่งผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการขยายหลอดเลือดด้วยยา หรือการผ่าตัด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาการ สำหรับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค ได้แก่ พันธุกรรมและเชื้อชาติ เพศ อายุ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง พฤติกรรมการดำเนินชีวิต เช่น การสูบบุหรี่ การออกกำลังกาย การรับประทานอาหาร การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำหนักเกินเกณฑ์ รวมไปถึงความเครียด และที่ประการสำคัญคือ ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia)

สาเหตุหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจเกิดจากระดับไขมันในเลือดที่ไม่เหมาะสม กล่าวคือมีระดับคอเลสเตอรอลรวม หรือระดับ LDL-C สูง และ/หรือระดับ HDL-C ต่ำ และ/หรือระดับไตรกลีเซอไรด์สูง จากคำแนะนำของ National Cholesterol Education Program (NCEP) โดย National Institute of Health (NIH) สหรัฐอเมริกา ได้แนะนำเกี่ยวกับระดับไขมันในเลือดที่เหมาะสม ได้แก่ คอเลสเตอรอล ต่ำกว่า 200 มก./ดล. ระดับไตรกลีเซอไรด์ ต่ำกว่า 150 มก./ดล. ระดับ HDL-C สูงกว่า 40 มก./ดล. และระดับ LDL-C ต่ำกว่า 100 มก./ดล. (24) สำหรับปัจจัยเสี่ยงอื่นของการเกิดหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ เพศ อายุ ประวัติของการสูบบุหรี่ ดื่มสุรา โรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน ชนิดที่ 2 โรคความดันโลหิตสูง ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) รวมทั้งพฤติกรรมบางอย่างที่ไม่เหมาะสม เช่น การไม่ออกกำลังกายจนทำให้เกิดภาวะอ้วนลงพุง รับประทานอาหารรสจัดปริมาณมากเป็นประจำ เช่น หวาน มัน เค็ม ตลอดจนประวัติครอบครัวที่ป่วยเป็นโรคหัวใจ และยังสามารถเกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ เช่น *Chlamydia pneumoniae* (25)

ปัจจุบันการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับอาการและความรุนแรงของโรค เช่น การรักษาโดยการให้ยา การผ่าตัด การขยายหลอดเลือดหัวใจด้วยบอลลูน แสงเลเซอร์และด้วยการใช้หัวกรอ การผ่าตัดต่อหลอดเลือดเพื่อแทนหลอดเลือดหัวใจช่วงที่อุดตัน ทั้งนี้แม้ว่าพันธุกรรม เพศ อายุ จะเป็นสาเหตุของโรค โดยเพศชายจะมีความเสี่ยงมากกว่าเพศหญิง เพศชายที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป และเพศหญิงที่มีอายุมากกว่า 55 ปีขึ้นไป แต่ประมาณร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยจะมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมในชีวิตประจำวัน ดังนั้นแนวทางที่ดีในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจควรที่จะรับประทานอาหารให้ครบ 5 หมู่ ทานผัก ผลไม้เป็นประจำ ไม่สูบบุหรี่ งดดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และควรรับการตรวจความดัน น้ำตาล และไขมัน ซึ่งเป็นตัวการสำคัญอย่างสม่ำเสมอเพื่อประเมินความเสี่ยงและติดตามโรคได้ (26)

2. ไลโปโปรตีน

ไลโปโปรตีนเป็นพลาสมาโปรตีนประกอบด้วยไขมันและส่วนที่เป็นโปรตีน เรียกว่า อะโปโปรตีน (apoprotein) แกนกลางประกอบด้วยไขมันที่ไม่มีหัว ล้อมรอบด้วยพอสฟอลิพิด ซึ่งเป็นส่วนที่มีหัว จึงทำให้อนุภาคไลโปโปรตีนสามารถขนส่งไปในกระแสเลือดได้ ไลโปโปรตีนเป็นอนุภาคมีหน้าที่หลักในการขนส่งไขมันชนิดต่าง ๆ ไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ไลโปโปรตีนที่พบในพลาสมามีความหลากหลายทั้งในด้านขนาด ความหนาแน่น การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ตลอดจนสัดส่วนของคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์รวมไปถึงชนิดของอะโปไลโปโปรตีน ไลโปโปรตีนแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของไขมันกับโปรตีนที่แตกต่างกัน จึงทำให้ไลโปโปรตีนมีความหนาแน่นแตกต่างกัน ไลโปโปรตีนที่มีไตรกลีเซอไรด์ในอนุภาคสูง จะส่งผลให้ส่วน core ของไลโปโปรตีนใหญ่ขึ้น ขนาดอนุภาคไลโปโปรตีนจึงเพิ่มตามไปด้วย นอกจากนี้ไลโปโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่สูง จะมีปริมาณสัดส่วนไขมันมากกว่าโปรตีน จึงทำให้ไลโปโปรตีนชนิดนี้มีความหนาแน่นต่ำ ในทางกลับกันไลโปโปรตีนที่มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ต่ำ จะมีขนาดเล็กและมีสัดส่วนของไขมันต่อโปรตีนต่ำจึงทำให้มีความหนาแน่นสูง ด้วยเหตุนี้โคเลโมครอนจึงมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์สูงที่สุดและมีขนาดใหญ่ที่สุด ตามมาด้วย VLDL และ LDL ตามลำดับ (สัดส่วนของคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นตามลำดับ) ส่วน HDL จะมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ต่ำที่สุด มีขนาดเล็กที่สุด และมีความหนาแน่นมากที่สุด ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด (ดัดแปลงมาจาก Walker, 1990.) (27)

ชนิด องค์ประกอบ	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
ความหนาแน่น (ก/มล.)	< 0.95	0.95-1.006	1.019-1.063	1.063-1.210
ขนาด (Å)	800-5000	300-800	180-280	50-120
การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า	Nonmigrating band	Pre- β band	β band	α band
% คอเลสเตอรอล	3	10	26	20
% ไตรกลีเซอไรด์	90	70	10	5
% พอสฟอลิพิด	5	10	15	25
% อะโปโปรตีน	9	10	25	50

VLDL; Very low-density lipoprotein, LDL; Low-density lipoprotein, HDL; High-density lipoprotein.

นอกเหนือจากลักษณะทางกายภาพ ตลอดจนชนิดและสัดส่วนของไขมันที่เป็นส่วนประกอบแล้ว ไลโปโปรตีนแต่ละชนิดยังมีชนิดของอะโพลีโพรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกันอีกด้วย เช่น อะโพลีโพรตีน A (apo A) เป็นอะโพลีโพรตีนชนิดหลักของ HDL ในขณะที่อะโพลีโพรตีน B100 (apo B100) และอะโพลีโพรตีน B48 (apo B48) เป็น อะโพลีโพรตีนชนิดหลักของ chylomicron ตามตารางที่ 2 อะโพลีโพรตีนทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ที่มีหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ โครงของอนุภาคไลโปโปรตีนเพื่อให้โมเลกุลของไขมันเข้ามาเติมในโครงสร้างของอนุภาค คุณสมบัติของอะโพลีโพรตีนเป็น amphipathic คือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ จึงสามารถใช้กรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ในการจับกับไขมันและจัดเรียงกรดอะมิโนชนิด hydrophilic ให้หันสู่ภายนอก อย่างไรก็ตามอะโพลีโพรตีนแต่ละชนิดอาจมีการจัดเรียงตัวบนอนุภาคไลโปโปรตีนที่ต่างกันไป เช่น apo B จะฝังอยู่ในอนุภาคอย่างแน่นหนา ส่วน apo C จะจับอยู่กับอนุภาคอย่างหลวมๆ ทำให้สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนอะโพลีโพรตีนชนิดดังกล่าวระหว่างอนุภาคไลโปโปรตีนได้ง่าย ด้วยเหตุนี้จึงอาจสามารถแบ่งอะโพลีโพรตีนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ อะโพลีโพรตีนที่ไม่สามารถถูกแลกเปลี่ยนระหว่างอนุภาคไลโปโปรตีนได้ (เช่น apo B) และอะโพลีโพรตีนที่สามารถถูกแลกเปลี่ยนไปมาระหว่างอนุภาคไลโปโปรตีนได้ (เช่น apo A, apo C, apo E)

การแยกไลโปโปรตีนมีหลายวิธี เช่น การปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) การแยกด้วยวิธีนี้อาศัยความแตกต่างความหนาแน่นของไลโปโปรตีน วิธี agarose gel electrophoresis อาศัยความแตกต่างของประจุ และวิธี Non-denaturing gradient gel electrophoresis เป็นวิธีที่อาศัยความแตกต่างของขนาดความหนาแน่น ตารางที่ 1 แสดงความหนาแน่นของไลโปโปรตีนชนิดต่าง ๆ และการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้า

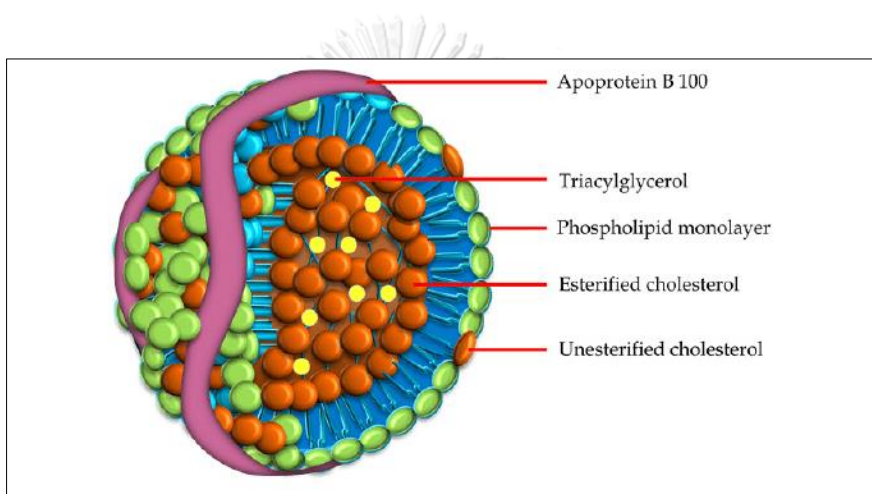
ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบหลักของไลโปโปรตีนแต่ละชนิด

ไลโปโปรตีน	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
ส่วนประกอบหลัก	Triglyceride จากอาหาร	Triglyceride ที่สังเคราะห์ได้ในร่างกาย	Cholesterol ester	โปรตีน
อะโพลีโพรตีน	B48 (A,C,E)	B100 (A,C,E)	B100	A1, AII (C,E)

VLDL; Very low-density lipoprotein, LDL; Low-density lipoprotein, HDL; High-density lipoprotein.

2.1 ลักษณะทั่วไปของ LDL

LDL หรือ ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ เป็นอนุภาคที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีความหนาแน่นระหว่าง 1.019 – 1.063 ก/มล. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 นาโนเมตร น้ำหนัก 2500 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) และไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นไขมันไม่มีขั้ว อยู่ในแกนกลางของอนุภาค (core lipids) ส่วนบริเวณรอบนอกเป็น hydrophilic monolayer ที่ประกอบด้วย ฟอสโฟลิพิด และไขมันคอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) ซึ่งเป็นไขมันชนิดมีขั้ว (polar lipids) และอะโพลีโพรตีนชนิด B-100 (apoB-100) แทรกอยู่ในชั้นฟอสโฟลิพิด โดยอนุภาค LDL 1 โมเลกุลจะประกอบด้วย apo B-100 เพียง 1 โมเลกุล ดังรูปที่ 2



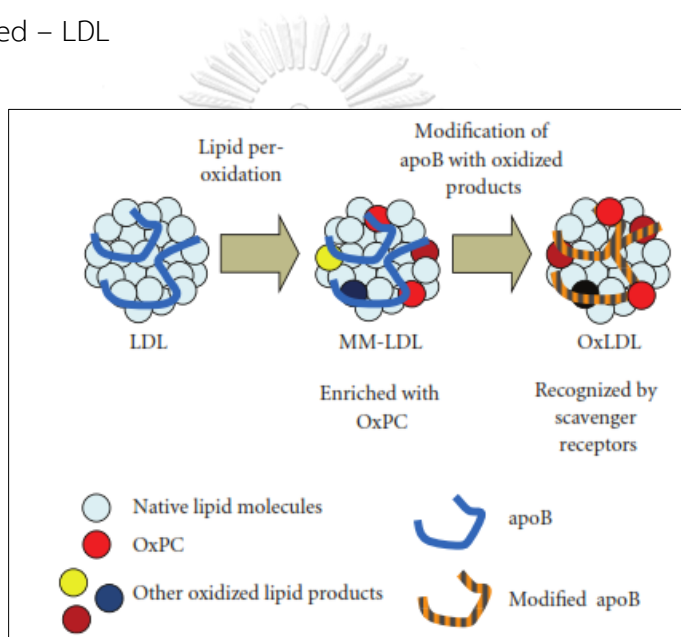
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของ LDL (28)

2.2 กระบวนการสร้าง LDL

กระบวนการสร้าง LDL เกิดจากการเมตาบอลิซึมของ very low-density (VLDL) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด ไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วย lipoprotein lipase และ hepatic lipase ทำให้มีขนาดเล็กลง กลายเป็นอนุภาค LDL อนุภาค LDL มีความหลากหลายทางด้านขนาดและความหนาแน่น LDL ที่ได้จากการบวนการไฮโดรไลซ์ VLDL จะมีขนาดและความหนาแน่นต่างกัน ขึ้นกับ triglyceride pool ในตับ ถ้าในตับมี triglyceride pool ต่ำ ตับจะสังเคราะห์ VLDL-II (อนุภาคมีขนาดเล็ก) และถูกไฮโดรไลซ์เป็น large buoyant LDL แต่ถ้าในตับมี triglyceride pool สูง ตับจะสังเคราะห์ VLDL-I (อนุภาคมีขนาดใหญ่) และจะถูกไฮโดรไลซ์เป็น small dense LDL อนุภาค LDL มีคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบหลัก ทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลผ่านทางกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่าง ๆ ทั่วร่างกาย นอกจากนี้

กระบวนการเกิด LDL ยังเกิดจากการแลกเปลี่ยนไขมันแกนกลางระหว่าง VLDL กับ LDL ซึ่งอาศัยโปรตีนที่มีชื่อว่า cholesteryl ester transferase protein (CETP) ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ในแกนอนุภาค LDL แลกเปลี่ยนกับไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL ในขั้นตอนนี้ อนุภาค VLDL กลายเป็น cholesteryl-rich VLDL และอนุภาค LDL กลายเป็น triglyceride-rich LDL หลังจากที่มีการแลกเปลี่ยนไขมันแกน ไตรกลีเซอไรด์ในอนุภาค triglyceride-rich LDL จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วย hepatic lipase ทำให้ไตรกลีเซอไรด์มีขนาดเล็กลงและมีสัดส่วนของโปรตีนมากกว่าไขมัน จึงทำให้อนุภาคมีความหนาแน่นสูง ได้เป็น LDL

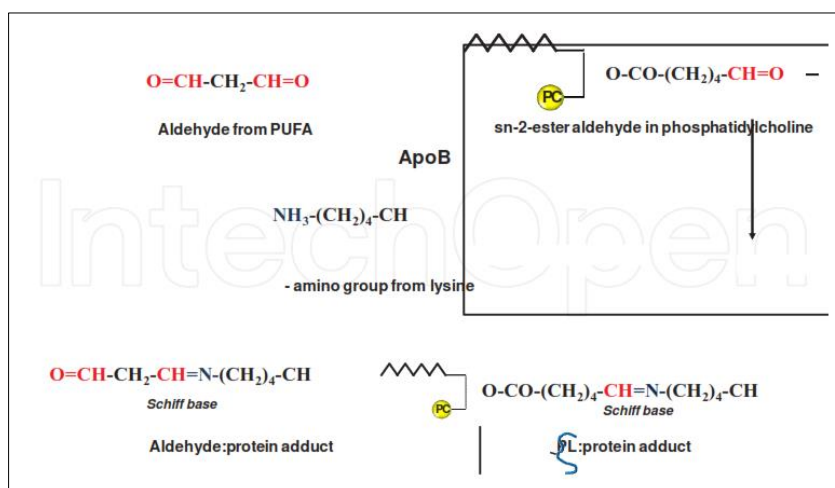
2.3 Oxidized – LDL



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างที่เปลี่ยนไปของ ox-LDL (5)

เนื่องจาก LDL มีขนาดเล็กจึงสามารถแทรกตัวเข้าสู่ผนังหลอดเลือดชั้น intima แล้วถูกออกซิไดซ์จากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) โดยสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) สาร ออกซิเดทีฟอื่น ๆ รั้งสี และฝุ่นควัน ซึ่งจะไปออกซิไดซ์ LDL ได้เป็น ox-LDL ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปจากเดิม ได้แก่ มีความหนาแน่นมากขึ้น เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน apo B และอะมิโนกรุปไลซีน รวมถึงเกิดการไฮโดรไลซิสของฟอสฟาติลโคลีน (รูปที่ 3) (29) ซึ่ง ox-LDL จะทำให้ระดับของไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวลดลง มีเกล็ดเลือดมาเกาะเพิ่มขึ้น และเกิด atherosclerosis เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีสมบัติแตกต่างจาก normal LDL โดยมีความเป็น antigenic มากขึ้น มีความเป็นประจุลบมากขึ้น ไม่สามารถจับได้กับ

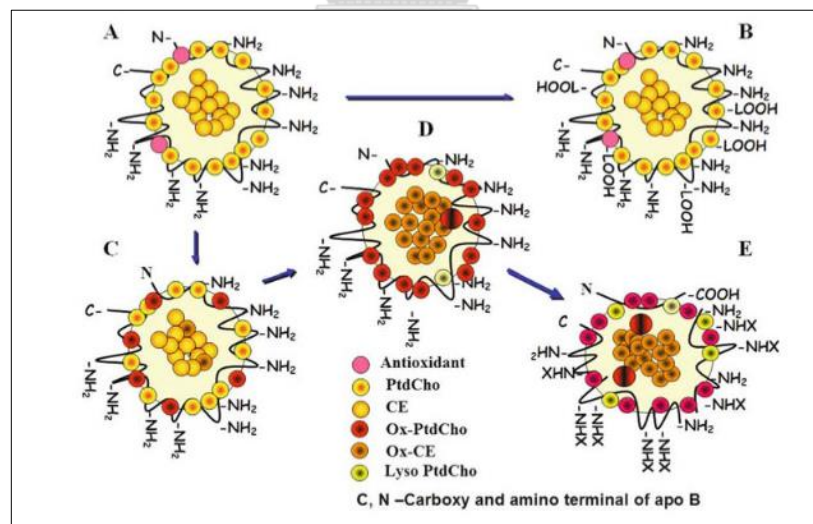
LDL receptor ได้ แต่สามารถจับได้กับ scavenger receptor ของแมคโครฟาจได้ และยังมี ความสามารถในการดึงดูดโมโนไซต์ในกระแสเลือด (chemotactic activity) (30) กระบวนการ ทั้งหลายเหล่านี้ล้วนกระตุ้นให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4 แสดงการเกิด Schiff base ของไขมัน (31)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอน ซึ่งเกี่ยวข้องกับพลังงานภายในเซลล์ ถ้ามีมากเกินไปประกอบกับมี oxidative stress มากกระตุ้น อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย อนุภาค LDL สามารถถูกออกซิไดซ์ กลายเป็น ox-LDL กระบวนการ LDL-oxidation เริ่มต้นจาก กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ และฟอสฟอลิเซอไรด์ ที่อยู่ภายในโมเลกุลของ LDL ถูกออกซิไดซ์ด้วยปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่พันธะคู่ในโมเลกุลของ PUFA และเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เนื่องจากสารอนุมูลอิสระมีการดึงอิเล็กตรอนจากกรดไขมันอื่น ๆ ที่อยู่ใกล้เคียงต่อเนื่องกันไปเรื่อย ๆ จากปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังกล่าวทำให้เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน สาเหตุเกิดจากสารอนุมูลอิสระในปริมาณมาก หรือสาร oxidant species อื่น ๆ ที่ได้จาก ออกซิเจน ไนโตรเจน และองค์ประกอบจากร่างกาย ตลอดจนการเกิดเมตาบอลิซึมของ xenobiotic รังสี (ionizing radiation) ควันทูหรี่ มลพิษ ที่เป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชัน ผลจากกระบวนการออกซิเดชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของ LDL เพิ่มความสามารถในการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (electrophoretic mobility) เกิดการแตกหักของ apo B-100 (fragmentation) เกิดการไฮโดรไลซ์ของฟอสฟาติดีลโคลีน และเกิดการเปลี่ยนแปลงของหมู่อะมิโนในตำแหน่งของ lysine และยังทำให้ความหนาแน่นของอนุภาค LDL เพิ่มขึ้น (29) และจากการศึกษาของ Friedman และ

คณะพบว่าไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ใน ox-LDL มีความเป็น biologically active โดยเฉพาะไขมันไม่อิ่มตัว ทั้งที่อยู่ในรูปของไขมันอิสระและที่เกาะอยู่กับหมู่เอสเทอร์ของฟอสโฟลิพิด จะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น lipid hydroperoxides (LOOH) ซึ่งสามารถแตกตัวไปเป็นโมเลกุลที่มีความ highly reactive สารประกอบนี้จะสลายตัวต่อไปได้เป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ต่าง ๆ เช่น malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (HNE) เป็นต้น ซึ่งแอลดีไฮด์เหล่านี้จะอยู่ในรูป schiff-bases ที่จับด้วยพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโน (-NH₂ group) ของไลซีนบนสายเพปไทด์ของ apo B-100 ทั้งที่แตกหักและไม่แตกหัก (lysine residues) และนอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างของกิ่งไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ (sn-2 oxidized fatty acid) ที่จับอยู่ด้วยพันธะเอสเทอร์นั้นมีคุณสมบัติเป็น terminal reactive aldehyde ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ฟอสโฟลิพิดนี้เรียกว่า aldehyde phospholipid core โดยอยู่ในรูปของ schiff base ที่ ไลซีนของอะโปโปรตีนบีและรวมไปถึงโปรตีนอื่นที่มีหมู่เอมีนที่ฟอสโฟลิพิด เช่น ฟอสฟาติลเอธานอลามีนและฟอสฟาติลเซอรีน ดังรูป 4 นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ox-LDL มีการแสดงออกของ neoepitopes ซึ่งมีความเป็นอิมมูโนจีนิกมากขึ้น และยังสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีต่อ epitope ดังกล่าว (32) และจากภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ox-LDL หลังจากเกิดการออกซิเดชัน ได้เป็นโครงสร้างของลิพิดเปอร์ออกไซด์ (b) คอล레스เตอรอลและฟอสโฟลิพิดเปอร์ออกไซด์ (c) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (d)



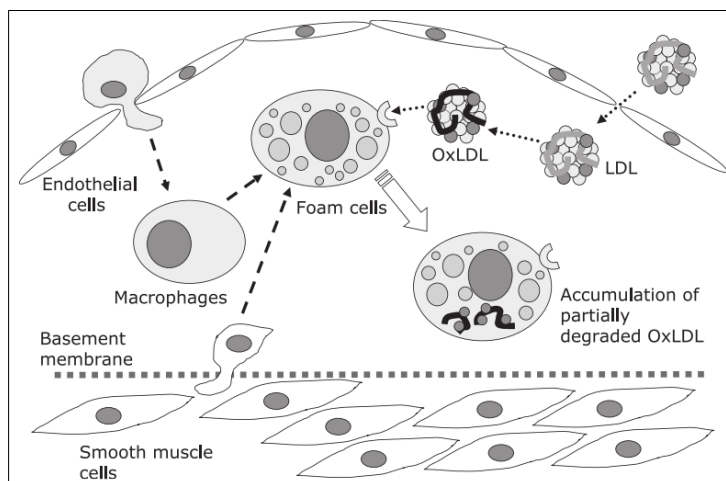
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของส่วนประกอบของ ox-LDL ที่เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับ normal LDL (33) (A คือ normal LDL, B คือ ลิพิดเปอร์ออกไซด์, C คือ ox-LDL ที่โครงสร้างของคอเลสเตอรอลเอสเทอร์และฟอสโฟลิพิดเปอร์ออกไซด์, D คือ ox-LDL ที่มีโครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลง, E คือ ox-LDL ที่มีทั้งโครงสร้างของโปรตีนและลิพิดเปลี่ยนแปลง)

2.4. ความสัมพันธ์ระหว่าง ox-LDL กับโรคหลอดเลือดหัวใจ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ox-LDL เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดหัวใจผ่านทางโครงสร้างการอักเสบ (complex inflammatory) และกลไกทางภูมิคุ้มกัน ที่นำไปสู่การเกิด lipid dysregulation จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ LDL จากการถูก acetylation ของ acetyl groups ทำให้เกิดเป็นโครงสร้าง acetylated LDL ที่สามารถไปจับกับตัวรับบนผิว scavenger receptors (SRA) เกิดการสะสมของไขมันทำให้เกิดเป็นโฟมเซลล์ (34) สะสมในผนังหลอดเลือดเกิดเป็นลักษณะรอยขีดไขมัน (fatty streak) และเกิดการสะสมเป็นก้อนไขมัน ทำให้ผนังหลอดเลือดด้านในบางลงจนเกิดการปริแตก

ในภาวะปกติ normal LDL จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ผ่านทางตัวรับ LDL receptor หรือ LRP โดยอาศัย apo B-100 ได้เป็น LDL-LDL receptor complex เพื่อเข้าสู่เซลล์ การสังเคราะห์ LDL receptor ขึ้นกับระดับคอเลสเตอรอลภายในเซลล์ เมื่อเซลล์มีระดับคอเลสเตอรอลลดลง เซลล์จะเพิ่มการสังเคราะห์ LDL receptor เพื่อทำหน้าที่รับเอา LDL เข้าสู่เซลล์ แต่ถ้าเมื่อใดเซลล์มีระดับคอเลสเตอรอลสูง เซลล์จะลดการสร้าง LDL receptor เพื่อลดการนำเข้าคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ สำหรับ ox-LDL เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ apo-B ทำให้ไม่สามารถจับกับตัวรับบน LDL-receptor บนผิวเซลล์ได้ แต่จะสามารถจับกับ ตัวรับ acetyl LDL receptor หรือ scavenger receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์แมคโครฟาจได้อย่างรวดเร็วและไม่มีที่สิ้นสุด ทำให้เซลล์แมคโครฟาจจับ ox-LDL ที่มีคอเลสเตอรอลได้ไม่จำกัด ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า โฟมเซลล์ (foam cells) (6) กลายเป็นก้อนไขมันสะสมและทำให้ผนังหลอดเลือดแดงหนาตัวขึ้น (atheroma) เมื่อมีก้อนไขมันสะสมมากขึ้นผนังหลอดเลือดด้านในบริเวณ fibrous plaque จะบางลงจนเกิดการปริแตก เกิดการกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด และการทำงานของเกล็ดเลือด ซึ่งปกติแล้วเกล็ดเลือดจะทำหน้าที่ในการห้ามเลือดออก ในที่นี้เกล็ดเลือดจะไปอุดตันบริเวณที่มีการอักเสบภายในหลอดเลือดแดง ทำให้เกิดลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดหัวใจ (plaques) จากการที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือดทำให้ปริมาณของไนตริกออกไซด์และความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือดลดลง ซึ่งการฉีกขาดนี้ทำให้มีเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์สามารถผ่านเข้ามาสู่ผนังหลอดเลือดได้ง่ายและมากขึ้น สามารถเจริญเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์แมคโครฟาจมาจับกิน ox-LDL ที่สะสมอยู่ในผนังหลอดเลือดเข้าสู่เซลล์ทาง scavenger receptor อย่างต่อเนื่องและก่อให้เกิดโฟมเซลล์ได้มากขึ้น เนื่องจาก scavenger receptor ไม่มีกลไก feedback inhibition และเซลล์ทั่วไปไม่สามารถนำ ox-LDL เข้าสู่เซลล์ทาง LDL receptor ได้ ตลอดจนเซลล์บุหลอดเลือดที่เกิดความเสียหาย จะหลั่งไซโตไคน์และ inflammatory mediator ออกมาหลายชนิด ซึ่งจะออกฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดเพิ่มจำนวน และสังเคราะห์คอลลาเจนเพิ่มขึ้น เกิดโครงสร้างเป็น cap ที่คลุมส่วนที่เป็นไขมันเอาไว้ พยาธิสภาพที่

เกิดขึ้นทำให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือด (atherosclerotic plaque) และนำไปสู่การตีตันของหลอดเลือดลงในที่สุด (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง oxidized-LDL กับการเกิดโฟมเซลล์ (35)

จะเห็นว่า ox-LDL เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารี จากการศึกษาของ Holvoet และคณะ ที่ใช้เทคนิค competitive ELISA เพื่อตรวจวัดระดับ ox-LDL ในคน 2 กลุ่ม โดยผลิตและพัฒนาแอนติบอดี ชนิด 4E6 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อส่วนของ apo B-100 พบว่าค่าปกติของ ox-LDL ในคนปกติ อยู่ระหว่าง 1.30 ± 0.88 มก./ดล. และในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจพบว่ามีระดับ ox-LDL อยู่ระหว่าง 3.11 ± 1.19 มก./ดล. ดังแสดงในตารางที่ 3 (36) และจากการศึกษาของ Toshima และคณะ ได้ตรวจวัดระดับ ox-LDL ในคน 3 กลุ่ม โดยใช้เทคนิค sandwich ELISA และใช้แอนติบอดี ชนิด FOH1a/DLH3 ที่ผลิตและพัฒนาขึ้นเองเป็นแอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ ซึ่งเป็น anti-oxidized phosphatidylcholine (anti-OxPC) และ anti-human apo B เป็นแอนติบอดีชนิดทุติยภูมิตามลำดับ พบว่าในคนปกติมีระดับ ox-LDL อยู่ระหว่าง 112.4 ± 3.3 ยูนิต/ดล. พบในผู้ป่วยโรคหัวใจอยู่ระหว่าง 201.3 ± 11.2 ยูนิต/ดล. และในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่ามีระดับ ox-LDL อยู่ระหว่าง 138.0 ± 7.2 ยูนิต/ดล. (37) ทั้งนี้ค่าอ้างอิงที่ได้ขึ้นอยู่กับการตรวจวัด ชนิดความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ จากการศึกษาของ Ali และคณะ พบว่าการตรวจวัดระดับ ox-LDL ยังสามารถเป็นตัวชี้วัดสำหรับโรคเมตาบอลิกซินโดรม ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นภาวะหลาย ๆ ภาวะรวมกัน ได้แก่ ภาวะอ้วนลงพุง ภาวะไขมันในเลือดสูง โรคความดันโลหิตสูง ภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งล้วนแต่เป็นปัจจัยหลักต่อการพัฒนาให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ แสดงค่าอ้างอิงตามตารางที่ 4 (7) สำหรับระดับ LDL นั้นขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการรับประทานอาหารและการใช้ชีวิตประจำวัน ตลอดจนสภาวะของโรค

และภาวะผิดปกติต่าง ๆ ของร่างกายรวมถึงฤทธิ์ของยาและฮอร์โมน ที่จะส่งผลเกี่ยวข้องกับระดับ LDL ที่สูงขึ้นตามมา เช่น ภาวะอ้วนลงพุง ภาวะดื้อต่ออินซูลิน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันในเลือดสูง ซึ่งจากสถิติของประเทศไทยพบว่าประชากรป่วยเป็นโรคเบาหวาน ชนิดที่ 2 โดยภาวะดื้อต่ออินซูลิน ซึ่งเป็นภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงที่เกิดจากเซลล์ไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้ จึงทำให้ร่างกายต้องนำกรดไขมันจากเนื้อเยื่ออะดิโพสออกมาเพื่อใช้เป็นพลังงาน ด้จะมีการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากกรดไขมันอิสระเพิ่มมากขึ้น และขนส่งออกมาในกระแสเลือดในรูป VLDL ทำให้ระดับ VLDL ในเลือดสูง นอกจากนี้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เอนไซม์ lipoprotein lipase จะทำงานน้อยลง ส่งผลให้โคเลสเตอรอลและ VLDL ถูกสลายได้น้อยลง จึงทำให้ VLDL ตกค้างอยู่ในกระแสเลือดนานขึ้น เหนี่ยวนำให้เกิดเป็น small dense LDL และถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระได้ง่ายกว่า large buoyant LDL ประกอบกับสภาวะแวดล้อมในปัจจุบันที่ง่ายต่อการสัมผัสกับสารอนุมูลอิสระ จึงเป็นสาเหตุสำคัญกับการเกิด ox-LDL จากการเผชิญกับปัญหามลภาวะ ต่าง ๆ เช่น ฝุ่น pm 2.5 พฤติกรรมการรับประทานอาหาร การบริโภคไขมันชนิดทราน การสูบบุหรี่ ตลอดจนภาวะเครียด เป็นต้น

ตารางที่ 3 แสดงค่าอ้างอิง ox-LDL ในกลุ่มคน 2 กลุ่ม (ดัดแปลงจากรายงานของ Holvoet และคณะ)

Disease	mg/dL	ug/ml
Control (n=126) 1.3 ± 0.88 mg/dl	0.42	4.2
	2.18	21.8
CAD (n=178) 3.11 ± 1.19 mg/dl	1.92	19.2
	4.3	43

ตารางที่ 4 แสดงค่าอ้างอิง ox-LDL ในกลุ่มคน 4 กลุ่ม (ดัดแปลงจากรายงานของ Ali และคณะ)

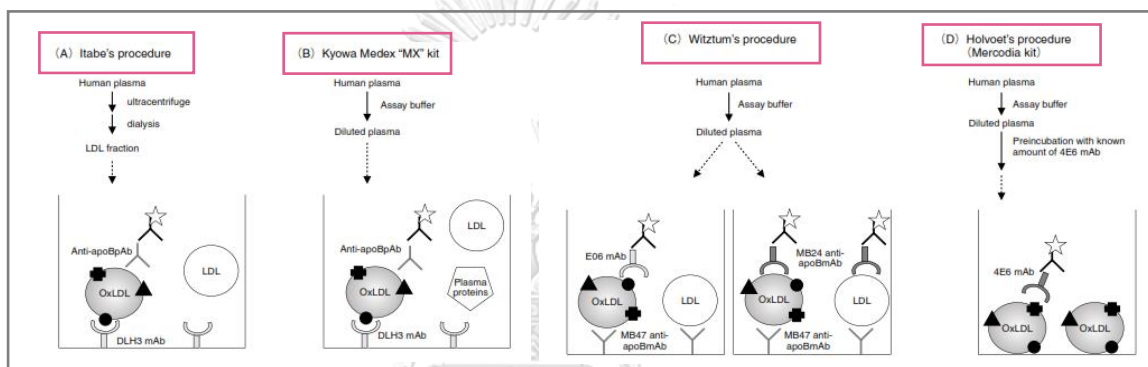
Disease	ng/mL	ug/ml
Normal (n=20) 108.36 ± 3.94 ng/ml	104.42	0.104
	112.3	0.112
Type-2DM (n=10) 195.87 ± 17.3 ng/ml	178.57	0.178
	213.17	0.213
MS (n=63) 200.24 ± 6.36 ng/ml	193.88	0.193
	206.6	0.206
Type-2DM+HT 213.36 ± 7.71 ng/ml	205.65	0.205
	221.07	0.221

2.5 การตรวจวิเคราะห์ระดับ ox-LDL

ปัจจุบันการวัดระดับไขมันคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HDL-C และ LDL-C เป็นพารามิเตอร์หลักที่นิยมตรวจในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ แต่ระดับของไขมันดังกล่าวยังมีค่าไม่แน่นอน เนื่องจากว่าร่างกายมีกลไกกำจัด และนำกลับมาใช้ใหม่ด้วยตัวจับและรับอย่างจำเพาะ อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการใช้ชีวิต ลิพิดเมตาบอลิซึม แบ่งเป็น 2 ทาง คือ exogenous pathway เป็นการขนส่งไขมันจากอาหารไปยังเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ เพื่อเก็บสะสมหรือใช้เป็นพลังงาน ระดับของไขมันจึงขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการรับประทานอาหาร นอกจากนี้ยังมีกลไก endogenous pathway ซึ่งเป็นกระบวนการในการขนส่งไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย จากตับไปยังเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย โดยไตรกลีเซอไรด์จะถูกนำมารวมกับองค์ประกอบต่าง ๆ ได้เป็น VLDL เกิดการแลกเปลี่ยนไขมันระหว่างอนุภาค มีการปลดปล่อยอะโปโปรตีนเพื่อนำกลับไปใช้ ทั้งนี้ระดับของไขมันจึงมีค่าไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของไตรกลีเซอไรด์นั้น ๆ นอกจากนี้การตรวจวัดระดับของ LDL ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี direct แล้วยังสามารถคำนวณได้จากสมการของ Friedewald ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าของไขมันตัวอื่น ๆ

การตรวจวัดระดับ ox-LDL นั้นยังไม่เป็นที่แพร่หลายแม้จะเริ่มมีการตรวจมากกว่า 10 ปี และแม้ว่าจะเป็นตัวการหลักและสำคัญที่จะช่วยเป็นแนวทางในการประเมินความเสี่ยง ป้องกัน และติดตามการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต เช่น ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันจากภาวะเกิดลิ่มเลือดไปอุดตัน จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคหลายเทคนิคเพื่อนำมาวัดระดับของ ox-LDL ได้แก่ เทคนิค Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เป็นปฏิกิริยาระหว่าง thiobarbituric acid และ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในอนุภาค LDL การตรวจวัดระดับ MDA จึงใช้เป็นตัวชี้วัดของการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในร่างกาย แต่การวัดระดับ MDA ไม่จำเพาะว่าเกิดจาก LDL-oxidation หรือไม่ (10) เทคนิค Diene จะวัดการเพิ่มขึ้นของ conjugated diene หลังจาก LDL ถูกออกซิไดซ์ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟตในหลอดทดลอง โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (11) เทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) โดยการวัด Lipoprotein subclass ด้วยเครื่อง proton NMR spectroscopy (12) เทคนิค anion-exchange high-performance liquid chromatography (AE-HPLC) เพื่อวัดระดับของ ox-LDL โดยอาศัยความแตกต่างของประจุ (13) และเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) โดยวัดชิ้นส่วนของเพปไทด์ apoB-100 ที่เปลี่ยนไป (14) จะเห็นว่าเทคนิคเหล่านี้ยังคงต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ และไม่มีในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ทั่วไป นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมีการใช้ทั้งเทคนิค sandwich ELISA และ competitive

ELISA เนื่องจากเทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ สำหรับแอนติบอดีที่นำมาทดสอบ เช่น anti apo B-100 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อส่วนอะโปโปรตีน ชนิด B-100 ซึ่งเป็นองค์ประกอบเฉพาะของอนุภาค LDL, anti 4-hydroxynonenal (anti-HNE) หรือ anti malondialdehyde (anti-MDA) เป็นแอนติบอดีต่อกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในอนุภาค LDL ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน, anti-phosphorylcholine (anti-PhoCho) เป็นแอนติบอดีต่อส่วนฟอสโฟลิพิดชนิดฟอสโฟริลโคลีน, anti-oxidized phosphatidylcholine (anti-OxPC) เป็นแอนติบอดีต่อส่วนฟอสฟาทิลโคลีนที่ถูกออกซิไดซ์ เป็นต้น โดยในแต่ละวิธีมีหลักการแสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงหลักการ ELISA เพื่อตรวจวัดระดับ ox-LDL ในแต่ละวิธี (9)

จากรูป 7A เป็นวิธีการตรวจวัดระดับพลาสมา ox-LDL โดยวิธีของ Itabe และคณะที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจด้วยเทคนิค sandwich ELISA ซึ่ง ox-LDL จะถูกจับอยู่ระหว่างแอนติบอดี 2 ชนิด คือแอนติบอดีชนิด anti-human apo B polyclonal antibody และ DLH3 ซึ่งเป็น anti-OxPC ที่ผลิตขึ้นจากการฉีดกระตุ้นภูมิของหนูทดลองด้วย human atheroma ในวิธีการนี้มีการแยกเอาส่วนเฉพาะอนุภาค LDL ออกมาจากพลาสมาก่อนทำการทดสอบด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนของ ox-LDL ต่อ LDL (นาโนกรัม ox-LDL/ไมโครกรัม LDL โปรตีน) และจากภาพ B เป็นวิธีการของชุดทดสอบ MX kit ที่ใช้หลักการทดสอบ sandwich ELISA และใช้แอนติบอดีชุดเดียวกันกับวิธีของ Itabe แต่ไม่ได้มีการแยกเอาส่วนอนุภาค LDL ออกก่อนนำมาทดสอบ แต่จะใช้พลาสมาที่เจือจาง และให้ผลการทดสอบเป็นความเข้มข้นของ ox-LDL ส่วนภาพ C เป็นวิธีการของ Witztum และคณะที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธี chemiluminescence โดยใช้เทคนิค dual-sandwich ELISA ที่มีการทดสอบ 2 sandwich assays ไปพร้อม ๆ กันแต่ใช้ตัวอย่างตรวจชนิดเดียวกันซึ่งเป็นพลาสมาเจือจาง โดยหนึ่งหลุมของการทดสอบเป็นการหา ox-LDL โดยใช้ anti-apoB mAb MB47 และ E06 ซึ่งเป็น anti-phosphorylcholine (anti-PhoCho) ที่สร้างมา

จาก B-cell clones ของหนู non-immunized apolipoprotein E-knockout และอีกหลุมการทดสอบเป็นการหาปริมาณทั้งหมดของ apoB โดยใช้ anti-apoB mAb MB47 และ anti-apoB mAb MB24 ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนของ ox-LDL ต่อปริมาณของ apoB และจากภาพ D เป็นการทดสอบโดยใช้ชุดการทดสอบของ Mercodia kit ที่พัฒนามาจากวิธีการของ Holvoet และคณะที่ใช้หลักการ competitive ELISA หรือหลักการการแย่งจับเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของ ox-LDL ในพลาสมาที่ถูกเจือจาง โดยใช้แอนติบอดีตัวเดียวคือ 4E6 ซึ่งเป็น anti-modified apoB mAb ที่ได้จากหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิด้วย copper-induced ox-LDL โดยหลักการเป็นการวัดปริมาณคงเหลือของ 4E6 mAb หลังจากนำแอนติบอดีดังกล่าวที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนไปบ่มกับพลาสมาที่เจือจางก่อน แล้วนำตัวอย่างนั้นมาทดสอบต่อบนหลุมที่เคลือบด้วย ox-LDL ไว้ก่อนแล้ว เป็นหลักการการแย่งจับของแอนติบอดี 4E6 กับ ox-LDL ที่อยู่ในพลาสมาและที่ถูกเคลือบไว้บนหลุมทดสอบ ผลที่ได้จากความเข้มข้นแอนติบอดีที่หายไป คือ ความเข้มข้นของ ox-LDL ในพลาสมา เมื่อนำมาคำนวณจากความเข้มข้นของแอนติบอดีตั้งต้นลบกับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่วัดได้

จากการศึกษาของ Hiroyuki I. และคณะ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดระดับไขมัน ox-LDL โดยใช้เทคนิค ELISA ใน 4 วิธี ตามตารางที่ 3 ได้แก่ วิธี Itabe วิธี Kyowa Medex MX kit วิธี Witztum และวิธี Holvoet (Mercodia kit) ยังมีข้อเสียคือ ใช้เวลาทดสอบนาน ราคาสูง ใช้ปริมาตรตัวอย่างและสารเคมีมาก และต้องใช้เครื่องมือที่มีจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์ผลการทดสอบ นอกจากนี้ยังต้องใช้เอนไซม์ ซึ่งมีข้อจำกัดคือเสื่อมสภาพได้ง่ายและมีอายุการใช้งานสั้น (9)

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบ 4 วิธีการตรวจวัดระดับ ox-LDL (9)

Procedure	Itabe's Procedure	Kyowa Medex MX kit	Witztum's Procedure	Holvoet's Procedure	Mercodia kit
ELISA System	Sandwich	Sandwich	Dual-sandwich	Competition	Competition
Ab used	1. DLH3 (anti-OxPC mAb) 2. anti-apoB pAb	1. DLH3 (anti-OxPC mAb) 2. anti-apoB pAb	1. E06 (anti-PhoCho mAb) 2. MB47 3. MB24 (anti-apoB mAb)	1. 4E6 (anti-modified apoB mAb)	1. biotin-4E6 (anti-modified apoB mAb)
Detection	Colorimetric (ALP)	Colorimetric (HRP)	Chemiluminescence (HRP)	Colorimetric (HRP)	Colorimetric (HRP)
Sample prep.	LDL fraction (ultracentrifugation)	Diluted plasma	Diluted plasma	Diluted plasma pre- absorbed with mAb	Diluted plasma
Sample storage	Cannot be frozen	Can be frozen (a reagent for storage is provided by Kyowa)	Cannot be frozen	Can be frozen	Can be frozen
Standard	Cu-OxLDL	Cu-OxLDL	None	MDA-LDL	Pooled patient plasma
OxLDL level in healthy subjects	0.1 ng/ μ g LDL (ratio)	10 unit/mL plasma (concentration)	0.027-0.42* (ratio of E06 epitope/apoB)	0.7 mg/dL (concentration)	70 units/L (concentration)
Availability	In-house assay	Commercial	In-house assay	In-house assay	Commercial
Advantage	Sensitive; Selective	Takes 1 day	Represents degree of modification	Takes 1 day	Compete in one well
Limitation	Takes 4 days Ultra- centrifuge is needed	Expensive	Chemiluminescence reader is needed	Less selective	Expensive

แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการผลิตชุดตรวจวัดระดับ ox-LDL ออกจำหน่ายหลากหลายบริษัท แต่ยังคงมีราคาสูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน จึงทำให้การตรวจวัดระดับ ox-LDL ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ รวมถึงในโปรแกรมการตรวจสุขภาพประจำปี และแม้ว่า ox-LDL จะมีความสำคัญทางคลินิกก็ตาม ต่อมาในปี 2012 จำรัสและคณะ ได้ประดิษฐ์คิดค้นวิธีการตรวจ ox-LDL โดยใช้เทคนิค piezoelectric-based biosensor โดยเป็นหลักการของอิมมูโนเซนเซอร์ ทำการดัดแปลงพื้นผิวของควอตซ์คริสตัล ให้เป็นตัววัดระดับความเข้มข้นของ ox-LDL ด้วยการวัดด้วยกระแสไฟฟ้า จากการตรึง anti-ox-LDL ที่พื้นผิวของอิเล็กโทรดเงิน (silver electrode) แม้เทคนิคดังกล่าวจะเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำ ลดระยะเวลาได้ แต่ยังต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะในการวิเคราะห์ (15) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาและศึกษาการตรวจวัด anti-ox-LDL ที่เป็นแอนติบอดีต่อ ox-LDL โดยใช้เทคนิค ELISA ซึ่งในปัจจุบันยังคงไม่เป็นที่แน่นอนว่า anti-ox-LDL ดังกล่าวสามารถยับยั้งการนำเข้า ox-LDL โดยแมคโครฟาจ (38) หรือ เป็นอโตแอนติบอดี ที่ร่างกายสร้างขึ้นมา ซึ่งอาจสามารถเป็นตัวชี้วัดสำหรับโรคหลอดเลือดแข็งตัว (39) และในบางการศึกษาพบว่าแอนติบอดีดังกล่าวยังสามารถพบได้ในบางโรค เช่น systemic lupus erythematosus (SLE) (40)

3 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษ

3.1 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษ

เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษเป็นการนำเอากระดาษกรองมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ (41) เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูก น้ำหนักเบา มีความสามารถให้สารซึมผ่าน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดีกับตัวอย่างทางชีวภาพได้ (42) โดยวิธีการออกแบบกระดาษให้มีส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำนั้นทำได้หลากหลายวิธี เช่น photolithography (43) เครื่องปริ้นอิงค์เจ็ท (44) polydimethylsiloxane (PDMS) plotting (45) และเครื่องปริ้นแวกซ์ (46) ในปี 2010 Cheng และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาเชื้อ HIV โดยใช้เทคนิค paper-based ELISA (P-ELISA) โดยการนำเอากระดาษมาประยุกต์เข้ากับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค ELISA เพื่อลดต้นทุน เวลา และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ (16) ต่อมา มีการนำมาประยุกต์ใช้เพิ่มมากขึ้น เช่น การตรวจหาแอนติบอดีในโรค autoimmune (21) ตรวจหาเชื้อ *E.coli* (47) ตรวจหา ยา dopamine ในงานเภสัชวิทยา (48) เป็นต้น แต่ถึงอย่างไรยังมีข้อจำกัดของการเสื่อมของเอนไซม์ที่มีช่วงอายุไม่มาก การเก็บรักษาและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทำปฏิกิริยา รวมถึงราคาของเอนไซม์ (49) เทคนิค immunogold silver enhancement จึงเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ โดยริเริ่มพัฒนาจาก Holgate และคณะ ในปี 1983 ที่ใช้ในงาน immunohistochemical เนื่องจากสามารถเพิ่มผลการมองเห็นของปฏิกิริยาได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์กับเทคนิคอื่น ๆ ได้ เช่น วิธี colorimetry (50) วิธี

electrical (51) วิธี chemiluminescence (52) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับงานอิมมูโนโดยการติดฉลากอนุภาคของทองคำกับแอนติบอดี ประยุกต์เข้ากับเทคนิค silver enhancement เพื่อให้ผลการทดสอบเห็นผลชัดเจนมากขึ้น และสามารถใช้เครื่องมือในการถ่ายภาพเพื่อวิเคราะห์ผล เช่น โทรศัพท์มือถือ แอปพลิเคชัน เครื่องสแกน (49, 53) ซึ่งง่ายต่อการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการในอนาคต

3.2 เทคนิค ELISA บนฐานกระดาษ

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ Enzyme Immunoassay (EIA) เป็นการทดสอบที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีอย่างจำเพาะ เทคนิค ELISA จะมีการตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิว solid phase เช่น ELISA plate หรือบนผิวภาชนะที่ทดลอง เม็ด bead ด้วย จากนั้นเติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการหาแอนติบอดีหรือแอนติเจนลงไป ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา เมื่อครบเวลาล้างแอนติบอดีหรือแอนติเจนส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วจึงเติมสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาออกไป เอนไซม์จะย่อยซับสเตรตทำให้เปลี่ยนสี โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจ ผลโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท หลักการ ELISA นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เทคนิคนี้มีความจำเพาะและแม่นยำสูงอีกทั้งให้ผลที่คุ้มค่า ดังนั้นจึงเป็นที่นิยมใช้ทั้งในงานตรวจวิเคราะห์ทั่วไปและใช้ตรวจหาสารโมเลกุลที่สนใจทั้งในสิ่งมีชีวิต (ฮอร์โมน) และไม่มีชีวิต (โมเลกุลยา) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ELISA มีราคาแพงและมีช่วงอายุที่สั้น สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น วิธีการ Indirect direct ELISA, Sandwich ELISA, และ competitive ELISA เป็นต้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มาก (20-200 ไมโครลิตร) และมีราคาแพง เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ง่าย ตลอดจนต้องใช้เวลาวิเคราะห์นาน เนื่องจากมีหลายขั้นตอน รวมถึงต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ

ต่อมามีการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ELISA บนฐานกระดาษ (paper based ELISA, P-ELISA) เพื่อลดต้นทุน ระยะเวลา ทำได้สะดวก และลดปริมาณสารเคมี ตลอดจนไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะในการอ่านผลการวิเคราะห์ ปัจจุบันนิยมนำกระดาษกรองมาเคลือบด้วยไฮดรอกซีเซลลูโลสเพื่อให้เกิดเป็นวงกลมสำหรับเกิดปฏิกิริยา โดยให้มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำคล้ายคลึงกับลักษณะของไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม สามารถมองเห็นผลของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า ในปี 2010 Cheng และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หา HIV ในเชิงปริมาณโดยประยุกต์ใช้เทคนิค P-ELISA ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และใช้เทคนิค photolithography เพื่อให้เกิดเป็นวงที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เช่นเดียวกับไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม

แล้วนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA บนกระดาษกรองนั้น ซึ่งสามารถลดระยะเวลาการทดสอบเหลือเพียง 51 นาที และปริมาตรสารเคมีที่ใช้คือ 12 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี conventional Elisa (ใช้ระยะเวลาทดสอบทั้งหมด 213 นาที ใช้สารเคมีปริมาตร 300 ไมโครลิตร) ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ อีกทั้งยังไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะในการอ่านผล ผลที่ได้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (16) สำหรับเทคนิค photolithography ยังมีข้อจำกัดที่ต้องใช้เครื่องมือทำจำเพาะและขั้นตอนซับซ้อนในการผลิตไมโครโซนเพลท ต่อมามีการพัฒนาการสร้าง paper-based โดยใช้เทคนิคการพิมพ์ผ่านเครื่องพิมพ์อิงค์เจ็ทแว็กซ์ ซึ่งขั้นตอนการผลิตไม่ซับซ้อน ราคาถูก และง่ายต่อการนำไปใช้ สามารถออกแบบขอบเขตผ่านคอมพิวเตอร์ แล้วพิมพ์บนกระดาษกรอง จากนั้นนำไปวางบนแผ่นร้อนเพื่อให้แว็กซ์ละลายและซึมไปอีกด้านของกระดาษ ปัจจุบันมีการนำเทคนิค P-ELISA ไปประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์ทางคลินิกมากขึ้น ในปี 2013 Murdock C. และคณะ ได้ทำการประยุกต์วิธีการทำ ELISA บนกระดาษเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ neuropeptide Y (NPY) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับอาการความวิตกกังวล ความกลัว ความเครียดและการเรียนรู้ พบว่าการอ่านผลปฏิกริยานั้นมีข้อจำกัดในการแปลผล (limit of detection, LOD) จากการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase จากการใช้เอนไซม์ยับยั้ง NBT/BCIP และ pNPP โดยพบว่าข้อจำกัดในการแปลผล (LOD) ของทั้งสองยับยั้งอยู่ที่ประมาณ 2.3 นาโนโมลาร์ และ 4 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ อันเนื่องมาจากหลายปัจจัยที่มีผล ได้แก่ ประสิทธิภาพการติดฉลากระหว่างเอนไซม์และแอนติบอดี ความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจน และยังเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพ อายุและวิธีการเก็บรักษาเอนไซม์ (49)

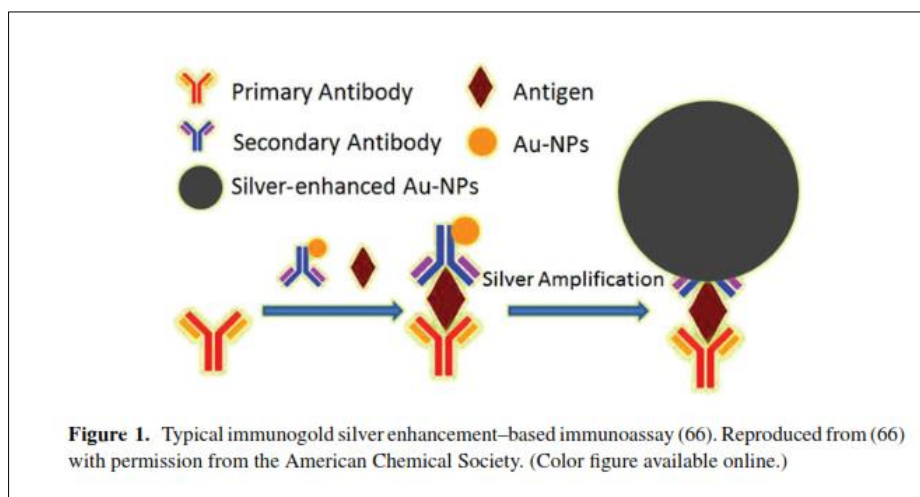
3.3 เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ immunogold silver enhancement

แนวคิดการนำอนุภาคทองคำมาเป็นตัวชี้วัด เนื่องด้วยคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ สามารถเตรียมได้หลากหลายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ตั้งแต่ 2 นาโนเมตร จนถึง 100 นาโนเมตร และมีคุณสมบัติจำเพาะในการยึดเหนี่ยวติดอยู่กับโมเลกุลทางชีวภาพอื่น นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการอ่านผลการเกิดปฏิกริยาบนชีววิทยาระบบได้หลากหลาย เช่น จุลชีพ เนื้อเยื่อ เป็นต้น ในปี 1971 Faulk และคณะ ได้นำเทคนิคการติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำเพื่อตรวจหา *Salmonella* spp. โดยใช้กล้องอิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (transmission electron microscope) และกล้องอิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) เพื่อดูผลของปฏิกริยา (54) อนุภาคทองคำถูกนำมาใช้เนื่องจากมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอน ส่งผลทำให้เพิ่มการกระจายตัวของอิเล็กตรอนผลที่ได้จะเป็นจะเป็นจุดดำ (dark spot) จึงนิยมติดฉลากอนุภาคทองคำที่แอนติบอดีตัวที่สอง ซึ่งจะจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรกที่จับอยู่กับส่วนของแอนติเจน ทำให้เห็นผลของปฏิกริยาชัดเจนมากขึ้นโดยเฉพาะโปรตีนหรือแอนติเจนที่

ต้องการหาที่มีปริมาณน้อยหรือมีความหนาแน่นที่น้อย นอกจากนี้ยังมีการนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางขึ้นเนื้อ เพื่อดูผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

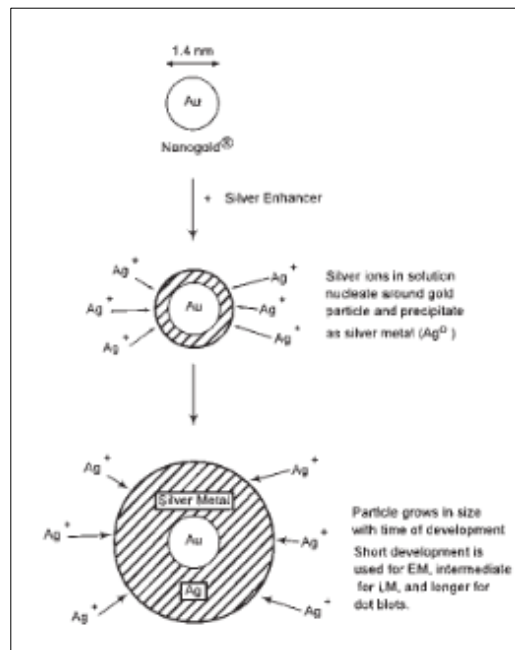
อย่างไรก็ตามแม้ว่าเทคนิคการติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ จะทำให้เห็นผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนขึ้น แต่เนื่องด้วยว่าอนุภาคทองคำมีขนาดเล็กมากจึงทำให้การมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแบบใช้แสงไม่ชัดเจน ต่อมาจึงมีการประยุกต์ใช้อนุภาคทองคำร่วมกับเทคนิค immunogold silver enhancement โดยการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคของทองคำแล้วเพิ่มสัญญาณด้วยปฏิกิริยาทางเคมีเกิดเป็นอนุภาคของเงินติดอยู่บนผิวของอนุภาคทองคำ ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะสังเกตเห็นสีทึบของธาตุเงิน แทนที่จะติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้เพื่อให้ผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความชัดเจนมากกว่าเดิม จากการเกิดปฏิกิริยาของเงิน (metallic silver) ที่อนุภาคทองคำ ทำให้เพิ่มทั้งขนาดและผลของปฏิกิริยาที่ชัดเจนมากขึ้นและเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงจะเห็นเป็นจุดสีดำ แม้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นการทำปฏิกิริยาทางเคมีก็ตาม แต่ปฏิกิริยาการเกิดอนุภาคของเงินนั้นสามารถเพิ่มสัญญาณการเกิดปฏิกิริยาได้และยังให้ผลเทียบเท่ากับการติดฉลากด้วยเอนไซม์ (55) Rock และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ในซีรัมโดยใช้เทคนิค silver-enhancement การติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ เทคนิค immunosorbent ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับเทคนิค ELISA แต่สามารถมองอ่านผลของสีปฏิกิริยาได้ด้วยตา (50) นอกจากนี้วิธีการนี้ยังนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ Rubella (56) และใช้ตรวจวิเคราะห์หาระดับ LDL ฮอรโมน เป็นต้น ซึ่งเทคนิค immunogold silver enhancement นี้ไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ มีราคาถูก และยังสามารถเห็นสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าจากปฏิกิริยาของเงินที่ติดอยู่บนอนุภาคทองคำ อีกทั้งสามารถเก็บภาพหลุมทดลองที่เกิดสีของปฏิกิริยาไว้ได้อีกด้วย

3.4 หลักการของ silver enhancement



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของ immunogold silver enhancement (57)

หลักการพื้นฐานและกระบวนการของ Immunogold silver enhancement คือ ไอออนของธาตุเงิน (silver ions) จะเกาะติดบริเวณพื้นผิวของผลึกนาโนทองคำ และรวมเป็นส่วนหนึ่งของผลึกนั้น ซึ่งไอออนดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดยรับอิเล็กตรอนจากรีดิวซ์โมเลกุลในสารละลายของผลึกนาโนทองคำกลายเป็นอะตอมของธาตุเงิน (58) เนื่องจากว่าอะตอมของธาตุเงินเกาะติดอยู่บริเวณผิวของผลึกนาโนจึงสามารถที่จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ตลอดตราบเท่าที่มีไอออนของเงินและตัวรีดิวซ์โมเลกุลเพียงพอในการเกิดปฏิกิริยา มีการประยุกต์ใช้อุณหภูมิทองคำเพื่อเพิ่มสัญญาณของปฏิกิริยาในเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน ดังภาพที่ 8 โดยใช้หลักการพื้นฐานทางเทคนิคภูมิคุ้มกันของการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี อุณหภูมิทองคำจะจับกับแอนติบอดีด้วยพันธะโควาเลนต์ในบริเวณส่วน F_{ab} ของแอนติบอดี โดยไม่ได้ไปเพิ่มขนาดและยังสามารถติดคงทนกับแอนติบอดี นอกจากนี้ยังไปเพิ่มคุณลักษณะของงานวิจัยให้ได้ผลที่ดีขึ้น โดยไปเพิ่มสัญญาณปฏิกิริยาให้ชัดเจน และยังสามารถแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้มากขึ้น (59) และเมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีก็จะสามารถมองเห็นได้ปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า จากสีทึบของอนุภาคเงิน



รูปที่ 9 แสดงภาพจำลองการเกิดอะตอมของธาตุเงิน (59)

สารเคมีที่เป็นเกลือของเงินที่สามารถนำมาใช้ได้นั้นมีหลากหลายชนิด ได้แก่ ซิลเวอร์แลคเตรต ซิลเวอร์ไนเตรต และซิลเวอร์อะซิเตรต โดยสองชนิดแรกมีความไวต่อแสงดั่งนั้นในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเพื่อให้เห็นสัญญาณจึงจำเป็นต้องทำในพื้นที่ที่ทึบแสง ส่วนซิลเวอร์อะซิเตรตนั้นไม่มีความไวต่อแสงจึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยาดังนั้นจึงเป็นสารที่ดีที่สุดที่ใช้ในเทคนิค immunogold silver enhancement

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

เป็นตัวอย่างของไลโปโปรตีนชนิดความเข้มข้นต่ำของมนุษย์ ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต บริษัท CELLBIOLAB สินค้าเลขที่ STA -214 โดย std. ox-LDL (copper oxidized human low-density lipoprotein) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.1.2 สิ่งส่งตรวจ

โครงการวิจัยนี้ใช้ซีรัมที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ของหน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งทางผู้วิจัยได้จัดทำหนังสือบันทึกข้อความขอซีรัมที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ ไปยังหัวหน้าหน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพเพื่อขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมที่เหลือจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 ราย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบันชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ไปรับรอง COA 139/66

3.2 เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องพิมพ์แวกซ์ (ColorQube 8570, Xerox)
- แท่นทำความร้อน (แท่นให้ความร้อน, Thermo Scientefic รุ่น CIMAREC⁺)
- เครื่องชั่งสาร (Mettler-Toledo, รุ่น MS603TS/00)
- เครื่องวัด pH meter (Mettler-Toledo, รุ่น SevenCompact)
- เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่น Evolution 300 (Thermo scientific)
- อ่างน้ำทำอุณหภูมิ
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง Micro ultracentrifuge รุ่น Himac CS 150GXL (Hitachi)
- Spin down

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, เบอร์ 2, เบอร์ 3
- แผ่นอะลูมิเนียม ขนาด 15 x 15 เซนติเมตร
- แผ่นรองซับชนิดมีเจล (Incontinence pad with gel, Softex)
- หลอดทดลองไมโครเซนติฟิว ขนาด 0.6, 1.5, 5 มิลลิลิตร
- ฐานยึดกระดาษ
- แผ่นพรอยด์
- PD-10 Desalting column (GE Healthcare)

3.2.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพ

- น้ำยาประสานอะคริลิก
- หลอดไฟ LED แบบเส้น แบบดวง
- ถ่านอัลคาไลน์ ชนิด 23 แอมป์ 12 โวลต์
- แผ่นอะคริลิกหนา 3 มิลลิเมตร
- แผ่นกระจก
- ฟิล์มป้องกันแสง
- แผ่นอะลูมิเนียม และแม่เหล็กขนาดเล็ก

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- Sodium periodate (NaIO_4 , Sigma)
- Lithium Chloride (LiCl , Sigma)
- Ethylene glycol (Sigma)
- Copper (II) sulfate (CuSO_4 , Merck)
- Potassium sodium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, Ajax Finechem)
- Sodium hydroxide (NaOH , Sigma)
- NaBH_3CN (NaBH_3CN , Sigma)
- Silver nitrate (Sigma)
- Hydroquinone (Sigma)
- สีสี 1% eosin
- สีสี aniline blue
- สีสี light green
- UltraPure Distilled Water (invitrogen)

- Deionized water (Housepreparation, VET-MED, AFRIMS, Thermo Science)
- น้ำชนิด milliQ จากเครื่องกรองน้ำคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Phosphate buffer saline tablet (#P4417, Sigma)
- Carbonate bicarbonate buffer capsule (#C3041, Sigma)
- Tween 20 (sigma)
- Skim milk (BD)

3.2.5 แอนติเจน และแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัย

- แอนติบอดีต่อ Copper oxidized LDL (rabbit anti ox-LDL, polyclonal, #AB14519, Abcam)
- แอนติบอดีต่อ apoprotein B (goat anti apo B, polyclonal, #AB98132, Abcam, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
- แอนติบอดีต่อ 4-nonenalhydroxyl (goat anti HNE, polyclonal, Bethyl, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
- แอนติบอดีต่อ apoprotein B-100 (mouse anti apo B-100 clone C1.4, monoclonal, Santacruz, 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
- Gold conjugation kit (40 นาโนเมตร, 20 OD, #AB154873, Abcam)
- Copper (Cu⁺) oxidized human low-density lipoprotein (Cu-ox-LDL, STA-214, CELLBIOLAB, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.2.6 สูตรที่ใช้คำนวณค่าความเข้มสี

ค่าความเข้มสีของช่องสีแดง สีน้ำเงิน และสีแดง ได้จากการใช้รูปภาพจากการทดลองนั้น ๆ ไปอ่านค่าความเข้มสี โดยใช้โปรแกรม ImageJ (Java-based image processing program พัฒนาโดย National Institutes of Health and the Laboratory) และนำมาคำนวณค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปตามสูตร ดังนี้

- สูตร Δ RGB

$$\Delta \text{ RGB} = \sqrt{(R_n - R_0)^2 + (G_n - G_0)^2 + (B_n - B_0)^2}$$

เมื่อ R_0, G_0, B_0 ได้จากค่าหลุม blank และ R_n, G_n, B_n ได้จากค่าของวงกการทดลองนั้น

- สูตร Gray scale

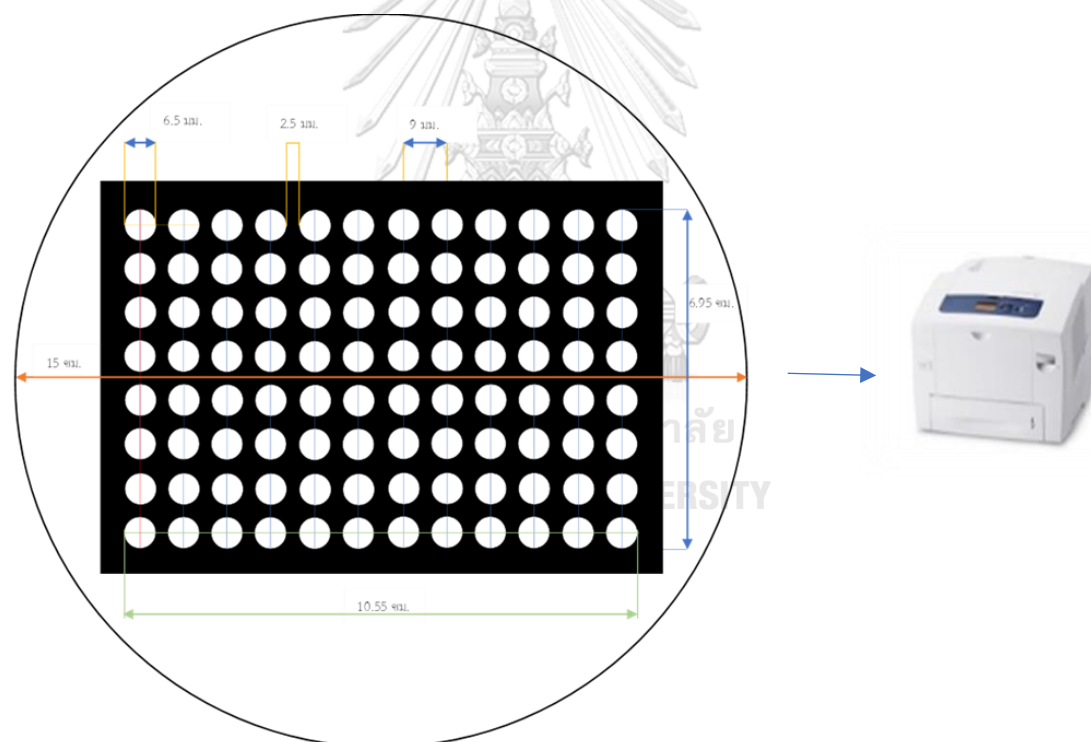
$$\text{Gray scale} = 0.299\text{red} + 0.587\text{green} + 0.114\text{blue}$$

3.3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การผลิตอุปกรณ์ต้นแบบบนฐานกระดาษ

3.3.1.1 การผลิตอุปกรณ์ต้นแบบบนฐานกระดาษ โดยเทคนิคการพิมพ์แวกซ์

เทคนิคการพิมพ์แวกซ์ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อสร้างขอบเขตส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยออกแบบให้มีลักษณะเหมือนไมโครเพลท 96 หลุม เพื่อสร้างเป็นอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนฐานกระดาษ โดยออกแบบสร้างพื้นที่วงกลมบนโปรแกรมไมโครซอฟท์ เวิร์ด 2010 ดังรูป 1 ให้เป็นรูปแบบคล้าย ไมโครเพลท 96 หลุม (12x8) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.65 มิลลิเมตร ระยะระหว่างวงกลม 0.25 มิลลิเมตร (รูปที่ 10) ติดกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บนกระดาษ A4 โดยใช้เทปใส พิมพ์หมึกแวกซ์สีดำลงบนกระดาษ A4 ดังกล่าว ณ ตำแหน่งที่มีกระดาษกรองติดอยู่ ด้วยเครื่องพิมพ์ (ColorQube 8570, Xerox)

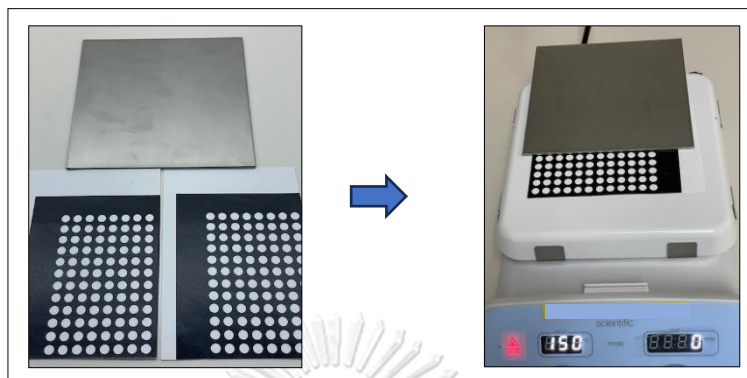


รูปที่ 10 แสดงวิธีการและรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

3.3.1.2 การทดสอบระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการละลายแวกซ์บนกระดาษ

ทดสอบหาระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้แวกซ์ละลายซึมเข้ากระดาษกรอง โดยการตั้งอุณหภูมิแทนให้ความร้อน 150 องศาเซลเซียส วางกระดาษกรองโดยหงายด้านที่

พิมพ์แว็กซ์ขึ้นบนแท่นให้ความร้อน วางทับด้วยแผ่นอะลูมิเนียม จับเวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับวิธีการตั้งอุณหภูมิแท่นให้ความร้อนก่อน 5 นาที แล้วค่อยวางกระดาษ จับเวลา ต่อ 5 นาที



รูปที่ 11 แสดงรูปแบบกระดาษ แผ่นอะลูมิเนียม และลักษณะการให้ความร้อนบนกระดาษ

3.3.1.3 การทดสอบหาปริมาณสารที่เหมาะสม

เพื่อทดสอบหาปริมาณสารที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน โดยใช้สีเขียวของสี light green สีส้มแดงของสี 1% eosin และสีน้ำเงินของสี aniline blue แปรผันปริมาณของสีเป็น 3, 4, 5 ไมโครลิตร ลงบนพื้นที่แต่ละวง ตามรูปที่ 12 สังเกตลักษณะการกระจายตัวของสีแต่ละวง



รูปที่ 12 แสดงสี และลักษณะของวงทดสอบที่ใช้ปริมาตรแตกต่างกัน

3.3.2 การทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการออกซิไดซ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

ในกระบวนการเตรียมฐานกระดาษต้องมีการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ แต่เนื่องจากว่ากระดาษไม่มีคุณสมบัติที่จะให้แอนติบอดีเกาะได้ด้วยพันธะโควาเลนต์ เนื่องจากกระดาษมีโครงสร้างเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ β -(1,4)-linked D-glucose units มี anhydro glucose unit (AGU) ซึ่งเป็นยูนิตซ้ำ ๆ กันในโครงสร้างของเซลลูโลส ในกระบวนการตรึงแอนติบอดีจะต้องทำให้กระดาษที่มี

โครงสร้างเป็นเซลลูโลสเปลี่ยนสภาพเป็น dialdehyde cellulose (DAC) ก่อน โดยใช้เพอร์ริโอเดท ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ซึ่ง

3.3.2.1 การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดท เตรียมสารละลายเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดท โดยชั่ง 532 มิลลิกรัม ของโซเดียมเพอร์ริโอเดทในน้ำ milliQ 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงจนละลาย นำมาเจือจางให้เป็น 0.4 โมลาร์, 0.3 โมลาร์, 0.2 โมลาร์, 0.1 โมลาร์ และ 0.05 โมลาร์ ปริมาตรความเข้มข้นละ 70 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนติฟิว ขนาด 0.6 มิลลิลิตร ตามสูตร

$$C1V1 = C2V2 \text{ ได้ว่า}$$

ตารางที่ 6 แสดงการคำนวณเพื่อเจือจางสารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น สดท้าย NaIO ₄ (โมลาร์)	ปริมาตร 0.5 โมลาร์ NaIO ₄ (มล.)	Milli Q (มล.)	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)
0.4	56	14	70
0.3	42	28	70
0.2	28	42	70
0.1	14	56	70
0.05	7	63	70

วิธีการทดลอง

- 1). หยดสารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดท 5 ไมโครลิตร ของความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละวง โดยทำ 3 ซ้ำ ตามรูป 13 บ่มที่ทึบแสงโดยใช้แผ่นฟรอยด์ปิด จับเวลา 1 ชั่วโมง หยดล้างด้วยน้ำ milliQ วงละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 2). หยดโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) 3 ไมโครลิตร บนกระดาษ บ่มที่ทึบแสง เป็นเวลา 20 นาที หยดล้างด้วยน้ำ milliQ วงละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ตั้งกระดาษทิ้งไว้ให้แห้ง ประมาณ 15 นาที
- 3). เตรียมสารละลายเพห์ลิง โดยไปเปิดสารละลายเข้มข้น A และสารละลายเข้มข้น B อย่างละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ป้องกันจากแสง)

- 4). นำกระดาษที่แห้งสนิทแล้ว มาให้ความร้อนด้วย แพนให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จับเวลา 2 นาที
- 5). หยดสารละลายเพห์ลิ่ง วงละ 4 ไมโครลิตร จับเวลา 45 วินาที เมื่อครบเวลา นำกระดาษมาสแกน ด้วยเครื่องพิมพ์ HP (รุ่น HP Ink Tank wireless 415) วัดค่าความเข้มสีโดยใช้โปรแกรม ImageJ ระบบ RGB และคำนวณค่า Δ RGB



รูปที่ 13 แสดงลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้ในการยึดติด ครอบกระดาษ และแผ่นซับขณะหยดล้าง

3.3.2.2 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของการออกซีไดซ์กระดาษด้วยสารละลายโซเดียมเพอร์ริออดีท

วิธีการทดลอง

- 1). หยดสารละลายโซเดียมเพอร์ริออดีท เข้มข้น 0.5 โมลาร์ 5 ไมโครลิตร ในแต่ละวง แพร่พื้นระยะเวลาที่ออกซีไดซ์ ที่เวลา 20 นาที 30 นาที 45 นาที 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ ปุ่มที่ทึบแสงโดยใช้แผ่นพรอยด์ครอบ เมื่อครบเวลา หยดล้างด้วยน้ำ milliQ วงละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 2). ทำซ้ำตามวิธีการทดลอง 3.3.2.1 ตั้งแต่ข้อ 2-5

3.3.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมในการออกซีไดซ์กระดาษ

เตรียมสารละลายผสมระหว่าง 0.5 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออดีท และ 17.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ แล้วนำมาเจือจางให้ได้สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายผสมเป็น 0.7 โมลาร์, 1.4 โมลาร์, 2.1 โมลาร์, 2.8 โมลาร์ และ 3.5 โมลาร์ ซึ่งผสมอยู่กับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออดีท ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.4 โมลาร์ ทำการทดสอบ ดังนี้

วิธีการทดลอง

- 1). หยดสารละลายผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 10 ไมโครลิตร ในแต่ละวง โดยทำซ้ำปฏิกิริยาละ 3 วง บ่มที่ทับแสง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างด้วยน้ำ milliQ วงละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

ตารางที่ 7 แสดงการคำนวณเพื่อเจือจางสารละลายผสม (ระหว่างสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท และ สารละลายลิเทียมคลอไรด์)

สารละลาย NaIO ₄			สารละลาย LiCl			ปริมาตรทั้งหมด (มล.)
ความเข้มข้นตั้งต้น (โมลาร์)	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้นสุดท้าย (โมลาร์)	ความเข้มข้นตั้งต้น	ปริมาตร (มล.)	ความเข้มข้นสุดท้าย (โมลาร์)	
0.5	40	0.4	3.5	10	0.7	50
	40		7	10	1.4	50
	40		10.5	10	2.1	50
	40		14	10	2.8	50
	40		17.5	10	3.5	50

- 2). ทำซ้ำตามวิธีการทดลอง 3.3.2.1 ตั้งแต่ข้อ 2-5

3.3.2.4 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลายผสม

เพื่อทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษ โดยใช้สารละลายผสม (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท และ 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ โดยบ่มทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 45 นาที ถึง 4 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

- 1). หยดสารละลายผสม จำนวน 10 ไมโครลิตร ในแต่ละวง แปรผันระยะเวลาในการบ่ม ตั้งแต่ 45 นาที 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่ทับแสงตามระยะเวลาที่กำหนดโดยใช้แผ่นฟรอยด์ครอบ เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำ milliQ วงละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 2). ทำซ้ำตามวิธีการทดลอง 3.3.2.1 ตั้งแต่ข้อ 2-5

3.3.3 การตรึงแอนติบอดี

3.3.3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่มสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ ในการช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ

การทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ ภายหลังจากการทำออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลายผสมระหว่าง 0.4 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท และ 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์แล้ว หยดแอนติบอดีบนกระดาษ หมู่อะมิโน (-NH₂) ของแอนติบอดีจะจับกับ หมู่อัลดีไฮด์ (-COOH) บนกระดาษ เป็นพันธะ imine ซึ่ง ต้องอาศัยสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ เป็นตัวเพิ่มความแข็งแรงของพันธะ การทดลองนี้จะเป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

- 1). ภายหลังจากการออกซิไดซ์กระดาษ เพื่อให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษแล้ว หยด anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 (เจือจางแอนติบอดีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์) จำนวน 5 ไมโครลิตร เป็นเวลา 45 นาที
- 2). แปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ เป็น 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ โดยหยดความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ โดยเริ่มที่ 20 นาที 30 นาที และ 50 นาที ตามลำดับ
- 3). เมื่อครบเวลา ล้างหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ทิ้งให้แห้งสนิท ประมาณ 15 นาที
- 4). ทดสอบหมู่อัลดีไฮด์ โดยนำกระดาษที่ถูกตรึงด้วยแอนติบอดี ให้ความร้อนบนแท่นให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส จับเวลา 2 นาที หยดสารละลายเพห์ลิง วงละ 4 ไมโครลิตร จับเวลา 45 วินาที
- 5). เมื่อครบเวลาถ่ายภาพผลการทดสอบ ภายใต้อ่างถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ ระบบ RGB และคำนวณค่า Δ RGB

3.3.3.2 การทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่ม 1° Ab (anti ox-LDL)

เพื่อทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม anti ox-LDL ซึ่งเป็น 1° Ab แปรผันเวลาในการบ่ม ที่ 20, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นหยดสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที โดยบ่มในกล่องรักษาความชื้น ดังรูป 14 หลังจากนั้นนำไปทดสอบความคงเหลือของหมู่อัลดีไฮด์ด้วยสารละลายเพห์ลิง

วิธีการทดลอง:

- 1). ภายหลังจากการออกซิไดซ์กระดาษแล้ว หยด anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 จำนวน 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 20, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ
- 2). หยดสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที

3). ทำซ้ำตามวิธีการทดลอง 3.3.3.1 ตั้งแต่ข้อ 3-5



รูปที่ 14 แสดงการนำกล่องรักษาความชื้นมาใช้ในการทดลอง

3.3.3.3 การทดสอบสภาวะคงตัวของการกระดาช

3.3.3.3.1 การทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาชภายหลังจากออกซิไดซ์

เพื่อทดสอบความคงตัวของหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาชภายหลังจากออกซิไดซ์ด้วยสารละลายผสมระหว่าง 0.4 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท และ 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ทดสอบตั้งกระดาชทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 0 ถึง 144 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนดังนี้

วิธีการทดลอง

- 1). ภายหลังจากการออกซิไดซ์กระดาช วางกระดาชไว้ในที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันเวลาเป็น 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง
- 2). ทำการทดสอบหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาช ด้วยสารละลายเฟห์ลิง
- 3). เมื่อครบเวลาถ่ายภาพผลการทดสอบ ภายใต้อ่างถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ ระบบ RGB และคำนวณค่า Δ RGB

3.3.3.3.2 การทดสอบสภาวะคงตัวของการกระดาช ภายหลังจากตรึงแอนติบอดี

เพื่อทดสอบหาความคงตัวของแอนติบอดีบนของกระดาชกรอง หลังจากการตรึง 1° Ab (anti ox-LDL) ที่เจือจาง 1:500 และเพิ่มความยึดแน่นของพันธะ imine ด้วย 1 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ โดยทดสอบตั้งกระดาชทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง มีขั้นตอนดังนี้

วิธีการทดลอง:

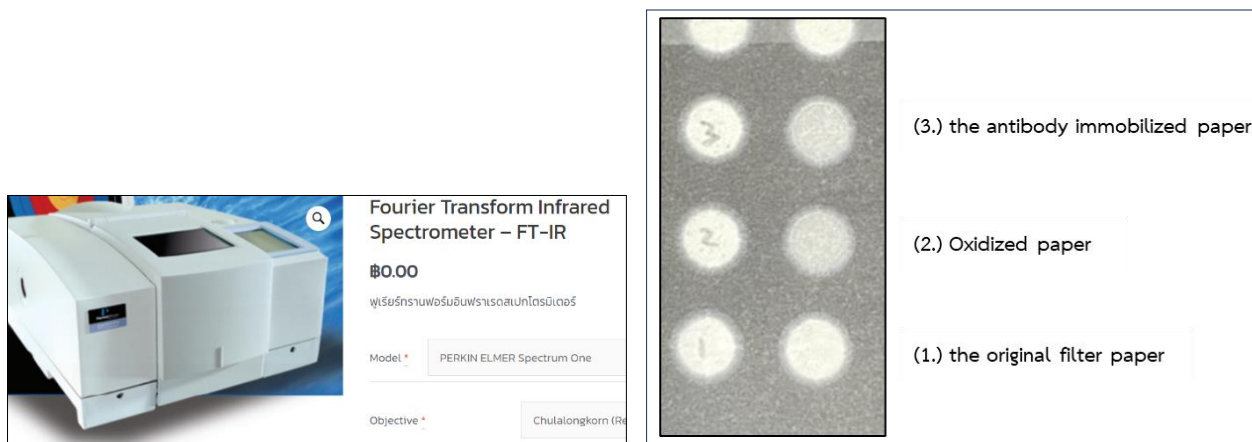
- 1). ภายหลังจากการออกซิไดซ์กระดาช แล้ว หยด anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 จำนวน 5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
- 2). หยดสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที

- 3). เมื่อครบเวลา หยดล้างแต่ละหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 2, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง
- 4). เมื่อครบเวลาทดสอบหมู่อัลดีไฮด์ด้วยสารละลายเพห์ลิ่ง
- 5). เมื่อครบเวลาถ่ายภาพผลการทดสอบ ภายใต้กล้องถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์มือถือ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ ระบบ RGB และคำนวณค่า Δ RGB

3.3.3.4 การส่งทดสอบ FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer)

ทางผู้วิจัยส่งตัวอย่างกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของกระดาษจากเซลลูโลสเป็นหมู่อัลดีไฮด์ และตัวอย่างหลุมกระดาษที่ถูกตรึงแอนติบอดีแล้ว ไปทดสอบ FTIR เพื่อเปรียบเทียบกับหลุมกระดาษเปล่า เป็นการยืนยันผลของการออกซิไดซ์ และตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ โดยใน

- หลุมที่ 1 เป็นหลุมกระดาษเปล่า ไม่มีการเพิ่มเติมหรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของกระดาษ
- หลุมที่ 2 ออกซิไดซ์กระดาษ ด้วย 0.4 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออดेट และ 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ 10 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างน้ำอัลตราเพียว 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง และหยด 3 ไมโครลิตร ของ PEG ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างด้วยน้ำอัลตราเพียว 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง
- หลุมที่ 3 เป็นหลุมที่ถูกตรึงแอนติบอดี โดยออกซิไดซ์กระดาษด้วยวิธีการข้างต้น หลังจากนั้นทำการหยด anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:400 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วหยดสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 5 ครั้ง
- นำกระดาษส่งตรวจทดสอบ FTIR กับทางศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์โดยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ ยี่ห้อ Bruker รุ่น INVENIO S



รูปที่ 15 แสดงเครื่องมือและรูปแบบของกระดาษก่อนนำไปทดสอบ FTIR assay

3.3.4 การทดลอง Paper base immunoassay

งานวิจัยนี้ใช้แอนติบอดีทั้งหมด 2 คู่ ได้แก่ anti ox-LDL (1° Ab) กับ anti apo B polyclonal (2° Ab) และ anti HNE (1° Ab) กับ anti apo B-100 monoclonal (2° Ab) ตามลำดับ

การเตรียม 2° Ab ที่อยู่ในรูป antibody conjugated with gold nanoparticles โดยการติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำจากชุด Gold conjugation kit ของ Abcam ทำโดยการเจือจางแอนติบอดีด้วยตัวเจือจางที่มากับชุดทดสอบ ให้ได้ความเข้มข้นแอนติบอดีเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปผสมกับบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ในชุดทดสอบละลายกับอนุภาคทองคำ (gold 40 นาโนเมตร) จะได้ gold conjugated antibody ที่แอนติบอดีมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.0198 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข

3.3.4.1 แอนติบอดีคู่ที่ 1 ทดสอบระหว่าง 1° Ab: anti ox-LDL (Abcam) กับ 2° Ab: gold conjugated anti Apo B (Abcam)

3.3.4.1.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab (anti ox-LDL)

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และใช้ 2° Ab คือ gold conjugated anti apo B ที่เจือจาง 1:10 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยมีการทดสอบ ดังนี้

1). ภายหลังจากการออกซิไดซ์กระดาษแล้ว หยด anti ox-LDL เจือจาง 1:50 1:100 และ 1:500 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 4 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ในกล่องรักษาความชื้น คงสภาพการตรึงแอนติบอดีด้วย 1 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ จำนวน 5

ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างแต่ละหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 5 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

2). หยด 5% skim milk หลุมละ 10 ไมโครลิตร ล้างแต่ละหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

3). ทำการหยด std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และหยดหลุมควบคุมด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

4). หยด 2° Ab (gold conjugated anti apo B Ab) ที่เจือจาง 1:10 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ทุกหลุมทดสอบ เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

5). ผสมสารละลาย silver enhancement ระหว่าง 0.3% ซิลเวอร์ไนเตรต กับ 3% ไฮโดรควิโนน ที่ละลายใน 0.01 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4 ในอัตราส่วน 1:1 หยดสารดังกล่าวในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในที่มืด 10 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างด้วยน้ำ milliQ หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที

6). ถ่ายภาพผลการทดสอบภายใต้กล้องถ่ายภาพด้วยโทรศัพท์ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

3.3.4.1.2 การทดสอบกับ std. ox-LDL

ทำการทดสอบการตรวจวัดปริมาณ ox-LDL จาก std. ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้น เนื่องจากความเข้มข้นของ ox-LDL ยังไม่มีค่ามาตรฐานที่ใช้อ้างอิง ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ค่าอ้างอิงจากรายงานของ Ali และ Holvoet ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ดังนี้

การทดสอบที่ 1 อ้างอิงค่า ox-LDL รายงานโดย Ali และคณะ ตามตารางที่ 4 ซึ่งรายงานระดับ ox-LDL ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2, โรคเมตาบอลิกซินโดรม, โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ร่วมกับโรคความดันโลหิตสูง และจากคนปกติ อยู่ในช่วง 104-221 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้ค่า std. ox-LDL คือ 100 – 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มาเป็นค่ามาตรฐานในการทดสอบ โดยมีวิธีการดังนี้

1). เมื่อออกซิไดซ์กระดาษเพื่อให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษแล้ว หยด anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 จำนวน 5 ไมโครลิตร ของ เป็นเวลา 30 นาที

2). หยดสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างแต่ละหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ทิ้งให้แห้ง ประมาณ 10 นาที

3). หยด 5% skim milk เพื่อไม่ให้เกิดสีพื้นหลัง หรือเพื่อป้องกันการจับของตัวรับกวนอื่น หลุมละ 10 ไมโครลิตร ล้างแต่ละหลุมทดสอบด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

4). หยด std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 3 ไมโครลิตร หยดหลุมควบคุม เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

5). หยด gold conjugated anti apo B ซึ่งเป็น 2° Ab ที่เจือจาง 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทุกหลุมทดสอบ หลุมละ 3 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

6). ผสมสารละลาย silver enhancement ระหว่าง 0.2% ซิลเวอร์ไนเตรต (สารละลาย A) กับ 0.5% ไฮโดรควิโนน (สารละลาย B) ที่ละลายใน ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 3.8 ในอัตราส่วน 1:1 หยดสารดังกล่าวในแต่ละหลุมทดสอบ 10 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างด้วยน้ำ milliQ หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที

7). ถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ภายใต้กล้องถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

การทดสอบที่ 2: อ้างอิงค่า ox-LDL รายงานโดย Holvoet และคณะ ตามตารางที่ 3 ซึ่งรายงานระดับ ox-LDL ที่ได้จากกลุ่มคนปกติ และคนที่ เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ มีค่า ox-LDL อยู่ในช่วง 4-45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ 3.3.4.1.2 วิธีการทดสอบที่ 1 โดยใช้ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเป็นค่ามาตรฐานในการทดสอบ

3.3.4.1.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ gold conjugated anti apo B

การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti apo B ซึ่งเป็น 2° Ab กับ std. ox-LDL มีทั้งหมด 3 การทดสอบ

การทดสอบครั้งที่ 1: ใช้ความเข้มข้นของ anti apo B ที่เจือจาง 1:5 และ 1:20 และ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 1 ug/mL

จากการทดลองที่ผ่านมา จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นยังไม่ชัดเจน แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL ผู้วิจัยจึงมาพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ anti apo B ในการทดลองนี้ได้

เปรียบเทียบ ความเข้มข้นของ anti apo B ที่เจือจาง 1:5 และ 1:20 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1.2 และใช้ anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 ตรึงบนกระดาษ

การทดสอบครั้งที่ 2: ใช้ความเข้มข้นของ anti apo B ที่เจือจาง 1:5, 1:10, 1:20, 1:100 และ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดลองก่อนหน้ายังเห็นผลไม่ชัดเจน ผู้วิจัยได้เพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และได้ปรับความเข้มข้นของ anti apo B เจือจางเป็น 1:5, 1:10, 1:20, 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.1.2 และใช้ anti ox-LDL ที่เจือจาง 1:500 ตรึงบนกระดาษ

การทดสอบครั้งที่ 3:

เป็นการทดลองซ้ำ จากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยในครั้งนี้ได้เจือจางความเข้มข้นของ 2° Ab เป็น 1: 50 และ 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 2 ความเข้มข้นที่ 1 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการทดลองเช่นเดิม และยังคงใช้ anti ox-LDL ความเข้มข้น 1:500 ตรึงบนกระดาษ

3.3.4.2 การทดสอบกับแอนติบอดีคู่ที่ 2 ระหว่าง 1° Ab: anti-HNE

(goat/polyclonal/Bethyl Laboratories และ 2° Ab: gold conjugated anti apo B-100 Ab (mouse/monoclonal/ Santa Cruz)

เนื่องจากการทดสอบในข้อ 3.3.4.1 ไม่เห็นผลการทดสอบ จึงเปลี่ยนชนิด 1° Ab จาก anti ox-LDL เป็น anti HNE และ 2° Ab จาก anti apo B polyclonal เป็น anti apo B-100 monoclonal โดยมีการทดสอบ ดังนี้

3.3.4.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ anti HNE (1° Ab)

ทดสอบกับ std. ox-LDL มีทั้งหมด 3 การทดลอง โดยทดลองตามวิธีการ ข้อ 3.4.1.1 มีรายละเอียดตามตารางที่ 6 และในการทดลองนี้ได้เพิ่มตัวอย่างของ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบว่าสามารถใช้ทดแทน std. ox-LDL ในการทดสอบต่อไปได้หรือไม่

ตารางที่ 8 แสดงรายละเอียดของสารที่ใช้ในแต่ละครั้งของการทดลองที่ 3.3.4.2.1

การทดลองที่	ความเข้มข้น 1° Ab	ความเข้มข้น 2° Ab	std. ox-LDL (มก./มล.)	In house ox-LDL (มก. โปรตีน/มล.)
1	1:500, 1:1,000	1:50	25, 50, 100	100
2	1:500, 1:1,000	1:20	25, 50, 100	100, 200
3	1:500	1:50	50, 100, 200, 400	100, 200, 400

การทดสอบครั้งที่ 1:

- 1). หลังจากการออกซิไดซ์กระดาษเพื่อให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษแล้ว หยด 4 ไมโครลิตร ของ anti HNE ที่เจือจาง 1:500 และ 1:1,000 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที คงสภาพการตรึงแอนติบอดีด้วยสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ล้าง 5 ครั้ง ด้วย 0.05% PBST บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 2). ใช้ 5% skim milk เป็นตัว blocking แล้วทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร โดยทำหน้าที่เป็นหลุมไม่ทราบค่าและหยดหลุม ควบคุม ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 3). หยด 2° Ab anti apo-B 100 ที่เจือจาง 1:50 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 นาทีทุกหลุมทดสอบ เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล
- 4). ผสมสารละลาย silver enhancement ระหว่าง 0.3% ซิลเวอร์ไนเตรต กับ 3% ไฮโดรควิโนน ที่ละลายใน 0.5 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4 ในอัตราส่วน 1:1 หยดสารดังกล่าวในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร 10 นาที ภายใต้สภาวะมืด เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างด้วยน้ำ milliQ หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล ทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที แล้วถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ภายใต้กล้องถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

การทดสอบครั้งที่ 2:

- 1). ทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 1 โดยการตรึง anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 และ 1:1,000

- 2). ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร และหยุดหลุมควบคุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที
- 3). หยุด 2° Ab anti apo-B 100 ที่เจือจาง 1:20 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 นาทีทุกหลุมทดสอบ
- 4). หยุด silver enhancement (เช่นเดียวกับการทดสอบที่ 1) ในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร 10 นาที ล้างแล้วทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที ถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ภายใต้กล้องถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

การทดสอบครั้งที่ 3:

- 1). ทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 1 โดยการตรึง anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500
- 2). ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร และหยุดหลุมควบคุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที
- 3). หยุด 2° Ab Anti apo-B 100 เจือจาง 1:50 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 นาที ทุกหลุมทดสอบ
- 4). หยุด silver enhancement (เช่นเดียวกับการทดสอบที่ 1) ในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร 10 นาที ล้างแล้วทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที ถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ภายใต้กล้องถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

3.3.4.2.2 การทดสอบเปรียบเทียบกระดาษกรองแต่ละชนิด

เนื่องจากผลการทดลอง 3.3.4.2.1 จากการทดลองที่ 1 กระดาษต้นแล้วเกิดสีปฏิกิริยาขึ้น ผู้วิจัยจึงคิดว่าการใช้กระดาษกรองที่มี pore size เล็กกลง อาจทำให้ผลการทดสอบดีขึ้น จึงได้ลองนำกระดาษกรองทั้ง 3 เบอร์ มาทดสอบหาความเหมาะสม

3.3.4.2.2.1 การเปรียบเทียบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษกรองแต่ละชนิด

- 1). สร้างพื้นที่วงกลมให้เป็นรูปคล้าย ไมโครเพลท 96 หลุม (12x8) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.65 มิลลิเมตร ระยะระหว่างวงกลม 0.25 มิลลิเมตร บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เบอร์ 2 และเบอร์ 3 ด้วยเครื่องพิมพ์แวกซ์ และทำให้แวกซ์ละลายโดยให้ความร้อนบนแท่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 2). ออกซิไดซ์กระดาษแล้วหยุด ของ anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 โดยเจือจางแอนติบอดีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที คงสภาพการตรึงแอนติบอดีด้วยสารละลายโซเดียม

ไซยาโนโบโรไฮไดรด์ 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ล้าง 5 ครั้ง ด้วย 0.05% PBST บนแผ่นซับชนิดมีเจล

3). ทดสอบหมู่อัลติไฮด์ด้วยสารละลายเฟห์ลิง เมื่อครบเวลาถ่ายภาพผลการทดสอบ ภายใต้กล้องถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ภายใต้กล้องถ่ายภาพ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณหาค่า ΔRGB

3.3.4.2.2.2 การเปรียบเทียบการตรวจวัด ox-LDL บนกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิด

ทดสอบกับ std. ox-LDL และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ โดยมีทั้งหมด 3 การทดลอง ตารางที่ 9 แสดงรายละเอียดของสารที่ใช้ในแต่ละครั้งของการทดลองที่ 3.3.4.2.2.2

การทดลองที่	กระดาษเบอร์	ความเข้มข้น 1° Ab	ความเข้มข้น 2° Ab	std. ox-LDL (มก./มล.)	In house ox-LDL (มก. โปรตีน/มล.)
1	1, 2, 3	1:500	1:20	25, 50, 100	100
2	1, 2	1:500	1:20	-	25, 50, 100
3	2	1:500	1:20	-	12.5, 25, 50, 100, 200, 400

การทดลองที่ 1: เป็นการทดสอบ ox-LDL บนกระดาษทั้ง 3 เบอร์ เพื่อเปรียบเทียบว่าชนิดไหนเหมาะสมที่สุด

1). หลังจากการออกซิไดซ์กระดาษ เพื่อให้เกิดหมู่อัลติไฮด์บนกระดาษแล้ว หยด 4 ไมโครลิตร ของ anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 เจือจางแอนติบอดีด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที คงสภาพการตรึงแอนติบอดีด้วยสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ล้าง 5 ครั้ง ด้วย 0.05% PBST บนแผ่นซับชนิดมีเจล

2). ใช้ 5% skim milk เป็นตัว blocking แล้วทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร และหยดหลุมควบคุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

3). หยด 2° Ab anti apo-B 100 เจือจาง 1:20 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 นาทีทุกหลุมทดสอบ เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

4). หยด silver enhancement (เช่นเดียวกับการทดสอบ 3.3.4.2.1) ในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร 10 นาที ล้างแล้วทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที ถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์ ภายใต้กล้องถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

การทดลองที่ 2: ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบที่ 1 โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 2 และทดสอบเฉพาะ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดลอง

การทดลองที่ 3: ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบที่ 1 โดยใช้เฉพาะกระดาษกรองเบอร์ 2 และทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดลอง

3.3.4.2.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 3.3.4.2.1 โดยใช้เฉพาะกระดาษกรองเบอร์ 2 หลังจากการออกซิไดซ์กระดาษ หยด anti HNE เจือจางที่ 1:250, 1:500 และ 1:1000 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บ่มเป็นเวลา 30 นาที คงสภาพการตรึงแอนติบอดีด้วยสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ทดสอบเฉพาะ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดลอง

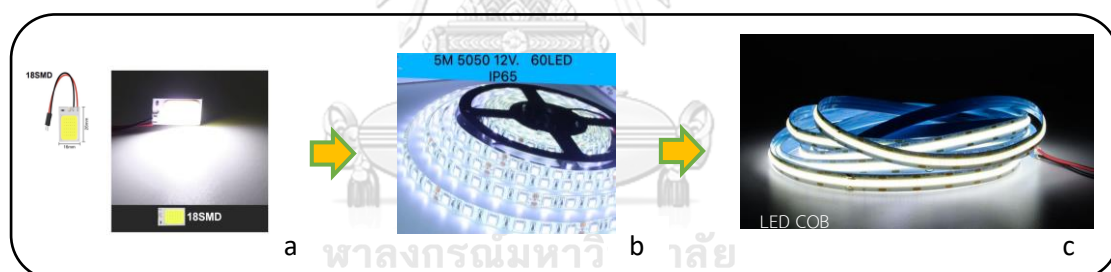
3.3.4.2.2.4 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม ox-LDL และ 2° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2 1). ทดลองเช่นเดียวกับ

3.3.4.2.1 โดยใช้เฉพาะกระดาษกรองเบอร์ 2 หลังจากการออกซิไดซ์กระดาษ ตรึง anti HNE เจือจางที่ 1:500 ทดสอบเฉพาะ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้น 25 50 และ 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร มาทดลอง และหยดหลุมควบคุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทดสอบบ่มที่เวลา 30 45 และ 60 นาที หยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

2). หยด 2° Ab Anti apo-B 100 เจือจาง 1:20 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บ่มที่เวลา 30 45 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาหยดล้างด้วย 0.05% PBST หลุมละ 10 ไมโครลิตร 1 ครั้ง บนแผ่นซับชนิดมีเจล

3). หยด silver enhancement (เช่นเดียวกับการทดสอบ 3.3.4.2.1) ในแต่ละหลุมทดสอบ 5 ไมโครลิตร 10 นาที ล้างแล้วทิ้งให้แห้ง ประมาณ 15-20 นาที ถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยโทรศัพท์มือถือถ่ายภาพ อ่านค่าความเข้มสีโหมด gray scale ด้วยโปรแกรม ImageJ

3.5 การประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพ



รูปที่ 16 แสดงหลอดไฟแต่ละชนิด ที่นำมาประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพแต่ละรุ่น

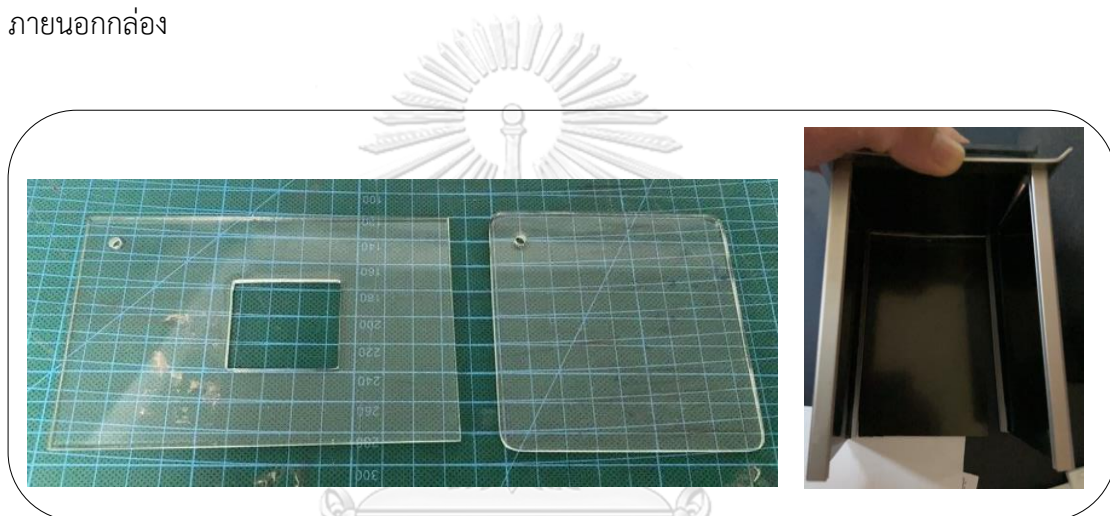
a. ไฟเพดานรถ b. ไฟ LED รุ่น 5050 c. ไฟ LED COB

ประยุกต์ใช้โครงและกระจกครอบตาซัง นำมาประกอบให้ครบทั้ง 4 ด้าน ด้วยแผ่นอะคริลิคขนาด 8.2 x 13 เซนติเมตร โดยเจาะรู เพื่อใช้เป็นช่องให้เลนส์โทรศัพท์เข้าถึง ดังภาพที่ 21 แล้วปิดท้ายถาวรด้วยแผ่นอะคริลิคขนาด 8.8 x 8.8 เซนติเมตร เจาะรูเพื่อสอดสายไฟได้ ติดและต่อไฟภายในโดย

- โมเดลที่ 1 ใช้ไฟเพดานรถ แสงขาว ขนาด 16 x 26 มิลลิเมตร 18 SMD ติดบริเวณด้านท้ายของกล่อง เพื่อให้ไฟตกทั่วทั้งกล่องถ่ายภาพ

- โมเดลที่ 2 ใช้ไฟ LED เส้น strip 12 โวลต์ รุ่น 5050 กว้าง 10 มิลลิเมตร ความสูง-หนา 3 มิลลิเมตร องศาการกระจายแสง 120 องศา สีของแสงความสว่าง 720 ลูเมน/ 12-16 ดวงไฟ ต่อภายในกล่อง
- โมเดลที่ 3 ใช้ แถบไฟ LED COB ชนิดชิปออนบอร์ด องศาการกระจาย 180 องศา แสงขาว 6500K ต่อภายในกล่อง

ติดฟิล์มทึบแสงโดยรอบทั้ง 4 ด้าน รวมถึงฝาด้านหน้าและด้านหลัง และใช้แผ่นเหล็ก หนา 1 มิลลิเมตร ขนาด 7.5 x 12 เซนติเมตร ปูพื้น เพื่อใช้เป็นด้านที่ใช้ยึดติดกับแม่เหล็กนีโอไดเมียม สำหรับตรึงผลกระดาษที่ได้จากการทดสอบ ต่อวงจรไฟ โดยใช้ถ่าน 24A 12 โวลต์ และมีสวิตซ์ไฟประกอบอยู่ภายนอกกล่อง



รูปที่ 17 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพ

บทที่ 4

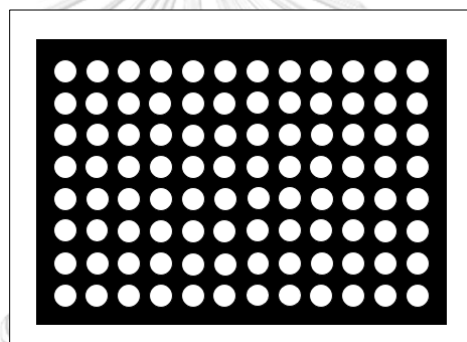
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการดำเนินการวิจัย

4.1.1 ผลการผลิตุอุปกรณ์ต้นแบบบนกระดาษ

4.1.1.1 ผลการผลิตุอุปกรณ์ต้นแบบบนกระดาษ โดยเทคนิคการพิมพ์แว็กซ์

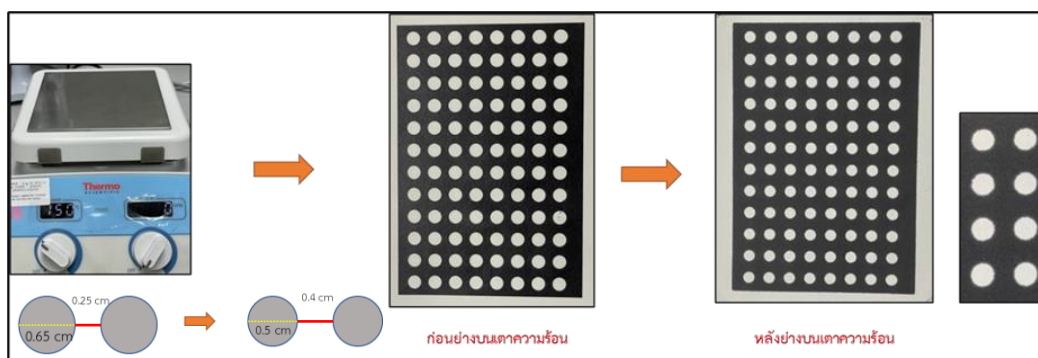
ทำการออกแบบฐานกระดาษสำหรับอุปกรณ์การตรวจวัดบนฐานกระดาษให้มี รูปแบบเดียวกันกับไมโครไตเตอร์เพลทที่ใช้ในงาน conventional ELISA ออกแบบให้เป็นวงกลมให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.65 เซนติเมตร และระยะระหว่างวงที่ใช้ทดสอบ 0.25 เซนติเมตร นำเข้าเครื่องพิมพ์แว็กซ์ สีดำลงบนกระดาษ Whatman เบอร์ 1 ดังแสดงรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงตัวอย่างรูปแบบอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษหลังพิมพ์แว็กซ์

4.1.1.2 ผลการทดสอบระยะเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการละลายแว็กซ์บนกระดาษ

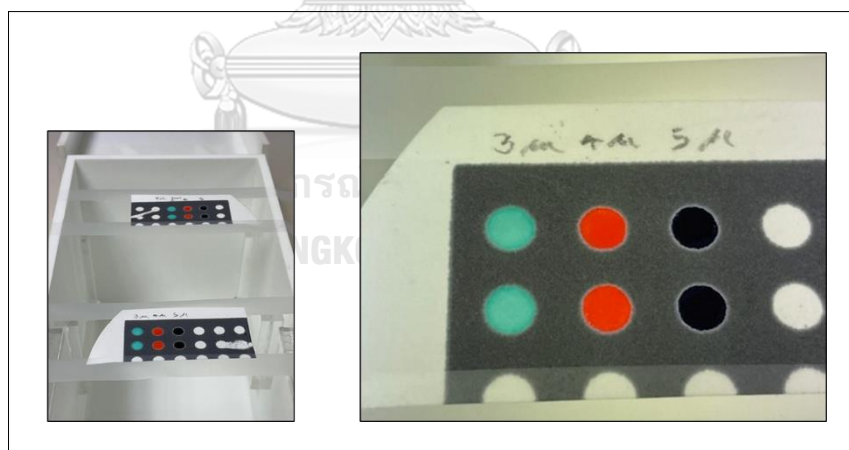
นำกระดาษที่พิมพ์แว็กซ์เรียบร้อยแล้วมาให้ความร้อนบนแท่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส โดยหงายหน้าด้านพิมพ์แว็กซ์ขึ้นวางทับด้วยแผ่นอลูมิเนียม พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่ใช้ทดสอบมีขนาดเล็กลง เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมทดสอบก่อนให้ความร้อนลดลงจาก 0.65 มิลลิเมตร เป็น 0.5 มิลลิเมตร และระยะห่างระหว่างวงที่ใช้ทดสอบก่อนให้ความร้อนเพิ่มขึ้นจาก 0.25 มิลลิเมตร เป็น 0.4 มิลลิเมตร ดังแสดงรูปที่ 19 และจากการทดสอบหาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการละลายแว็กซ์ พบว่าไม่มีข้อแตกต่างของกระดาษภายหลังจากการให้ความร้อนทั้ง 2 วิธี โดยการทดลองที่ 1 ใช้เวลา 5 นาที และการทดลองที่ 2 ใช้เวลา 10 นาที ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการทดลองที่ 1 เพื่อลดระยะเวลาและนำมาใช้ในงานวิจัย



รูปที่ 19 แสดงลักษณะการให้ความร้อนบนกระดาษ และรูปแบบกระดาษก่อนและหลังให้ความร้อน

4.1.1.3 ผลการทดสอบหาปริมาตรสารที่เหมาะสม

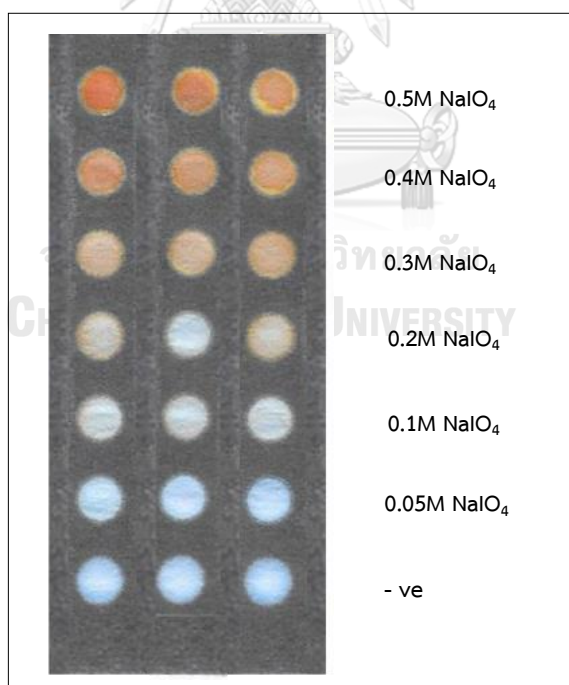
จากผลการทดลองเบื้องต้นโดยการแปรผันปริมาตรเป็น 3 ปริมาตร ได้แก่ 3, 4 และ 5 ไมโครลิตร พบว่าสีในแต่ละวงไม่ซึมเข้ามวงและมีลักษณะท่วมทั่วพื้นที่วงกลม นอกจากนี้พบว่า ปริมาตร 3 และ 4 ไมโครลิตร ไม่เยิ้มฉ่ำมากจนเกินไป ส่วนปริมาตร 5 ไมโครลิตร มีลักษณะท่วมฉ่ำ แต่ให้ความร้อนไรก็ตามปริมาตรการหยดในแต่ละครั้งต้องคำนึงถึงระยะเวลาในการบ่มสาร ซึ่งถ้าใช้ระยะเวลาในการบ่มสารมากทางผู้วิจัยเลือกหยดปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้สารแห้ง



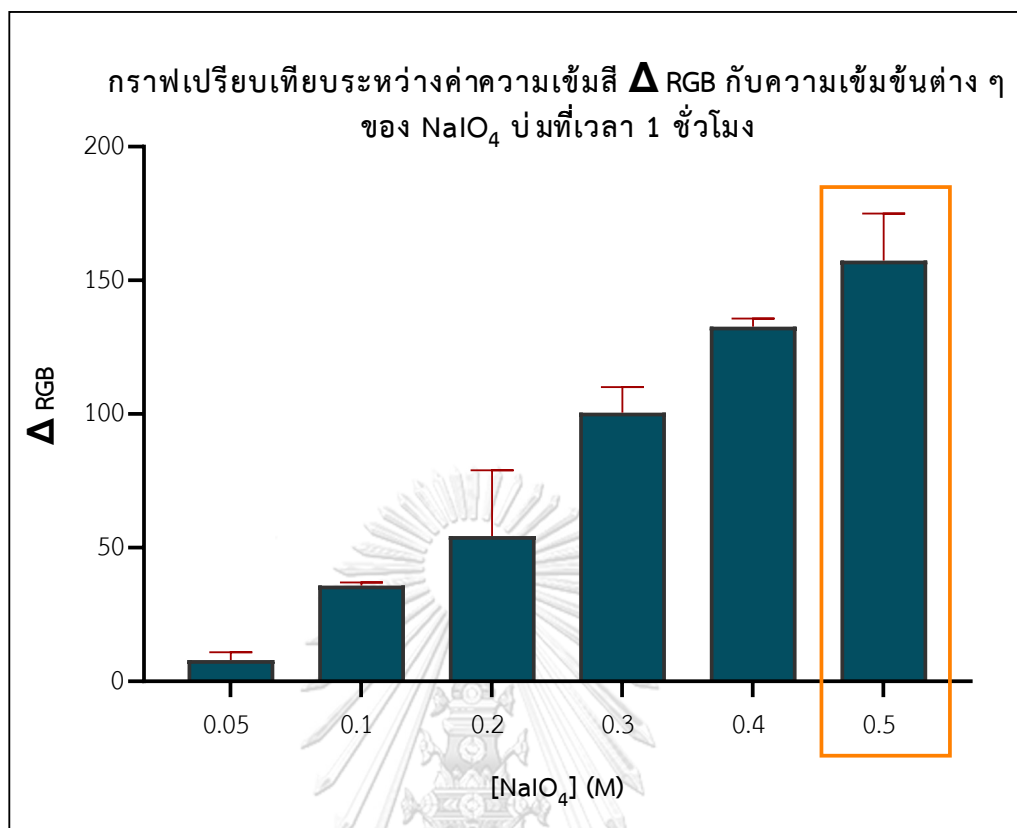
รูปที่ 20 แสดงสีและลักษณะของวงทดสอบที่ใช้ปริมาตรแตกต่างกัน

4.1.2 ผลการทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการออกซีไดซ์อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ

4.1.2.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท
 ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ สารละลาย โซเดียมเพอร์ริออเดทเพื่อ
 ออกซิไดซ์กระดาษ โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย เป็น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5
 โมลาร์ (ความเข้มข้นละ 3 หลุม) บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากออกซิไดซ์กระดาษแล้วทดสอบหมู่
 อัลดีไฮด์ด้วยน้ำยาเฟห์ลิง และทำหลุมควบคุม (หยดฟอสเฟตบัฟเฟอร์) จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อ
 เพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท สีของปฏิกิริยาหลังจากทดสอบด้วยน้ำยาเฟห์ลิง
 เกิดสีน้ำตาลเข้มมากขึ้น แสดงว่ามีหมู่อัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น และเมื่อนำไปวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม
 ImageJ คำนวณค่าความเข้มสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงินที่เปลี่ยนไป (Δ RGB) นำมาสร้างกราฟระหว่าง
 ความเข้มของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท กับค่าความเข้มสี ดังแสดงรูปที่ 22 จากกราฟจะเห็นว่า
 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าความเข้มสีเพิ่มมากขึ้น และจากกราฟจะเห็นว่าที่ความ
 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้ค่าความเข้มสีมากที่สุด ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท
 ที่เหมาะสมสำหรับออกซิไดซ์กระดาษเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นหมู่อัลดีไฮด์คือ 0.5 โมลาร์ จึงใช้เป็น
 ความเข้มข้นในการออกซิไดซ์กระดาษเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นหมู่อัลดีไฮด์ สำหรับการจับกับ
 แอนติบอดีในขั้นตอนต่อไป



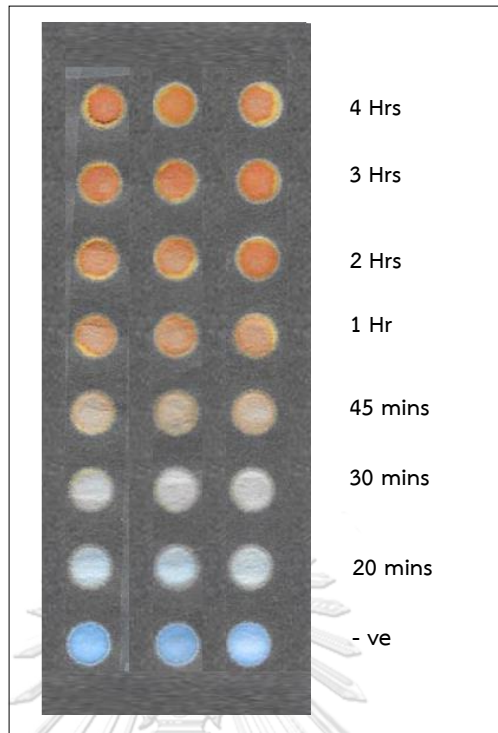
รูปที่ 21 แสดงผลการออกซิไดซ์กระดาษด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท
 ที่เวลา 1 ชั่วโมง



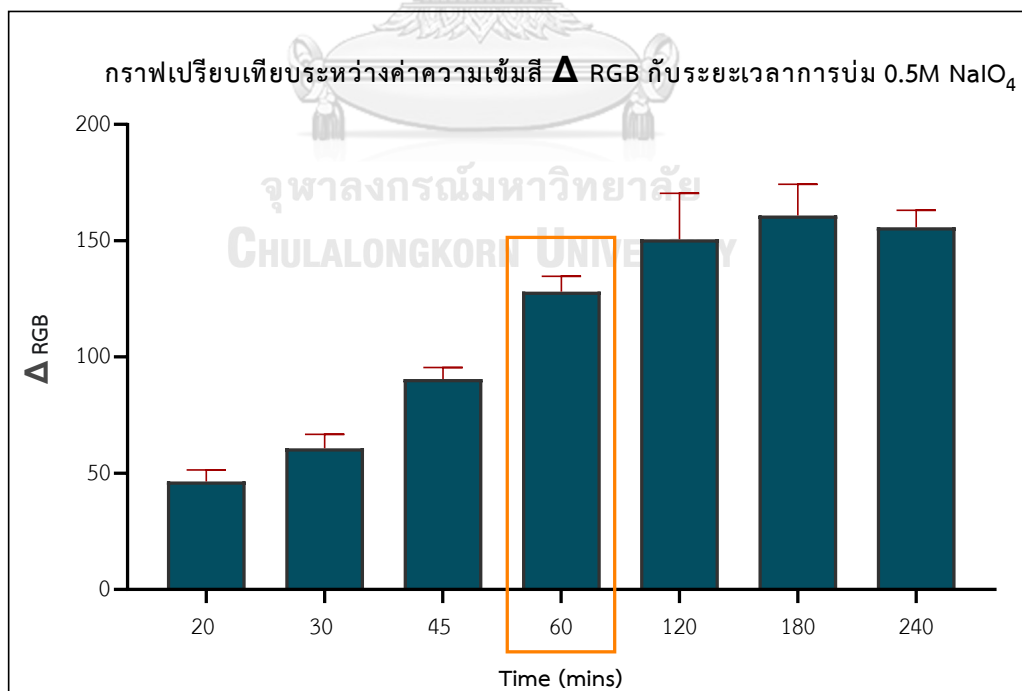
รูปที่ 22 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (ΔRGB) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท บ่มที่เวลา 1 ชั่วโมง แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.2.2 ผลการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท

ผลการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษ ด้วยสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยทดลองบ่มที่ระยะเวลา ตั้งแต่ 20 นาที ถึง 4 ชั่วโมง นำมาทดสอบการเกิดหมู่อัลดีไฮด์ด้วยน้ำยาเฟห์ลิง ได้ผลดังรูปที่ 23 พบว่าสีของปฏิกิริยาเข้มมากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม และเมื่อนำภาพของการทดสอบไปอ่านค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสีด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไป (ΔRGB) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มสีและระยะเวลาในการบ่ม ดังรูปที่ 24 จะเห็นว่าระยะเวลาในการบ่มแปรผันตรงกับค่าความเข้มสี และจากกราฟจะเห็นว่า ณ เวลา 2-3 ชั่วโมง ค่าความเข้มสีเริ่มคงที่ แต่เนื่องด้วยในระหว่างการทดสอบพบว่ากระดาษเริ่มแห้ง ที่เวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการบ่มสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท ที่ 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่กระดาษไม่แห้ง



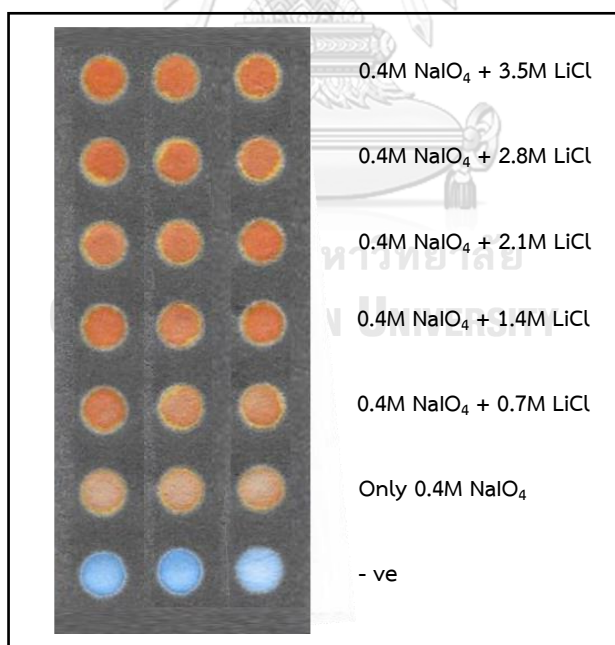
รูปที่ 23 แสดงผลการออกซิไดซ์กระดาษด้วย 0.5 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท เวลาต่างๆ



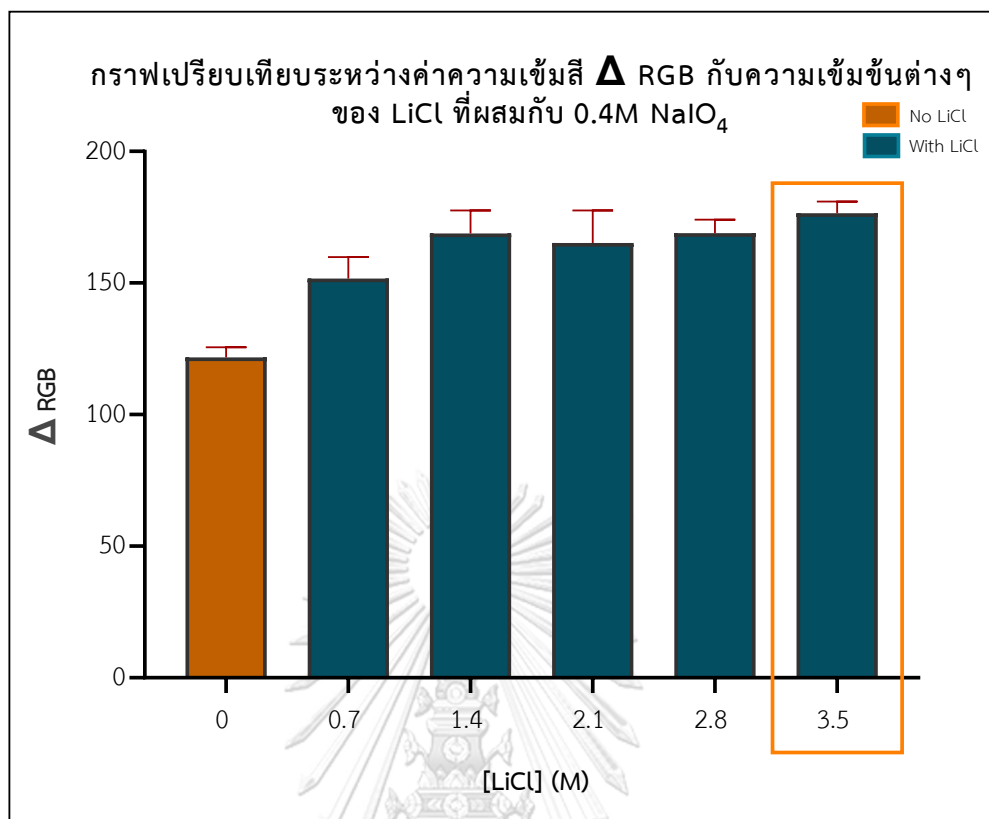
รูปที่ 24 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) กับเวลาต่าง ๆ เมื่อออกซิไดซ์กระดาษด้วย 0.5 โมลาร์ สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.2.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมในการออกซีไดซ์กระดาษ

ในการทดลองนี้ใช้สารละลายผสมระหว่าง 0.5 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์รืออเดท กับสารละลายลิเทียมคลอไรด์ เพื่อออกซีไดซ์กระดาษให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์ ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0, 0.7, 1.4, 2.1, 2.8 และ 3.5 โมลาร์ โดยนำสารละลายลิเทียมคลอไรด์แต่ละความเข้มข้นผสมกับสารละลายโซเดียมเพอร์รืออเดท 0.4 โมลาร์ บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบด้วยน้ำยาเพห์ลิง ได้ผลดังรูปที่ 25 และเมื่อนำภาพมาอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ สร้างเป็นกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไป ทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์แปรผันตรงกับค่าความเข้มของสีที่เปลี่ยนไป และให้ค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปมากที่สุดที่ความเข้มข้น 3.5 โมลาร์ ดังแสดงรูป 26 ดังนั้นสารละลายผสมระหว่างสารละลายลิเทียมคลอไรด์ เข้มข้น 3.5 โมลาร์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมเพอร์รืออเดท 0.4 โมลาร์ สามารถออกซีไดซ์กระดาษให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับหลุมทดสอบที่หยดเฉพาะสารละลายโซเดียมเพอร์รืออเดท และหลุมทดสอบที่ใช้สารละลายลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้นอื่น ๆ

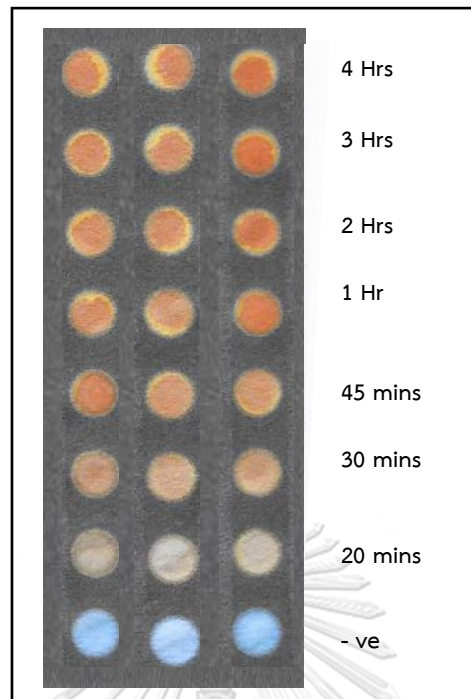


รูปที่ 25 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาษ ด้วยสารละลายผสม ที่เวลา 1 ชั่วโมง

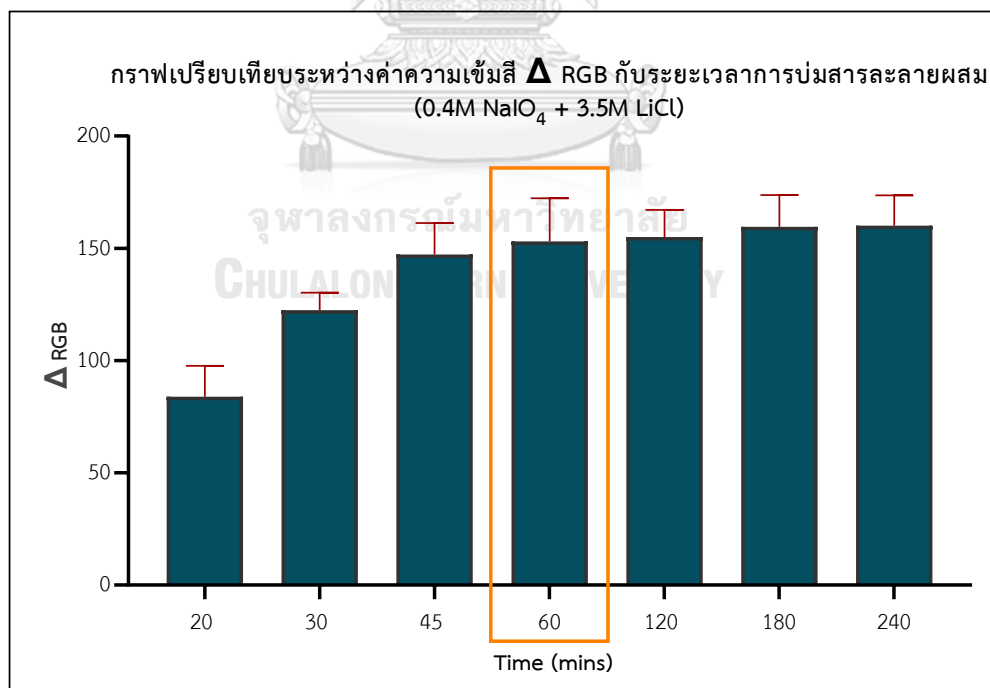


รูปที่ 26 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ที่ผสมอยู่กับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท เข้มข้น 0.4 โมลาร์ บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.2.4 ผลการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษด้วยสารละลายผสม การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการออกซิไดซ์กระดาษ ด้วยสารละลายผสม ระหว่างสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 3.5 โมลาร์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท เข้มข้น 0.4 โมลาร์ บ่มที่ระยะเวลา 20 นาที, 30 นาที, 45 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 หลุม นำกระดาษมาทดสอบการเกิดหม้ออัลดีไฮด์ด้วยน้ำยาเฟห์ลิง ได้ผล ดังแสดงรูปที่ 27 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มสีของปฏิกิริยาจะเข้มมากขึ้น เมื่อนำภาพของการทดสอบไปอ่านค่า ความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี ด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไป (Δ RGB) นำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาในการบ่ม และความเข้มสี ที่ ดังแสดงรูปที่ 28 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่ม ค่าความเข้มสีจะเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าเกิดการออกซิไดซ์กระดาษได้ดีขึ้น จากกราฟจะเห็นว่าที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมงค่าความเข้มสีเริ่มคงที่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกช่วงเวลา ดังกล่าวเป็นระยะเวลาในการบ่มสารละลายผสมเพื่อออกซิไดซ์กระดาษ เปลี่ยนโครงสร้างให้กระดาษ เกิดเป็นหม้ออัลดีไฮด์สำหรับการจับของแอนติบอดีในขั้นต่อไป



รูปที่ 27 แสดงผลการออกซีไดซ์กระดาษ ด้วยสารละลายผสม (0.4M NaIO₄ + 3.5M LiCl) ที่เวลา 20 นาที, 30 นาที, 45 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง

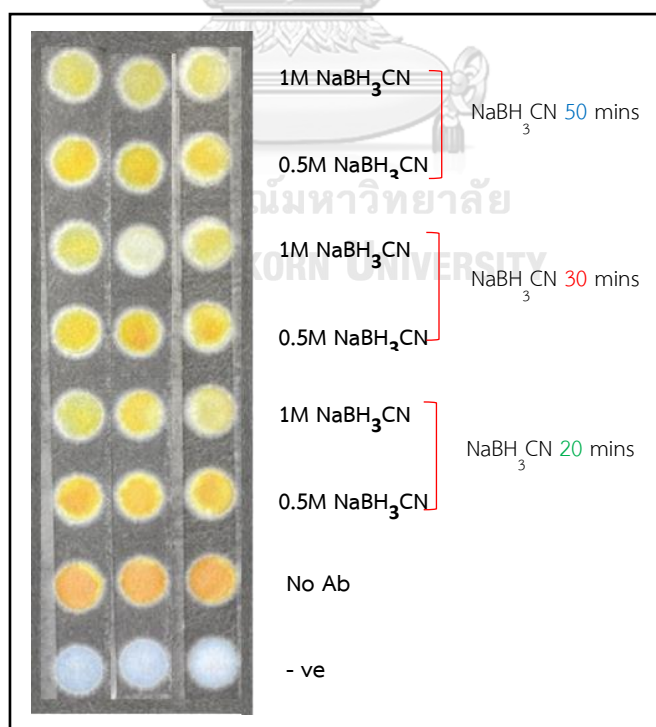


รูปที่ 28 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับระยะเวลาการบ่มด้วยสารละลายผสม (20 นาที, 30 นาที, 45 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง) (0.4M NaIO₄ + 3.5M LiCl) แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

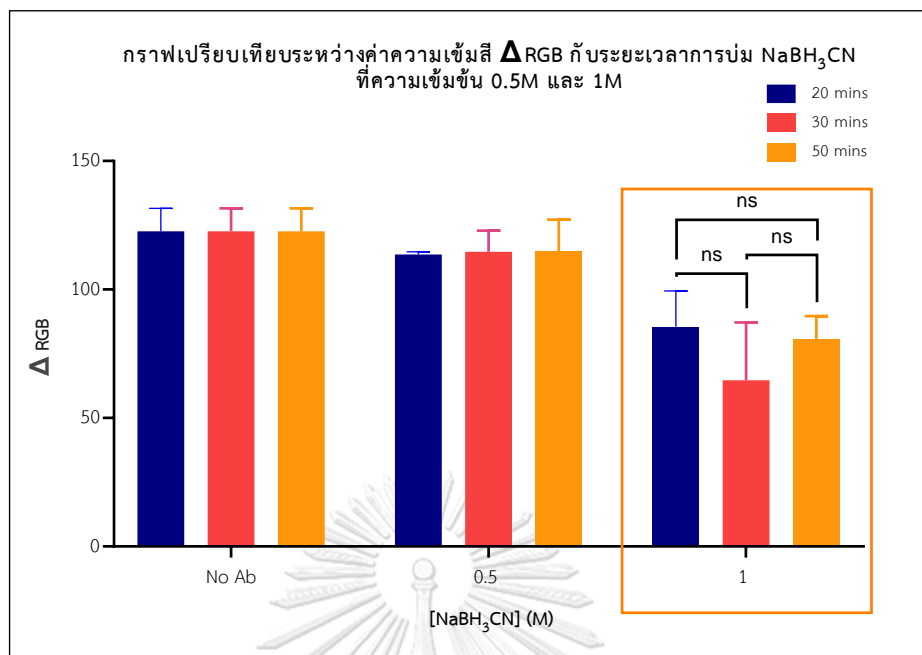
4.1.3 ผลการตรึงแอนติบอดี

4.1.3.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ในการช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ

เป็นการทดลองเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ เพื่อช่วยตรึงแอนติบอดีให้ติดบนกระดาษได้ดียิ่งขึ้น ทดสอบกับสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ เพียง 2 ความเข้มข้น คือ 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ บ่มที่เวลา 20 นาที 30 นาที และ 50 นาที ผลการทดลองพบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ช่วยตรึงแอนติบอดี ให้ผลการทดสอบด้วยน้ำยาเฟลิ่งที่ได้อ่อนกว่าการใช้ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ของทั้ง 3 ช่วงเวลาของการบ่ม ดังรูปที่ 37 และเมื่อนำผลของกระดาษมาหาค่าความเข้มสี ที่ได้จากการนำภาพไปวัดด้วยโปรแกรม ImageJ นำมาคำนวณหาค่า Δ RGB และนำมาสร้างกราฟดังรูปที่ 38 จะเห็นว่ากราฟทั้ง 3 เส้น (กราฟสีฟ้า สีเขียว และสีส้มแสดงเวลาการบ่มที่ 20 นาที 30 นาที และ 50 นาที ตามลำดับ) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ มีค่า Δ RGB ลดต่ำสุด แสดงได้ว่าการจับกันมากที่สุดระหว่างแอนติบอดีกับกระดาษ จึงทำให้หมู่อัลดีไฮด์ลดลงมากที่สุดจากกราฟจะเห็นว่าเส้นกราฟสีเขียว ที่แสดงถึงการบ่มที่เวลา 30 นาที มีค่า Δ RGB ลดต่ำสุด ดังนั้นจึงได้ว่าการใช้สารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นาน 30 นาที ช่วยตรึงแอนติบอดีที่กระดาษได้ดีที่สุด



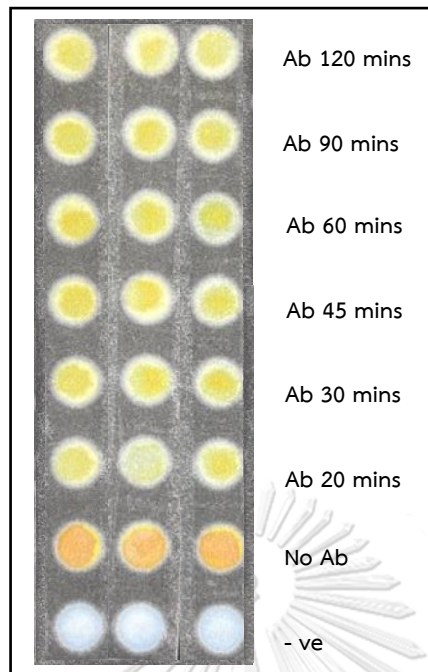
รูปที่ 29 แสดงผลการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ โดยใช้สารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ ที่ระยะเวลา 20 30 50 นาที ภายหลังจากการหยุดแอนติบอดี



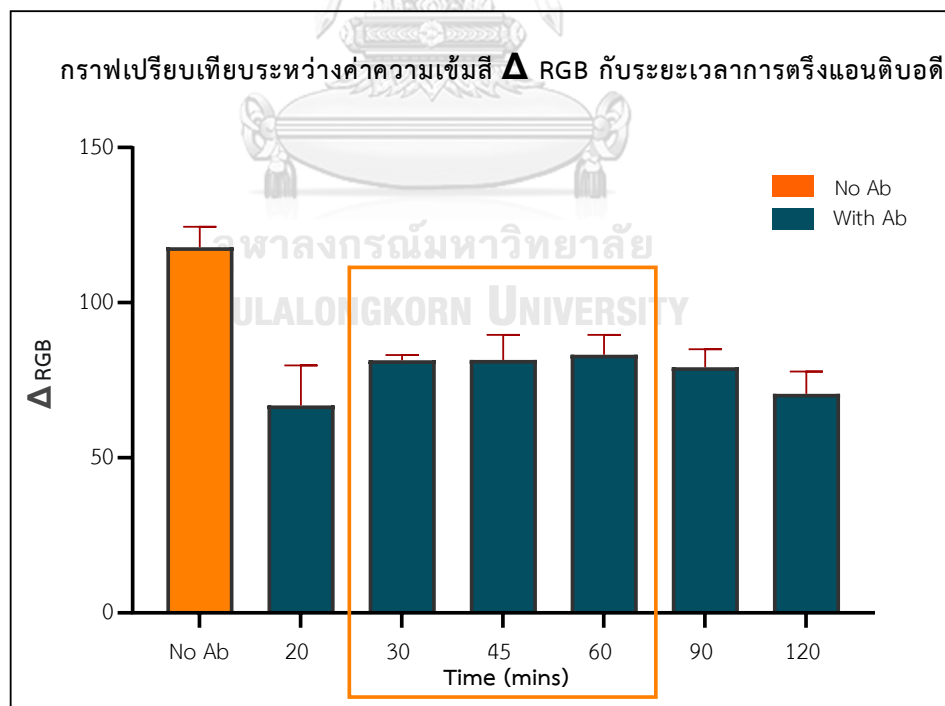
รูปที่ 30 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ระยะเวลา 20 30 50 นาที แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.3.2 ผลการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่ม 1° Ab (anti ox-LDL)

จากผลการทดสอบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ช่วยตรึงแอนติบอดีบนกระดาษให้ผลดีที่สุดคือ 1 โมลาร์ เวลา 30 นาที สำหรับการทดลองในครั้งนี้ต้องการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแอนติบอดี แปรผันระยะเวลาตรึงแอนติบอดีตั้งแต่ 20 ถึง 120 นาที เปรียบเทียบกับหลุมทดสอบที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ทดสอบหมู่อัลดีไฮด์ที่เหลือน้ำยาเฟลิ่งส์ ได้ผลดังรูปที่ 31 จะเห็นว่า ผลของหลุมที่ตรึงแอนติบอดีมีสีจางลง (หมู่อัลดีไฮด์ลดลง) ในทุกช่วงเวลากการทดสอบ เมื่อเทียบกับหลุมทดสอบที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี และเมื่อนำภาพมาวิเคราะห์หาค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณหาค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี (Δ RGB) และสร้างกราฟได้ดังรูป 32 จะเห็นได้ชัดว่า ค่า Δ RGB ของทุกช่วงเวลาทดสอบที่หยดแอนติบอดีมีค่าความเข้มสีลดลงเมื่อเทียบกับหลุมที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี และเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแอนติบอดี โดยเริ่มที่ 20 นาที ถึง 120 นาที จะเห็นว่าที่เวลา 20 นาที เส้นกราฟมีค่าความเข้มสีน้อยที่สุด แสดงถึงความเป็นหมู่อัลดีไฮด์เหลือน้อยที่สุด แต่ที่เวลา 30 นาที จะเห็นว่าเส้นกราฟเริ่มคงที่และคงที่จนถึงนาทีที่ 90 ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยเห็นว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงแอนติบอดีที่กระดาษ คือ 30 นาที โดยใช้สารละลายโซเดียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ช่วยตรึงแอนติบอดีที่กระดาษ นาน 30 นาที



รูปที่ 31 แสดงผลการบ่มแอนติบอดีบนกระดาษที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้สารละลายไซยาโนโบโรไฮไดรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์

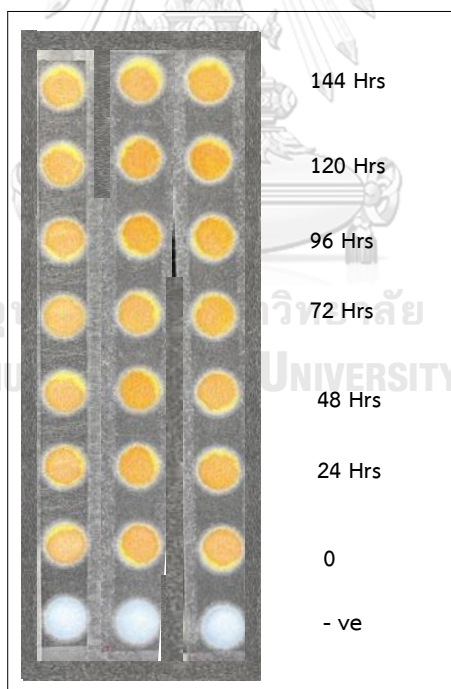


รูปที่ 32 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี Δ RGB กับระยะเวลาต่าง ๆ ของการบ่มแอนติบอดีโดยใช้สารละลาย NaBH_3CN ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

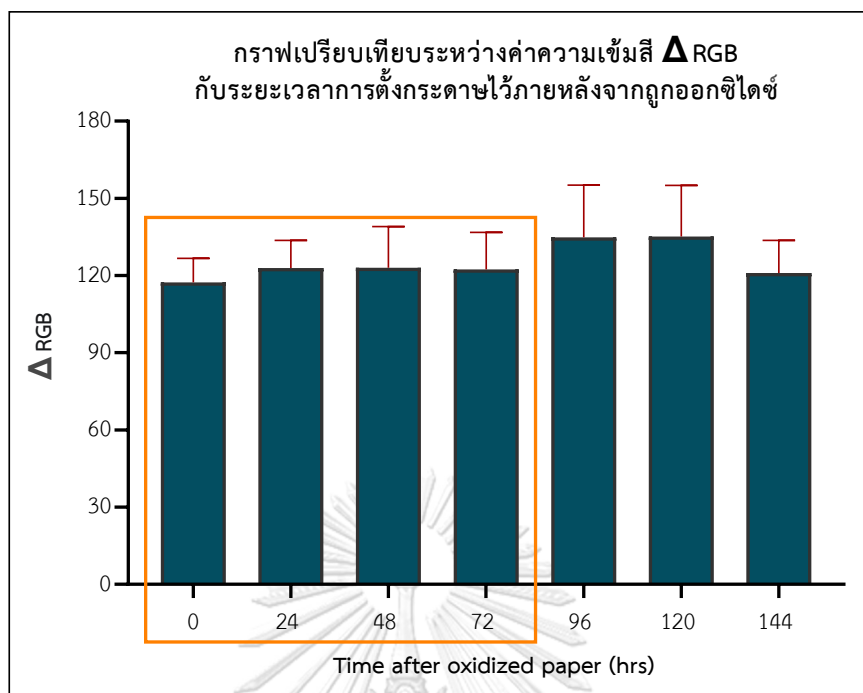
4.1.3.3 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของการกระดาษ

4.1.3.3.1 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษภายหลังจากออกซีไดซ์

ทำการทดสอบสภาวะคงตัวของหมู้อัลดีไฮด์บนกระดาษ ภายหลังจากถูกออกซีไดซ์แล้ว โดยวางกระดาษที่อุณหภูมิห้องระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 (เวลาที่ออกซีไดซ์เสร็จ), 24, 48, 72, 96, 120, 144 ชั่วโมง แล้วทดสอบหมู้อัลดีไฮด์จากกระดาษด้วยน้ำยาเฟลิ่งห์ ได้ผลดังรูปที่ 33 จะเห็นว่า สีของการทดสอบของทุกช่วงเวลาใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกออกด้วยตาเปล่า และเมื่อนำผลกระดาษไปวิเคราะห์วัดค่าความเข้มสีโดยโปรแกรม ImageJ นำมาคำนวณหา ค่า Δ RGB นำมาสร้างกราฟ ดังรูปที่ 34 พบว่ากระดาษมีระยะเวลาคงตัวของหมู้อัลดีไฮด์ตั้งแต่ 0 ถึง 72 ชั่วโมง (3 วัน) ซึ่งภายหลังจากนั้นค่าความเป็นหมู้อัลดีไฮด์มีค่าเพิ่มมากขึ้นและสูงสุดที่เวลา 144 ชั่วโมง โดยค่าที่เพิ่มขึ้นผู้วิจัยเห็นว่าอาจจะเกิดจากการที่กระดาษถูกออกซีไดซ์ด้วยอากาศ แสงแดด หรือสิ่งแวดล้อมอื่น เนื่องจากการเก็บรักษากระดาษนั้นผู้วิจัยไม่ได้เก็บไว้ในที่เย็น หรือในกล่องทึบแสง จึงได้ว่าระยะเวลาที่สามารถทิ้งกระดาษได้นานสุดหลังจากที่ออกซีไดซ์และสามารถคงสภาวะความเป็นหมู้อัลดีไฮด์ได้นานสุด เป็นระยะเวลา 3 วัน



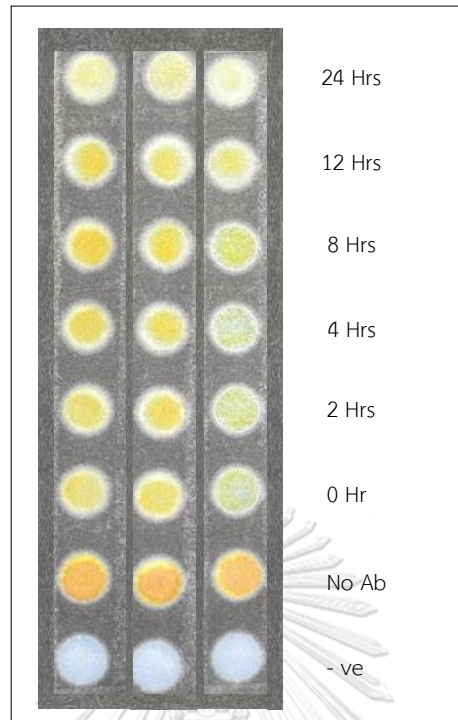
รูปที่ 33 แสดงผลการทดสอบสภาพความคงอยู่ของหมู้อัลดีไฮด์บนกระดาษ ภายหลังจากถูกออกซีไดซ์ เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ



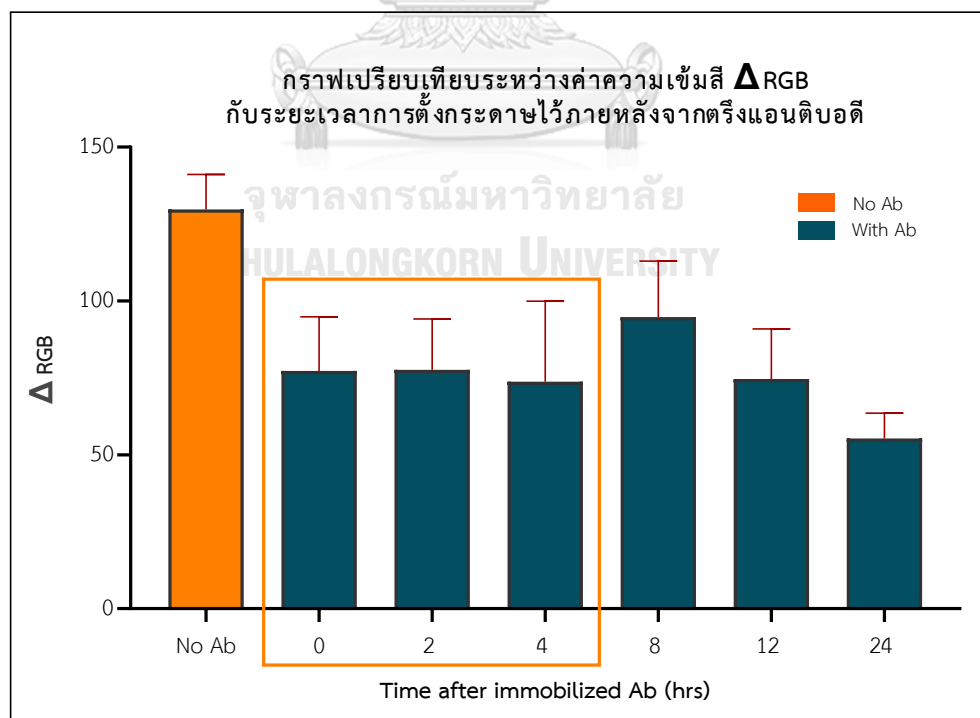
รูปที่ 34 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี ΔRGB กับระยะเวลาต่าง ๆ ที่ตั้งกระดาษไว้ ภายหลังจากถูกออกซิไดซ์แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.3.3.2 ผลการทดสอบสภาวะคงตัวของกระดาษ ภายหลังจากตรึงแอนติบอดี

จากผลการทดสอบสภาวะคงตัวของแอนติบอดีบนกระดาษ ภายหลังจากถูกตรึงแล้วทิ้งกระดาษไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 (เวลาที่ตรึงแอนติบอดีเสร็จ) 2, 4, 8, 12, 24 ผลของการทดสอบหมู้อัลติไฮโดรบนกระดาษ ดังรูปที่ 35 จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยาภายหลังจากทดสอบกับน้ำยาเฟห์ลิงมีสีจางลงใกล้เคียงกันในทุกช่วงเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม ที่ไม่ได้ตรึงแอนติบอดี และเมื่อนำผลกระดาษไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณหาค่า ΔRGB นำมาสร้างกราฟดังรูปที่ 36 ได้ว่าค่าคงตัวของแอนติบอดีที่บนกระดาษอยู่ตั้งแต่ช่วงเวลา 0-4 ชั่วโมง หลังจากตรึงแอนติบอดีเสร็จ เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากหลุมควบคุม (โพสเพตบัพเฟอร์) โดยหลุมที่ยังคงมีแอนติบอดีคงตัวอยู่จะมีค่า ΔRGB ต่ำกว่าค่าที่ได้จากหลุมควบคุม เนื่องจากหมู้อัลติไฮโดรที่ลดลงจากการจับของแอนติบอดี และจากกราฟจะเห็นว่าที่เวลาตั้งแต่ 8-24 ชั่วโมง ค่า ΔRGB เริ่มสูงขึ้นเล็กน้อยแล้วค่อย ๆ ต่ำลง จนต่ำสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจจะเกิดจากถูกออกซิไดซ์ที่อากาศหรือแอนติบอดีที่ถูกตรึงเริ่มมีความเสื่อมลง แต่ให้ความร้อนโร้กตามช่วงเวลาที่สามารถเก็บกระดาษไว้ได้ก่อนนำมาทดสอบต่อ ภายหลังจากการตรึงแอนติบอดี ควรจะอยู่ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการตรึงแอนติบอดีเสร็จ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ดีต่อไป



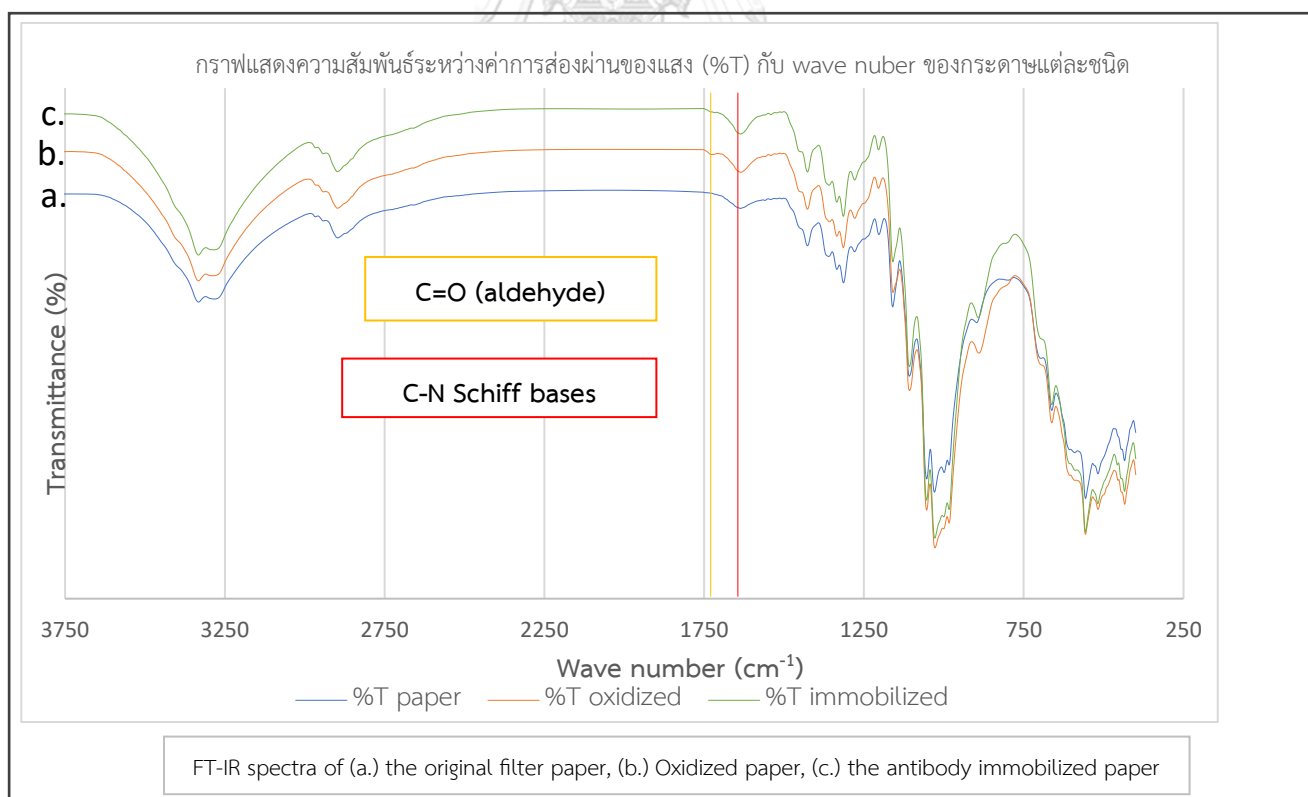
รูปที่ 35 แสดงผลการทดสอบหม้อลดีไฮด์บนกระดาษเพื่อตรวจสอบสภาพความคงอยู่ของแอนติบอดี
เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 36 แสดงกราฟเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสีที่เปลี่ยนไปทั้ง 3 ช่องสี ΔRGB กับระยะเวลา
ต่าง ๆ ที่ตั้งกระดาษไว้หลังจากถูกตรึงแอนติบอดีแสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.3.4 ผลการส่งทดสอบ FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer)

นำกระดาษที่ผ่านการออกซิไดซ์และตรึงด้วยแอนติบอดีไปทดสอบหาหมู่อัลดีไฮด์และพันธะ imine ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค FTIR แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การส่องผ่านของแสง (%T) ดังรูป 37 โดยเส้นกราฟ a: หลุมกระดาษเปล่า เส้นกราฟ b: หลุมกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ และเส้นกราฟ c: หลุมกระดาษที่ถูกตรึงแอนติบอดี จากกราฟจะเห็นว่าที่ wave number 1740-1720 ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งฟังก์ชันของหมู่อัลดีไฮด์ (C=O) เส้นกราฟ b มีพีคเกิดขึ้นมากกว่าเส้นกราฟ c และ a ตามลำดับ แสดงถึงการเกิดหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษจากการถูกออกซิไดซ์ และที่ตำแหน่งความยาวคลื่นเดียวกัน จะเห็นว่าเส้นกราฟ c มีพีคลดลงเมื่อเทียบกับเส้นกราฟ b ซึ่งกล่าวได้ว่าหมู่อัลดีไฮด์ลดลงจากการเกิดพันธะ imine และเมื่อพิจารณาที่ wave number 1690-1640 แสดงถึงตำแหน่งของพันธะ imine (C-N) จะเห็นว่าที่เส้นกราฟ c มีการดูดกลืนแสงมากกว่าจึงเกิดพีคขึ้นมากกว่าเส้นกราฟ b และ a ตามลำดับ กล่าวได้ว่าหลุมกระดาษดังกล่าวเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษจริง เกิดเป็นพันธะ imine อย่างไรก็ตามจากผลของการทดสอบ FTIR จะเห็นว่าพีคเกิดขึ้นไม่ชัดเจนในตำแหน่งที่สนใจทั้ง 2 ตำแหน่ง อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ทิ้งกระดาษไว้ก่อนทำการทดสอบ



รูปที่ 37 แสดงผลการทดสอบ FTIR assay

เมื่อ a. กระดาษเปล่า b. กระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ c. กระดาษที่ถูกตรึงแอนติบอดี

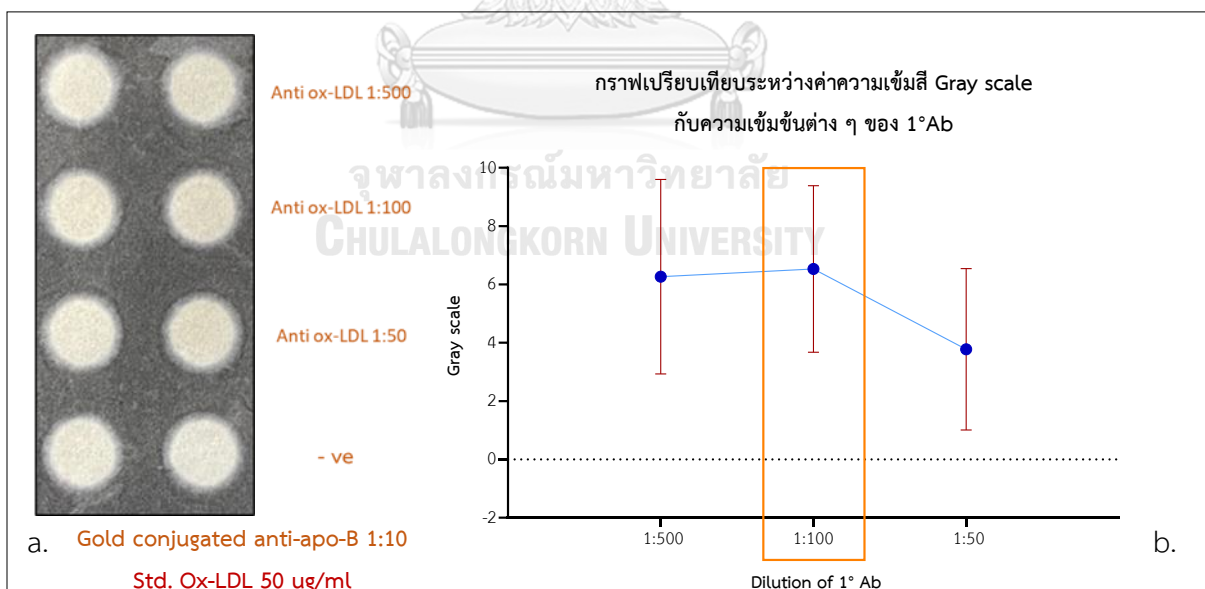
4.1.4 ผลการทดลอง Paper base immunoassay

เป็นผลของการทดสอบจากการใช้แอนติบอดี 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 คือ anti ox-LDL (Abcam) กับ gold conjugated anti apo B (Abcam) และชุดที่ 2 คือ anti HNE polyclonal (Bethyl) กับ gold conjugated anti apo B-100 (Santacruz)

4.3.4.1 ผลการทดสอบแอนติบอดีชุดที่ 1 ระหว่าง anti ox-LDL (Abcam) กับ gold conjugated anti Apo B (Abcam)

4.1.4.1.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab (anti ox-LDL)

เป็นการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab (anti ox-LDL) ที่จะใช้ตรึงบนกระดาษเจือจางแอนติบอดีเป็น 1:50 1:100 และ 1:500 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และใช้ 2° Ab (gold conjugated anti apo B Ab) เจือจาง 1:10 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้ผลการทดสอบดังรูป 38a. จะเห็นว่าสีหลุมของผลทดสอบที่ได้แต่ละความเข้มข้นของ 1° Ab มีสีที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อนำไปหาค่าความเข้มสีโดยโปรแกรม ImageJ ใช้โหมด gray scale ได้กราฟดังแสดง 38b. จะเห็นว่าที่หลุมทดสอบของ 1° Ab (anti ox-LDL) 1:100 ได้ค่าความเข้มสีสูงกว่าหลุมที่ใช้ความเข้มข้นอื่น จึงได้ว่าการทดลองนี้ที่ความเข้มข้น 1:100 ของ 1° Ab เหมาะแก่การทดลองต่อไป



รูปที่ 38 แสดงผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Aba. ผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ

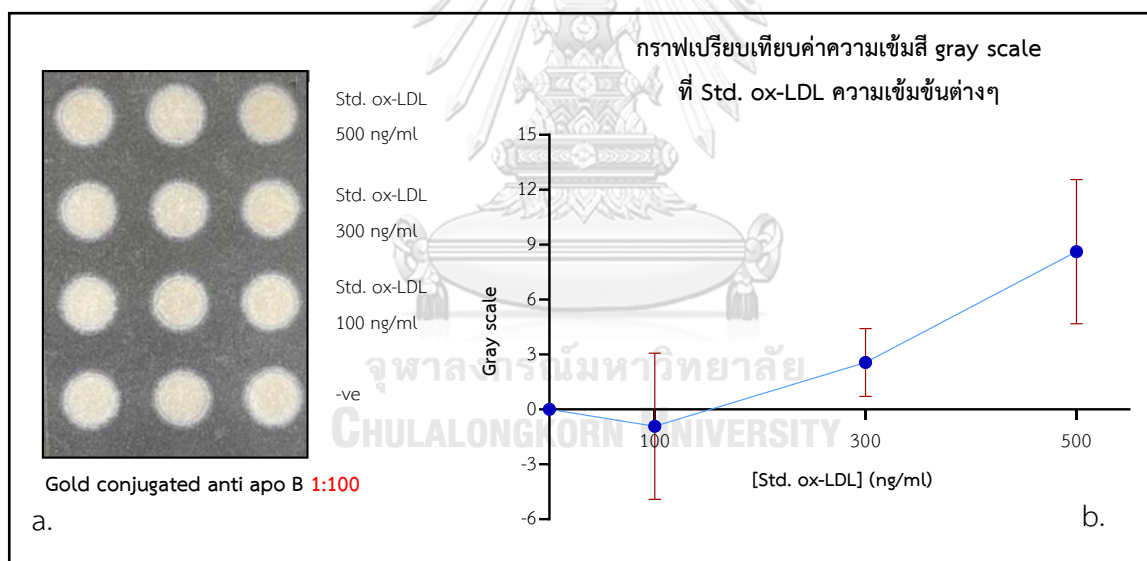
b. แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี gray scale กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 1° Ab

แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=2)

4.3.4.1.2 ผลการทดสอบกับ std. ox-LDL

ผลการทดสอบครั้งที่ 1:

การทดสอบนี้ใช้ช่วงอ้างอิงค่า ox-LDL ที่รายงานโดย Ali และคณะ ซึ่งรายงานระดับ ox-LDL ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2, โรคเมตาบอลิกซินโดรม, โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ร่วมกับโรคความดันโลหิต และจากคนปกติ ที่อยู่ในช่วง 104-221 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และใช้ 2° Ab (gold conjugated anti apo B Ab) ที่เจือจาง 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 39a. จะเห็นว่าสีหลุมทดสอบของแต่ละค่าความเข้มข้นของ std. ox-LDL มีสีจางมาก ไม่ได้มีสีที่แตกต่างกันให้ความร้อนชัดเจน ทั้งที่เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม และในแต่ละความเข้มข้นของหลุมทดสอบ และเมื่อนำไปหาค่าความเข้มสี (gray scale) โดยโปรแกรม ImageJ ได้ดังกราฟ 39b. จะเห็นว่าที่หลุมทดสอบ std. ox-LDL ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่าความเข้มสี ต่ำกว่าหลุมควบคุม การทดลองนี้จึงเห็นผลการทดสอบ แม้ว่าค่า std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าจะได้ค่ามากกว่าก็ตาม จึงต้องทำการทดลองต่อไป

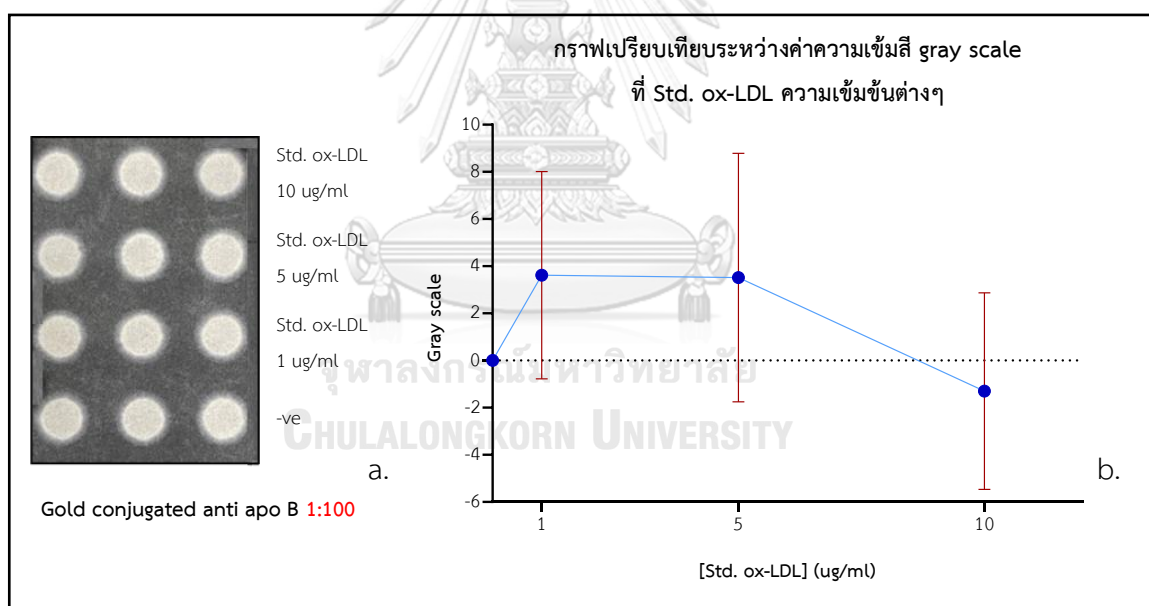


รูปที่ 39 แสดงผลการทดสอบครั้งที่ 1 กับ std. ox-LDL

- a. ผลการทดลองบนกระดาด b. แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี (Gray scale) ที่ std. ox-LDL ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD (n=3)

ผลการทดสอบครั้งที่ 2:

ผลการทดสอบครั้งที่ 2 นี้อ้างอิงค่า ox-LDL ที่รายงานโดย Holvoet และคณะ ซึ่งรายงานระดับ ox-LDL ที่ได้จากกลุ่มคนปกติ และคนที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ มีค่า ox-LDL อยู่ในช่วง 4-45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การทดลองนี้ทดสอบกับ std. ox-LDL ใช้ช่วงค่าความเข้มข้นระหว่าง 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบกับ 2° Ab (gold conjugated anti Apo B Ab) ที่เจือจาง 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ได้ผลการทดสอบดังรูป 40a. พบว่าสีของการทดสอบในแต่ละความเข้มข้น std. ox-LDL รวมไปถึงหลุม ควบคุม สีของปฏิกิริยาจางมาก ไม่มีความแตกต่างของแต่ละความเข้มข้น และเมื่อนำภาพการทดสอบไปหาค่าความเข้มสี (gray scale) โดยโปรแกรม ImageJ นำมาสร้างกราฟดังรูป 40b. เนื่องจากว่าหลุมที่ทดสอบมีสีของปฏิกิริยาไม่แตกต่างกับหลุม ควบคุม กราฟที่ได้จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของ std. ox-LDL 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่าความเข้มสี ต่ำกว่าค่าที่ได้จากหลุม ควบคุม จึงได้ว่าการทดลองนี้เชื่อถือยังไม่ได้ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นหรือสัดส่วนของแอนติบอดียังไม่เหมาะสม



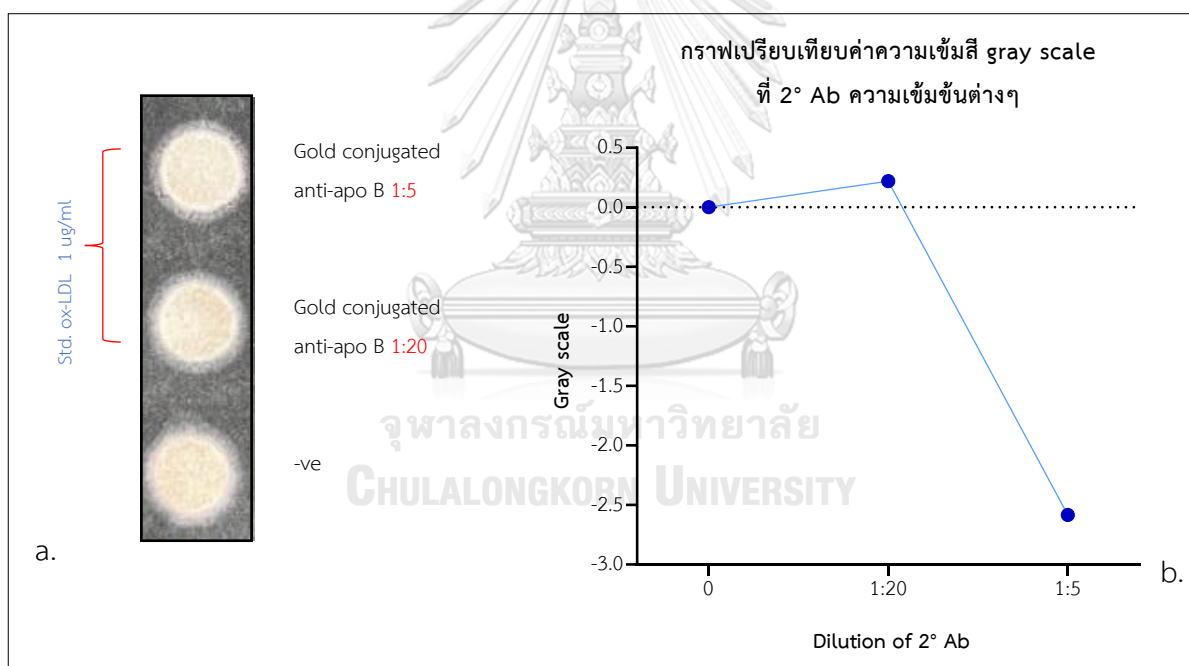
รูปที่ 40 แสดงผลการทดสอบที่ 2 กับ std. ox-LDL

- a. ผลการทดลองบนกระดาศ b. แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี (Gray scale) ที่ std. LDL ox-LDL ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.1.4.1.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab (gold conjugated anti apo B) มี 2 การทดลอง

ผลการทดลองครั้งที่ 1:

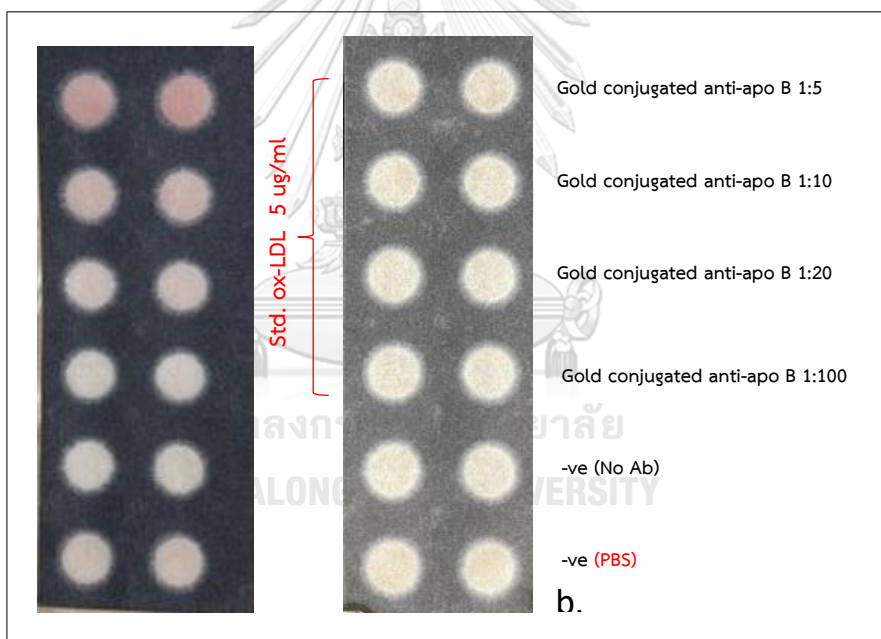
จากผลการทดสอบเจือจาง 2° Ab ที่ความเข้มข้น 1: 5 และ 1:20 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทดสอบกับ std. ox-LDL ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังรูป 41a. ได้ว่าสีของปฏิกิริยาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ 2° Ab จาก 1:100 ไปเป็น 1: 5 และ 1:20 นั้นทั้ง 2 ความเข้มข้นมีสีของปฏิกิริยาจาง และไม่ได้มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับหลุม ควบคุม ที่หยดเพียงฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเมื่อนำภาพการทดสอบไปหาค่าความเข้มสี (gray scale) โดยโปรแกรม ImageJ นำมาสร้างกราฟ ดังรูป 41b. กราฟที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากหลุมทดสอบมีค่าความเข้มสีน้อยกว่าหลุมควบคุม ผลการทดสอบนี้ผู้วิจัยคาดว่าอาจเกิดจากการที่ใช้ความเข้มข้นของ std. ox-LDL น้อยเกินไป



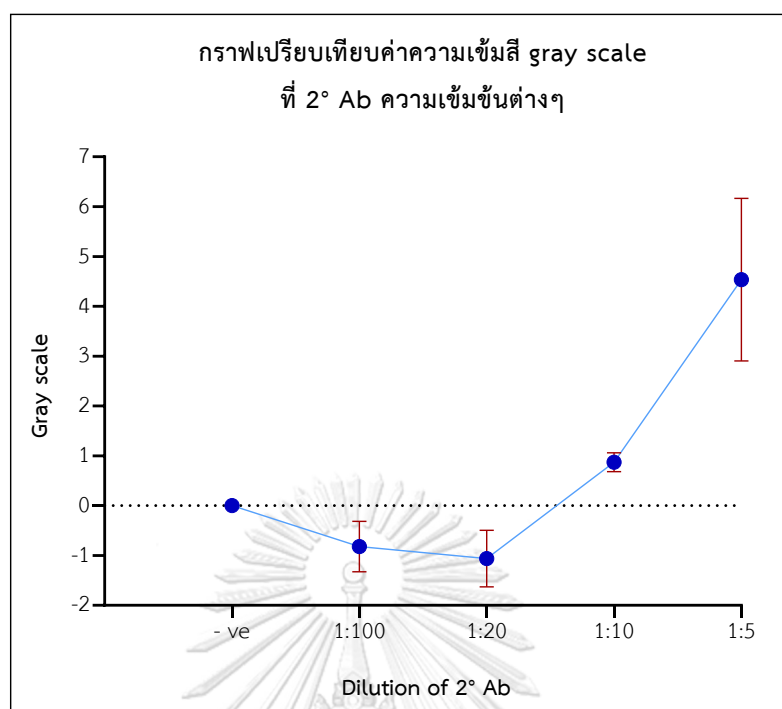
รูปที่ 41 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 1a. ผลการทดลองบนกระดาด b. กราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี (Gray scale) กับความเข้มข้นของ 2° Ab

ผลการทดลองครั้งที่ 2:

การทดลองครั้งที่ 2 ได้เพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ได้เพิ่มความเข้มข้นของ 2° Ab เป็น 4 ความเข้มข้น เพื่อนำมาเปรียบเทียบกัน ได้แก่ 1:5, 1:10, 1:20, 1:100 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนั้น จากภาพ 42a. แสดงถึงสีของ 2° Ab ในแต่ละหลุมการทดสอบ บ่มเป็นเวลา 30 นาที จะเห็นว่าสีของ gold มีสีชมพูชัดเจนที่เจือจางต่ำสุด และเมื่อพิจารณาจากภาพ 42b. เป็นภาพที่ได้จากหลังเสร็จสิ้นการวิเคราะห์หรือหลังจากหยุด silver enhancement เพื่อให้ทำให้เกิดสี จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยาจางมากเช่นเคยแม้จะเพิ่มทั้งความเข้มข้นของทั้ง std. ox-LDL และ 2° Ab เมื่อนำภาพการทดสอบไปหาค่าความเข้มสี (gray scale) โดยโปรแกรม ImageJ แล้วนำมาสร้างกราฟ ดังรูป 43 จะเห็นว่าความเข้มสีของหลุมทดสอบในบางหลุมมีค่าต่ำกว่าค่าของหลุม ควบคุม ซึ่งจากผลดังกล่าวผู้วิจัยพิจารณาว่าอาจเกิดจากการที่ความเข้มข้นของ gold ใน 2° Ab เจือจางมากเกินไป จึงไม่เกิดสีของปฏิกิริยา



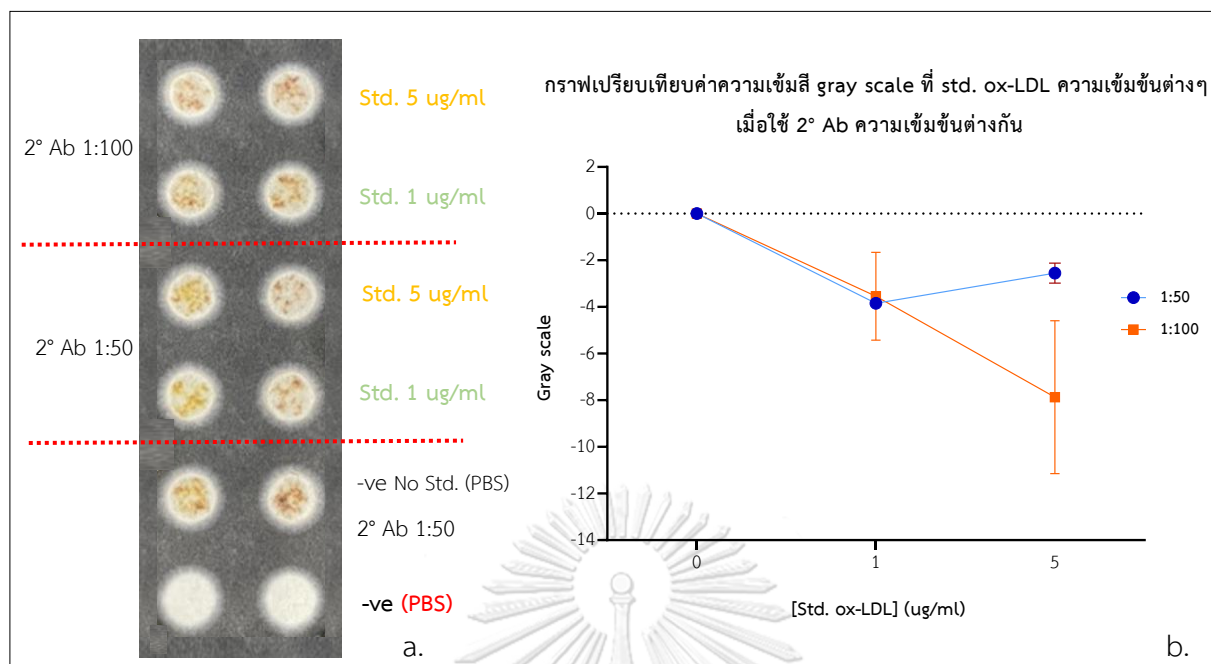
รูปที่ 42 แสดงผลบนกระดาษเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ทดสอบครั้งที่ 2



รูปที่ 43 แสดงผลกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 2 (Gray scale) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2° Ab แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

ผลการทดลองครั้งที่ 3

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองซ้ำจาก การทดลองครั้งที่ 1 และ 2 โดยเจือจาง 2° Ab เป็น 1:50 และ 1:100 และเพิ่มช่วงความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 2 ช่วง คือ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ล้างจำนวน 3 ครั้งหลังจากหยุดครบเวลาของ 2° Ab นั้น จากรูป 44a. จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยาเกิดขึ้นทุกหลุมการทดสอบ รวมไปถึงหลุมควบคุมที่หยุดเฉพาะฟอสเฟตบัฟเฟอร์และมีสีเข้มกว่าหลุมทดสอบ เมื่อลองนำผลไปหาค่าความเข้มสี โดยโปรแกรม ImageJ ใช้โหมด gray scale ในการคำนวณแล้วนำค่ามาสร้างกราฟได้ดังรูป 44b. จะเห็นว่าที่หลุมควบคุม มีค่าความเข้มสีมากกว่าหลุมทดสอบ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลปฏิกิริยาบนกระดาษที่สังเกตเห็นว่าหลุม ควบคุม มีสีเข้มกว่า ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ผลที่ได้ไม่สามารถเชื่อถือได้ ซึ่งทางผู้วิจัยคาดว่าผลที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากกระดาษแห้งระหว่างบ่มทั้ง std. ox-LDL และ 2° Ab (บ่มที่ 30 นาที) สีที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดเป็นตะกอนจึงเกิดเป็นสีพื้นหลังของปฏิกิริยา จึงต้องมีการทดลองและแก้ไขต่อไป



รูปที่ 44 แสดงผลของการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 2° Ab ครั้งที่ 3
 a. ผลของปฏิกิริยาบนกระดาด b. กราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี (Gray scale) ของปฏิกิริยา
 เมื่อเจือจาง 2° Ab ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=2)

4.1.4.2 ผลการทดสอบกับแอนติบอดีชุดที่ 2 ระหว่าง 1° Ab: anti HNE (goat/polyclonal/Bethyl Laboratory) กับ 2° Ab: anti apo B-100 (mouse/monoclonal/Santacruz)

4.3.4.2.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab

ทดสอบกับ std. ox-LDL และทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบว่าสามารถใช้ทดแทน std. ox-LDL ในการทดสอบต่อไปได้หรือไม่ มีทั้งหมด 3 การทดลอง รายละเอียดตามตารางที่ 6

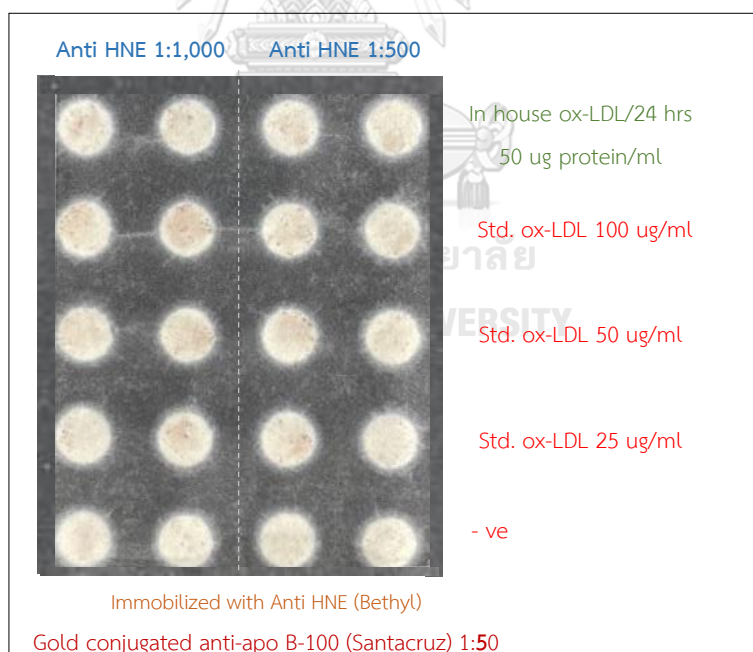
ผลการทดสอบที่ 1:

การทดลองนี้ได้เปลี่ยนแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด คือ 1° Ab และ 2° Ab ชุดใหม่เป็น anti HNE และ anti apo-B 100 ตามลำดับ เพื่อหวังให้เห็นผลของปฏิกิริยา และเมื่อนำมาทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้น ตั้งแต่ 25-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบความเข้มข้นของการตรึง 1° Ab คือ anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500

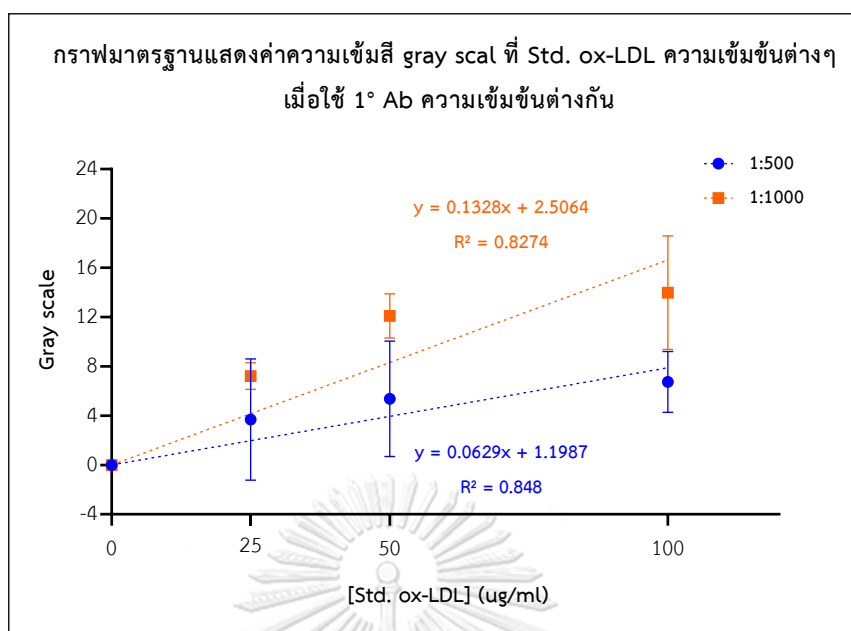
กับ 1:1,000 ไปด้วย (ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ Bethyl Laboratory แนะนำ คือ 1:1,000 – 1:30,000) ได้ผลของสีกระดาษดังรูป 45 จะเห็นว่ากระดาษเริ่มมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นในทุกหลุมทดสอบเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ox-LDL แต่ยังไม่สามารถแยกออกได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อนำกระดาษไปอ่านค่าความเข้มสีแล้วสร้างกราฟมาตรฐาน รูป 46 จะเห็นว่ากราฟทั้ง 2 เส้นเป็นลักษณะเส้นตรง ค่าความเข้มสีแปรผันตรงกับความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้น พิจารณาเส้นกราฟสีส้ม (ตรึง anti HNE 1:1,000) ให้ค่าความเข้มสีมากกว่าเส้นกราฟสีฟ้า (ตรึง anti HNE 1:500) และเมื่อนำผลของความเข้มสีของ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร

- เส้นกราฟสีส้ม (HNE 1:1,000) ได้ความเข้มข้น In house ox-LDL 24.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- เส้นกราฟสีฟ้า (HNE 1:500) ได้ความเข้มข้น In house ox-LDL 24.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แม้จะได้ผล standard curve เป็นกราฟเส้นตรงทั้ง 2 ความเข้มข้นของ anti HNE ก็ตาม อาจจะเป็นผลที่เกิดจากในขณะทดลองกระดาษเริ่มต้น การหยดล้างเป็นไปให้ความร้อนซ้ำ ๆ อาจทำให้อนุภาคไม่หลุดรอดผ่านช่องว่างของรูกระดาษ จึงทำให้เกิดสีน้ำตาลของปฏิกิริยาเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามจะต้องมีการทดสอบซ้ำต่อไป



รูปที่ 45 แสดงผลปฏิกิริยาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 1 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 และ 1:1000 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



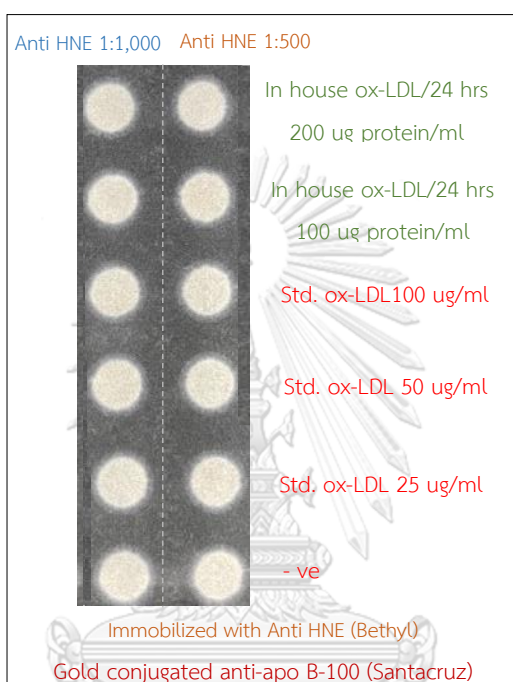
รูปที่ 46 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 1 เมื่อตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 (เส้นสีส้ม) และ 1:1000 (เส้นสีน้ำเงิน) ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

ผลการทดสอบที่ 2:

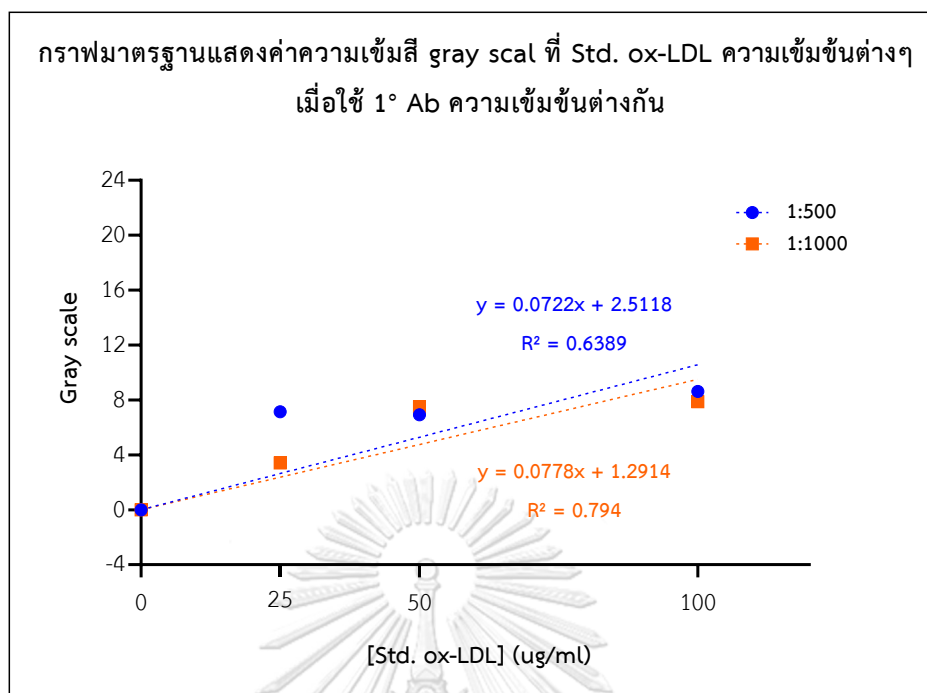
จากผลของการทดสอบครั้งที่ 1 ผลออกมาค่อนข้างจะชัดเจน ที่ความเข้มข้นของ std. ox-LDL แปรผันตรงกับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนกระดาษ แต่เนื่องด้วยในระหว่างทดสอบ พบว่ากระดาษมีลักษณะตัน ดังนั้นการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบซ้ำ โดยใช้ความเข้มข้นเดิมของทั้ง std. ox-LDL (25 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และความเข้มข้นของ 1°Ab โดยตรง anti-HNE เจือจางที่ 1:500 และ 1:1,000 แต่ได้เพิ่มความเข้มข้นของ 2°Ab เป็น 1:20 (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เพื่อหวังว่าสีของปฏิกิริยาจะชัดเจนขึ้น และจากผลของกระดาษตันก่อนหน้าอาจเกิดจากการที่ละลาย skim milk ได้ไม่ดี ครั้งนี้จึงเตรียม skim milk ใหม่ให้ได้ละลายดี ผลของปฏิกิริยาที่ได้บนกระดาษดังรูป 47 จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยาไม่มีความแตกต่างกันเหมือนการทดลองครั้งที่ 1 และเมื่อนำค่าความเข้มสีโหมด gray scale ไปสร้าง standard curve ดังรูป 48 จะเห็นว่าค่าความเข้มสีของทั้ง 2 ความเข้มข้นของ 1°Ab แตกต่างไม่ชัดเจน และเมื่อนำสมการของกราฟเส้นตรงไปคำนวณหาความเข้มข้นของ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร

- เส้นกราฟสีส้ม (HNE 1:1,000) ได้ความเข้มข้น unknown 65.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

- เส้นกราฟสี่เหลี่ยม (HNE 1:500) ได้ความเข้มข้น unknown 123 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 จากผลที่ได้จากกราฟทั้ง 2 เส้น จะเห็นว่าค่าความเข้มข้นของ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการได้ไม่ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเกิดจากผลของกราฟ standard curve ไม่เป็นเส้นตรงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น ความเข้มสีควรที่จะเพิ่มตาม จากสาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากความเข้มข้นของแอนติบอดียังไม่ได้สัดส่วนที่พอเหมาะ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบครั้งต่อไป



รูปที่ 47 แสดงผลปฏิบัติการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 2 เมื่อตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 และ 1:1000 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

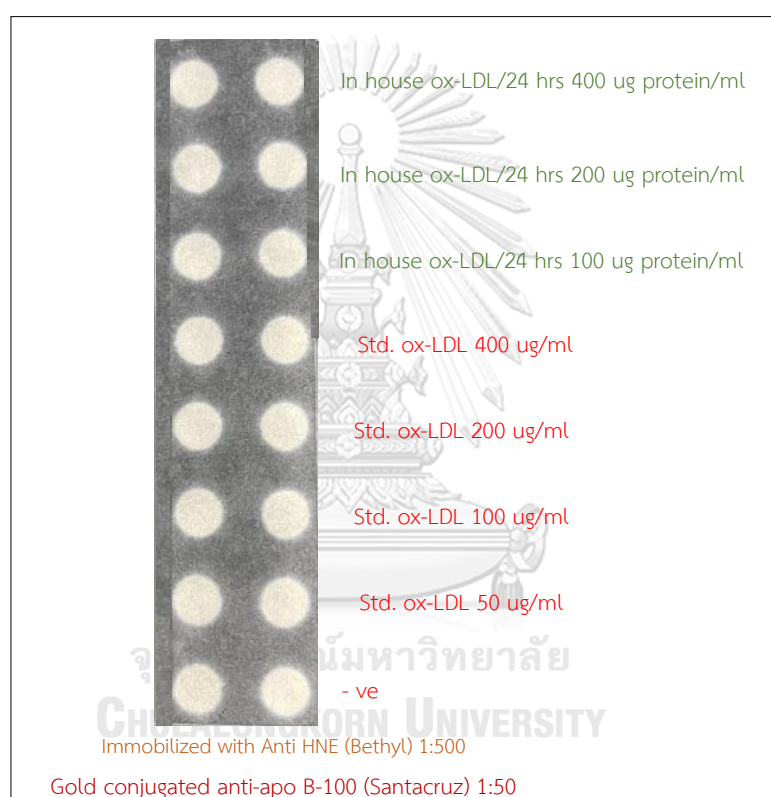


รูปที่ 48 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 2 จากการทดสอบตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 (เส้นสีส้ม) และ 1:1000 (เส้นสีน้ำเงิน) ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD

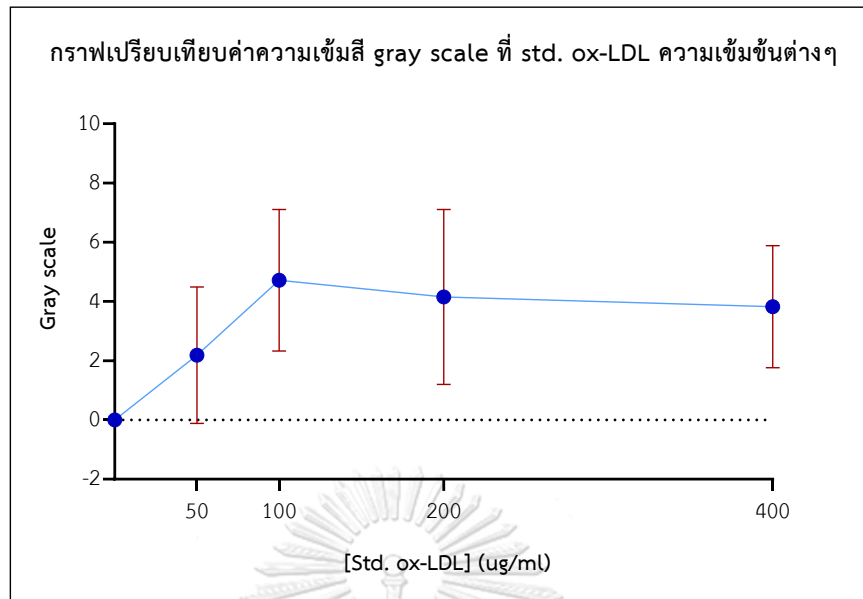
ผลการทดสอบที่ 3:

สำหรับการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบซ้ำ โดยได้เพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เพิ่ม 2 ความเข้มข้นสุดท้ายจากการทดลองที่ 1 และ 2) และ anti-HNE เลือกตรงที่ความเข้มข้น 1:500 สำหรับความเข้มข้นของ 2° Ab gold conjugated anti apo B-100 เป็น 1:50 (0.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และได้ลองนำ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบโดยเลือกนำมาทดสอบ 3 ความเข้มข้น ที่ 100 200 และ 400 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ได้ผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ ดังรูป 49 ซึ่งอาจจะมองไม่เห็นความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่า แต่เมื่อนำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบความเข้มสี (gray scale) ดังรูปที่ 50 เส้นกราฟมีค่าความเข้มสีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL และเริ่มเห็นสีลดลงเมื่อความเข้มข้นของ std. ox-LDL เพิ่มขึ้นเป็น 200 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่าการทดสอบนี้อาจจะมี limit ของการทดสอบอยู่ที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ความร้อนไว้ก็ตามจะต้องมีการทดสอบซ้ำต่อไป และเมื่อตัดค่าความเข้มสีของ std. ox-LDL ที่มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (2 ความเข้มข้น) นำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงรูป 51 จะเห็นว่า

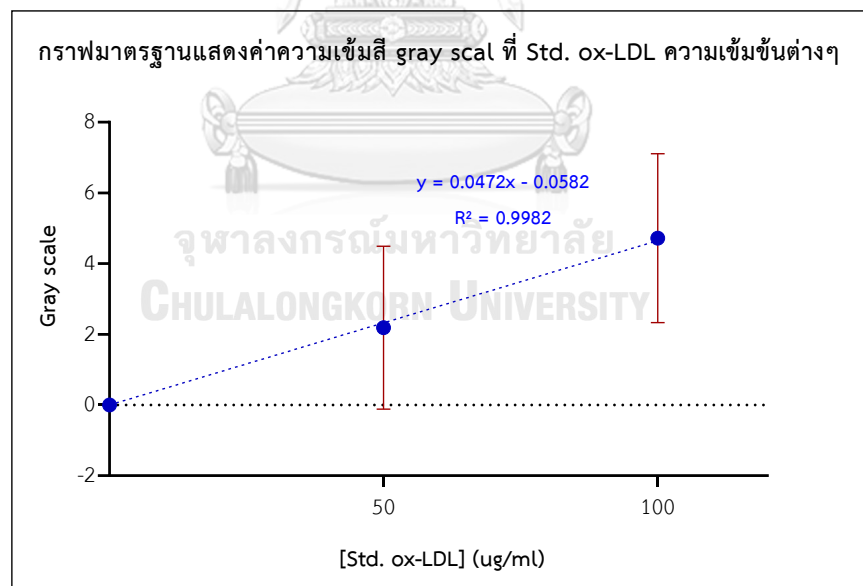
เส้นกราฟเป็นเส้นตรง และเมื่อนำเอาค่าความเข้มข้นของ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการในที่นี้ ทดสอบ 3 ความเข้มข้นแต่นำมาคำนวณเพียง 1 ความเข้มข้น (100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร) เนื่องจากได้ตัดค่าจาก std. ox-LDL ออก 2 ความเข้มข้น ได้ความเข้มข้นของ ox-LDL ที่เตรียมเอง ดังกล่าวเป็น 70.16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หาค่าความเข้มข้นตามสมการกราฟเส้นตรงของกราฟ มาตรฐาน) สำหรับการทดสอบนี้ทำให้ได้ข้อสันนิษฐานเพิ่มเติม คือ การตรวจวัดบนฐานกระดาษเพื่อ วิเคราะห์หาปริมาณ ox-LDL อาจมี limit ของการทดสอบอยู่ที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ จะต้องมีการทดสอบซ้ำอีกต่อไป



รูปที่ 49 แสดงผลปฏิกิริยาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบที่ 3 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 50 แสดงกราฟหาความเข้มสีที่เหมาะสมของ 1° Ab บนกระดาษ การทดสอบครั้งที่ 3 เปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มสี (gray scale) กับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

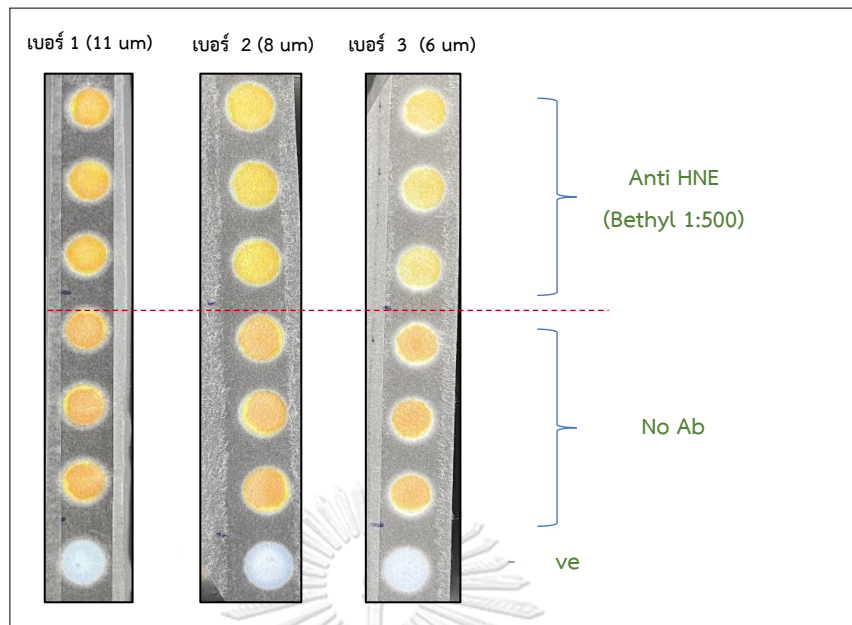


รูปที่ 51 แสดงกราฟมาตรฐานหาความเข้มสีที่เหมาะสมของ 1° Ab การทดสอบครั้งที่ 3 เมื่อตรง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

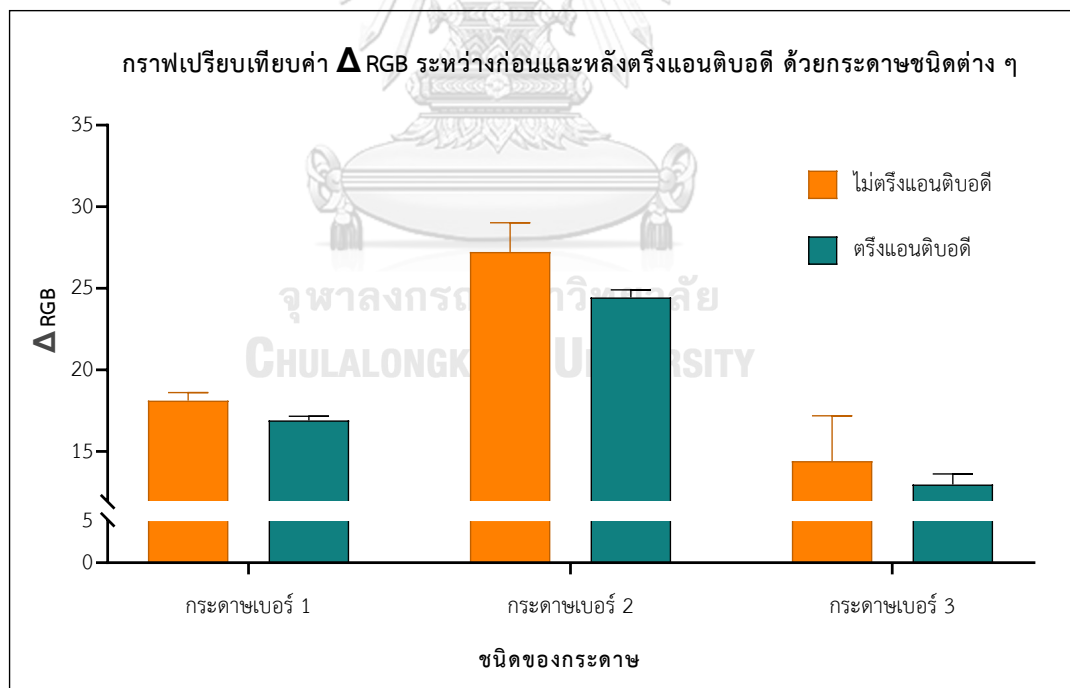
4.1.4.2.2 ผลการทดสอบเปรียบเทียบกระดาษกรองแต่ละชนิด

4.1.4.2.2.1 ผลการเปรียบเทียบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษกรองแต่ละชนิด

จากผลการทดสอบ ข้อ 4.1.4.2.1 ที่ได้ทดลองกับแอนติบอดีชนิดใหม่ (1° Ab: anti HNE/Bethyl และ 2° Ab: gold conjugated apo B-100 Santacruz) ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผู้วิจัยสังเกตเห็นว่ากระดาษกรองที่ใช้ทดสอบต้นแล้วเห็นสีของปฏิกิริยาชัดเจนขึ้น ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำเอากระดาษกรอง Whatman แต่ละเบอร์มาพิมพ์ แวกซ์ แล้วนำมาทดสอบเปรียบเทียบกัน เนื่องจากกระดาษกรองแต่ละชนิดมีขนาดของช่องว่างบนกระดาษ (pore size) แตกต่างกันในชั้นแรกผู้วิจัยได้ทดสอบตรึง 1° Ab ด้วย anti HNE ความเข้มข้น 1:500 บนกระดาษกรองแต่ละชนิดก่อน เพื่อทดสอบความคงอยู่ของแอนติบอดีบนกระดาษชนิดต่าง ๆ โดยทดสอบหมู้อัลติไฮด์ด้วยน้ำยาเพห์ลิง ซึ่งเมื่อเกิดการจับของแอนติบอดีบนกระดาษ ความคงอยู่ของหมู้อัลติไฮด์จะน้อยลง กระดาษจะเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อเทียบกับหลุมทดสอบที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และจากผลของการทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ ได้ผลดังรูป 52 จะเห็นว่า หลุมทดสอบที่หยดแอนติบอดีบนกระดาษกรอง ทั้ง 3 ชนิด (เบอร์ 1, 2 และ 3) มีความเป็นหมู้อัลติไฮด์ลดลง (สีของปฏิกิริยาอ่อนกว่าหลุม ควบคุม) และเมื่อนำภาพไปวัดค่าความเข้มสี คำนวณค่า Δ RGB แล้วสร้างกราฟ ดังรูป 53 จะเห็นว่าเส้นกราฟ 3 เส้น จากการทดสอบกระดาษด้วยน้ำยาเพห์ลิงบนเตาให้ความร้อน 3 ครั้ง โดยทดสอบกระดาษแยกแต่ละชนิดจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ แต่ให้พิจารณากราฟในแต่ละเส้นเปรียบเทียบการลดลงของสีที่อ่านได้ และแต่ละครั้งจะมีหลุม ควบคุม แยกกัน และเมื่อพิจารณาจะเห็นว่าเส้นกราฟสีส้ม (เบอร์ 2) มีความแตกต่างของหลุมที่หยดแอนติบอดีเทียบกับหลุม ควบคุม ชัดเจนกว่าเส้นกราฟสีเทา (เบอร์ 3) และสีน้ำเงิน (เบอร์ 1) ตามลำดับ กล่าวคือมีหมู้อัลติไฮด์ลดลงมากที่สุด และจากข้อสังเกตของผู้วิจัยจากการเตรียมพิมพ์แวกซ์ บนกระดาษแต่ละชนิด พบว่ากระดาษกรอง เบอร์ 3 มีความหนามากที่สุดที่อาจก่อผลเสียต่อเครื่องพิมพ์แวกซ์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกกระดาษกรอง เบอร์ 2 ที่มีขนาดช่องว่างบนกระดาษ 8 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กกว่ากระดาษเบอร์ 1 และคุณสมบัติอื่น ๆ ไม่มีข้อแตกต่างทั้งอัตราการไหลของของเหลวรวมถึงความหนาของกระดาษมาทำการทดลองต่อเพื่อเปรียบเทียบกับกระดาษเบอร์ 1 ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 52 แสดงผลการทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษแต่ละชนิด ด้วย anti HNE 1:500



รูปที่ 53 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสี ระหว่างก่อนและหลังตรึงแอนติบอดี anti HNE 1:500 บนกระดาษแต่ละชนิดเมื่อทดสอบความคงเหลือของหมู่อัลดีไฮด์ด้วยน้ำยาเฟห์ลิง แสดงผลค่า

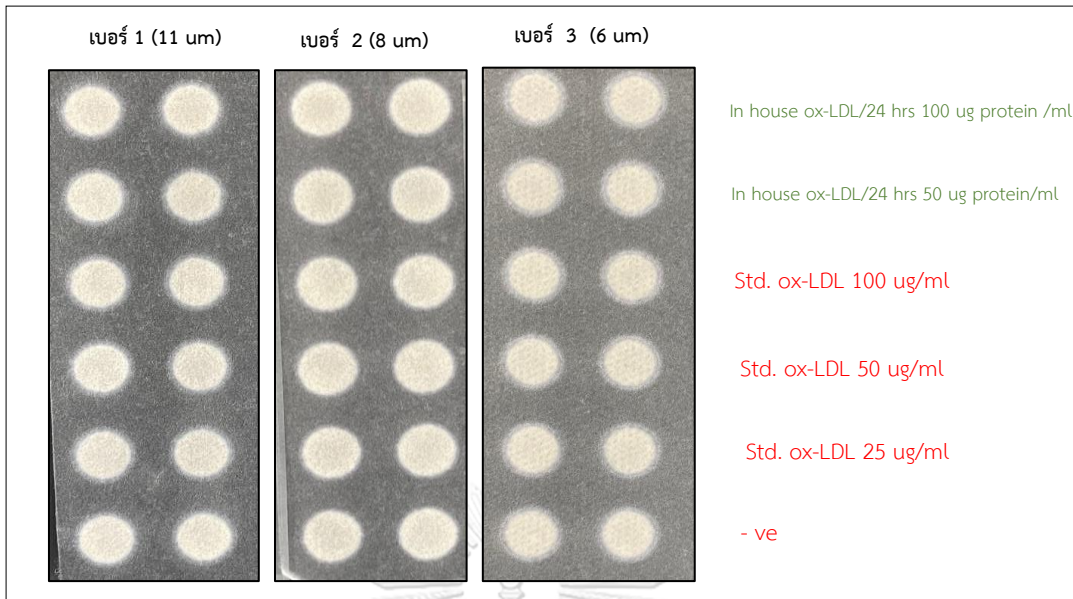
Mean \pm SD (n=3)

4.1.4.2.2.2 ผลการเปรียบเทียบการวัด ox-LDL บนกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิด

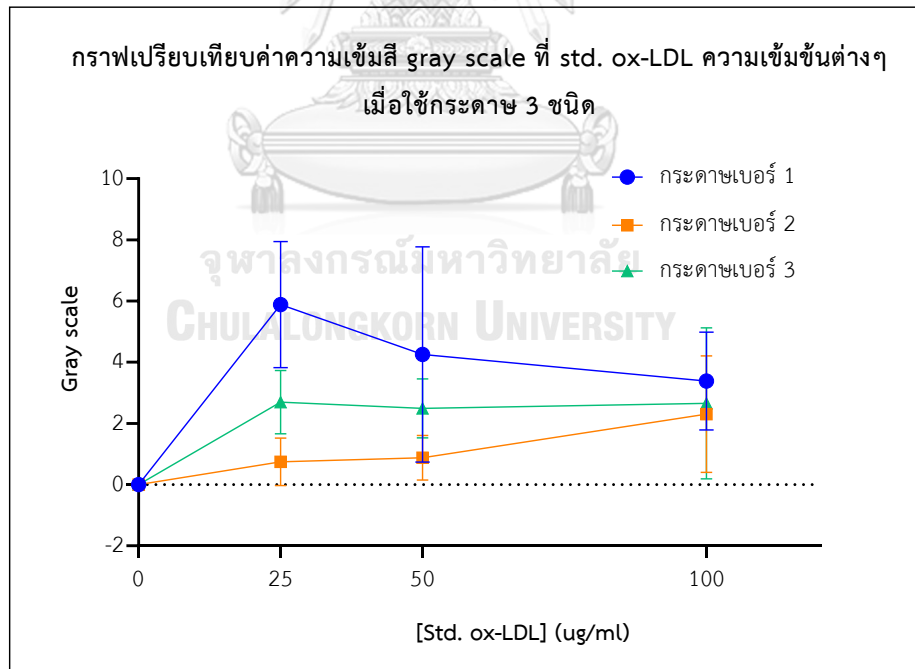
ทดสอบกับ std. ox-LDL และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ มีทั้งหมด 3 การทดลอง ตามตารางที่ 7

ผลการทดลองที่ 1: เป็นการทดสอบกับ ox-LDL บนกระดาษทั้ง 3 เบอร์ เพื่อเปรียบเทียบว่าชนิดไหนเหมาะสมที่สุด

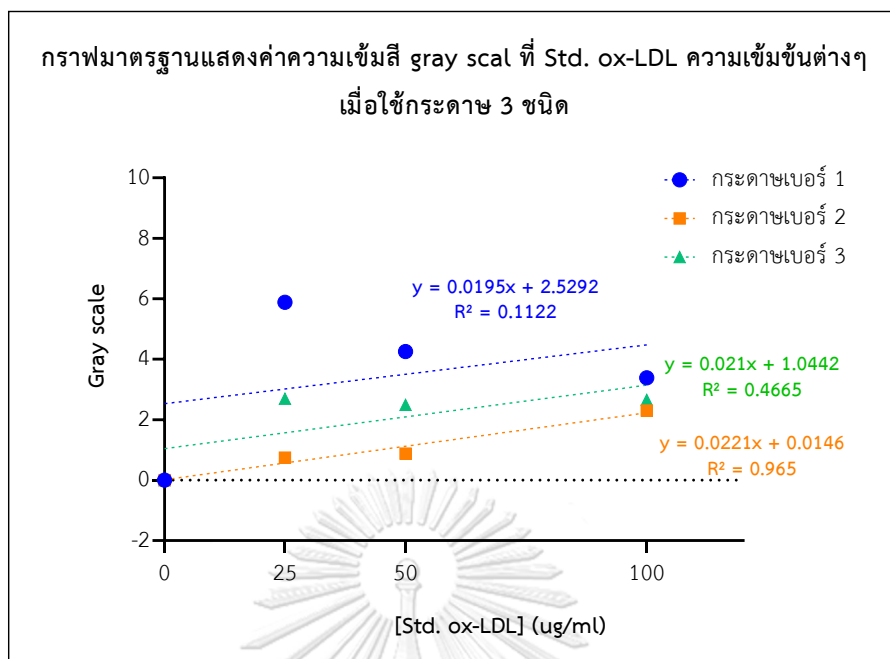
จากผลการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษกรอง ทั้ง 3 ชนิด ก่อนหน้าพบว่ามีความคงอยู่ของแอนติบอดีบนกระดาษกรองทั้ง 3 สำหรับการทดลองนี้เป็นนำกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบกับ std. ox-LDL (25, 50, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ (50 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงรูปที่ 54 จะเห็นว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL สีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิดไม่ความแตกต่างให้ความร้อนชัดเจน และเมื่อนำภาพผลที่ได้จากการทดลองไปวัดค่าความเข้มสี (gray scale) ได้กราฟดังรูป 55 จะเห็นว่ากระดาษเบอร์ 2 และ 3 มีค่าความเข้มสีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL ผลของกระดาษเบอร์ 1 มีค่าความเข้มสีลดลงซึ่งแปรผกผันกับความเข้มข้นของ std. ox-LDL และเมื่อนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ดังรูป 56 จะเห็นว่ากราฟมีลักษณะเป็นเส้นตรงจากผลของการทดสอบบนกระดาษ เบอร์ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้พิจารณาถึงความหนาของกระดาษกรองเบอร์ 3 ที่อาจก่อความเสียหายต่อเครื่องพิมพ์ แวกซ์ ดังนั้นจึงไม่นำ ทดสอบกับกระดาษเบอร์ 3 และไม่ทดสอบกับกระดาษกรองเบอร์ 1 มาทดสอบเนื่องจากเส้นกราฟไม่เป็นเส้นตรงจากการแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของ std. ox-LDL และเมื่อนำสมการของกราฟเส้นตรงของกระดาษกรองเบอร์ 2 ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ ox-LDL (50 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร) ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ พบว่า unknown มีความเข้มข้นเป็น 118 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไม่สามารถคำนวณหาค่า ox-LDL 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ได้ เนื่องจากค่าความเข้มสีที่ได้ติดลบ (สีปฏิกิริยาอ่อนกว่าหลุม ควบคุม) อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการทดลองต่อไป



รูปที่ 54 แสดงผลการทดสอบการวัด ox-LDL ครั้งที่ 1 บนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3) เมื่อตรึง^{1°} Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



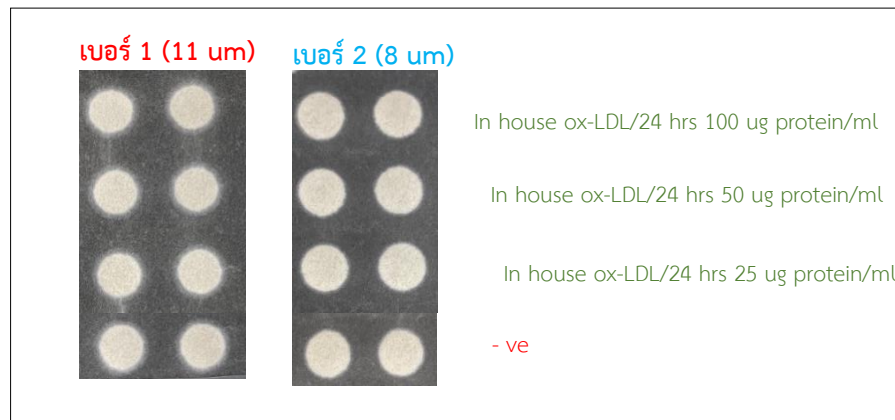
รูปที่ 55 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3) ผลครั้งที่ 1 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=2)



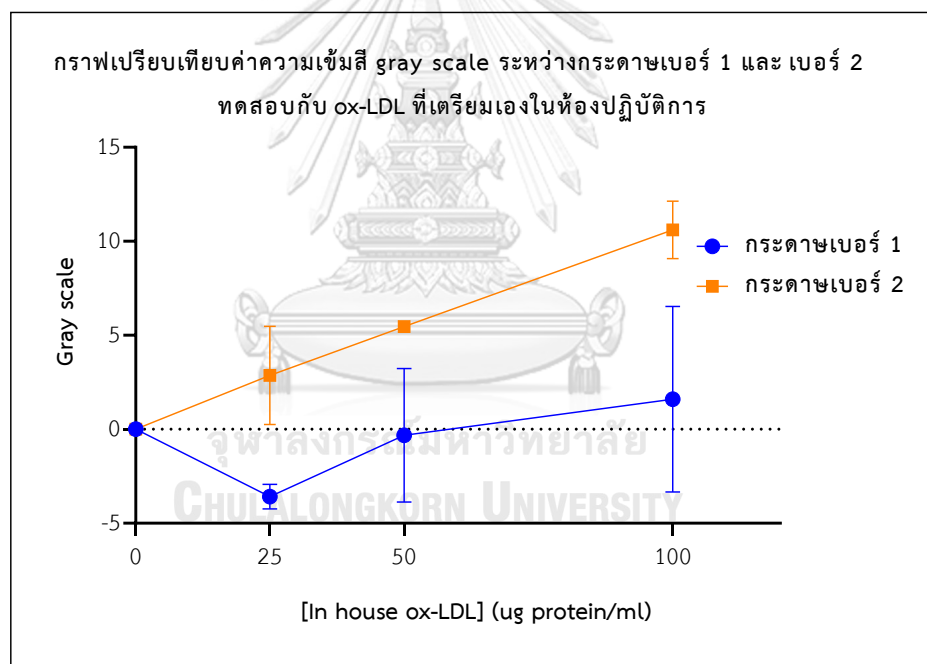
รูปที่ 56 แสดงกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 2 3) ครั้งที่ 1 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ std. ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

ผลการทดลองที่ 2: ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 2 ทดสอบเฉพาะ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ

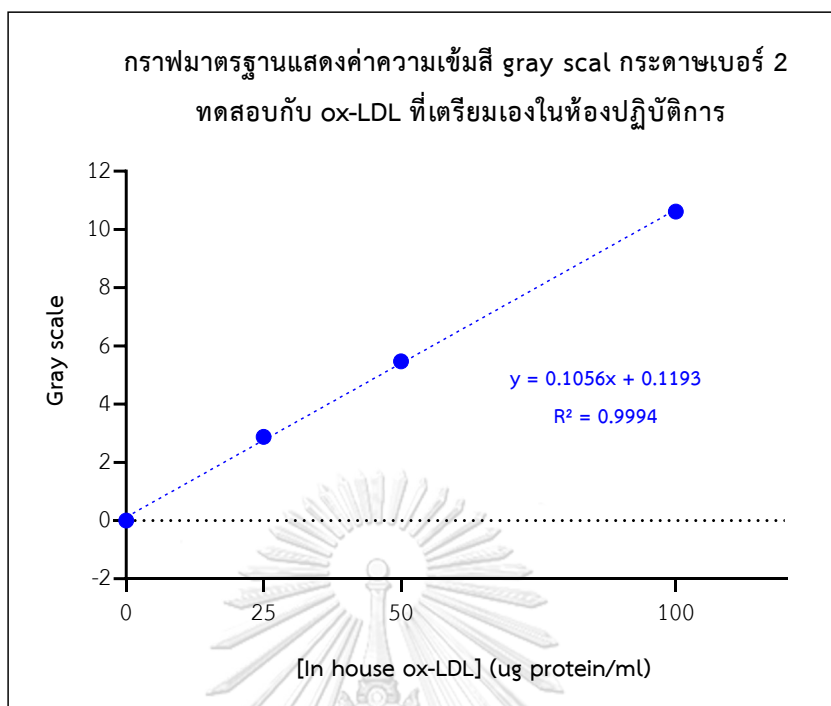
ในการทดลองครั้งนี้ทดสอบกับกระดาษเบอร์ 1 และ เบอร์ 2 มาทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการเพียงอย่างเดียว ที่ได้จากการออกซิไดซ์กับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ออกซิไดซ์โดยสมบูรณ์) เข้มข้น 25 50 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร เนื่องจาก std. ox-LDL หมาดระหว่างทำวิจัย ได้ผลการทดสอบดังแสดง รูปที่ 57 จะเห็นว่าผลของสีปฏิกิริยาบนกระดาษยังคงไม่ชัดเจน ในทุกช่วงความเข้มข้นของ ox-LDL ที่เตรียมเอง และบนกระดาษกรอง ทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำภาพไปวัดค่าความเข้มสี (gray scale) ได้กราฟรูป 58 จะเห็นว่า มีเพียงเส้นกราฟเส้นสีเหลือง คือ ผลจากกระดาษกรองเบอร์ 2 ซึ่งทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเอง ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มสีมากกว่า 0 ซึ่งนำมาสร้างเป็น Standard curve ได้ดังรูป 59



รูปที่ 57 แสดงผลของการทดสอบปฏิกิริยา ครั้งที่ 2 บนกระดาษเบอร์ 1 และ 2 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



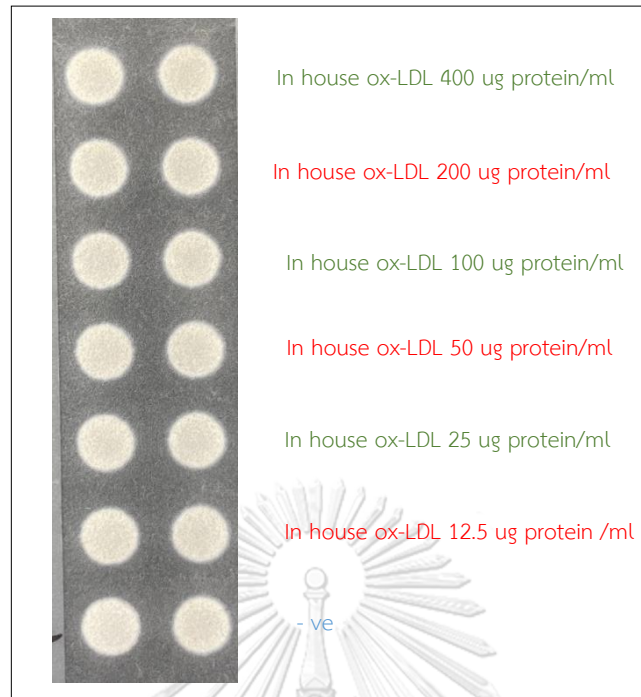
รูปที่ 58 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษแต่ละชนิด (เบอร์ 1 และ 2) ผลครั้งที่ 2 เมื่อทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=2)



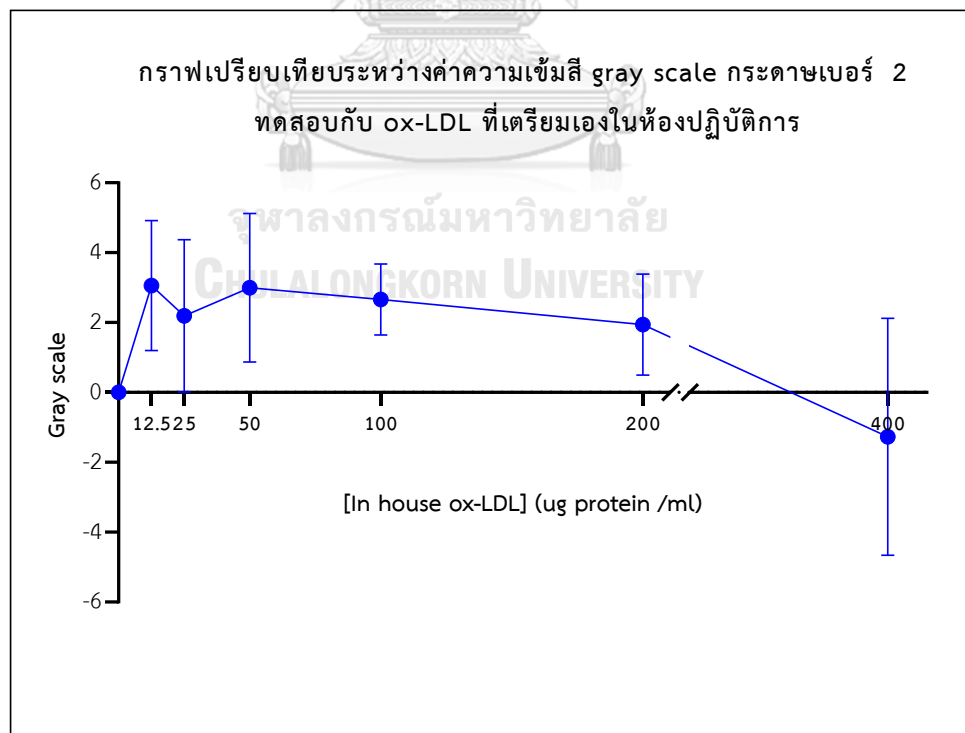
รูปที่ 59 แสดงกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษเบอร์ 2 ผลครั้งที่ 2 กับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=2)

ผลการทดสอบครั้งที่ 3:

เป็นการทดสอบซ้ำกับบนกระดาษกรองเบอร์ 2 ชนิดเดียว ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ (std. ox-LDL หมด) ที่ได้จากการออกซิไดซ์กับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น ตั้งแต่ 12.5 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ถึง 400 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ผลของปฏิกิริยาแสดงดังรูป 60 จะเห็นว่าสียังคงไม่ชัดเจนเช่นเคยแม้จะเพิ่มช่วงค่าของความเข้มข้นของ ox-LDL และเมื่อนำภาพที่ได้ไปอ่านค่าความเข้มสี (gray scale) ได้ดังกราฟรูป 61 จะเห็นว่ากราฟที่ได้ไม่เป็นเส้นตรง ที่ค่าความเข้มสีควรจะเป็นเส้นตรงกับค่าความเข้มข้นของ ox-LDL และจะเห็นได้ชัดว่าที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร กราฟเริ่มจะลดลงซึ่งอาจเป็นการยืนยัน limit of detection (LOD) จากการทดลองก่อนหน้า แต่ถึงอย่างไรก็ตามกราฟจากผลที่ได้ควรจะเป็นเส้นตรง



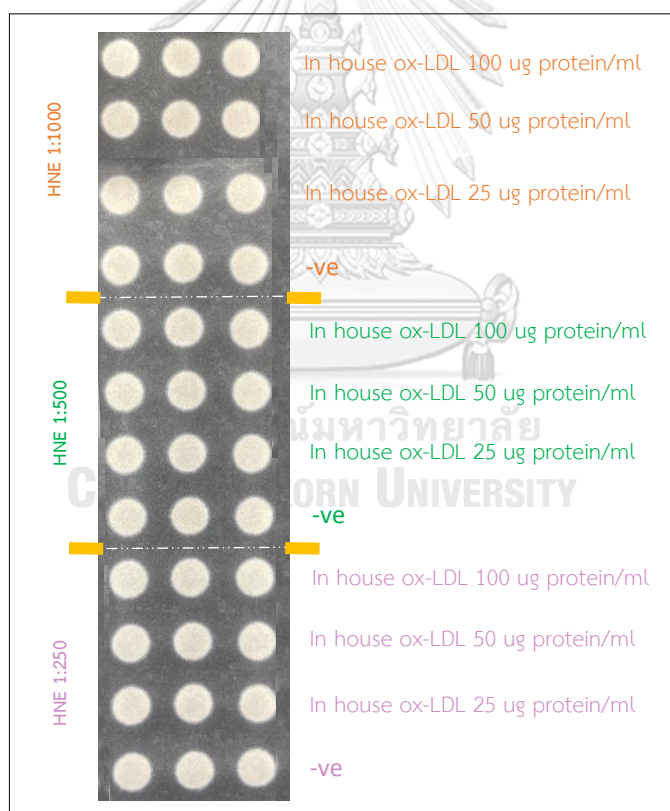
รูปที่ 60 แสดงผลของการทดสอบปฏิกิริยา ครั้งที่ 3 บนกระดาษเบอร์ 2 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:500 ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



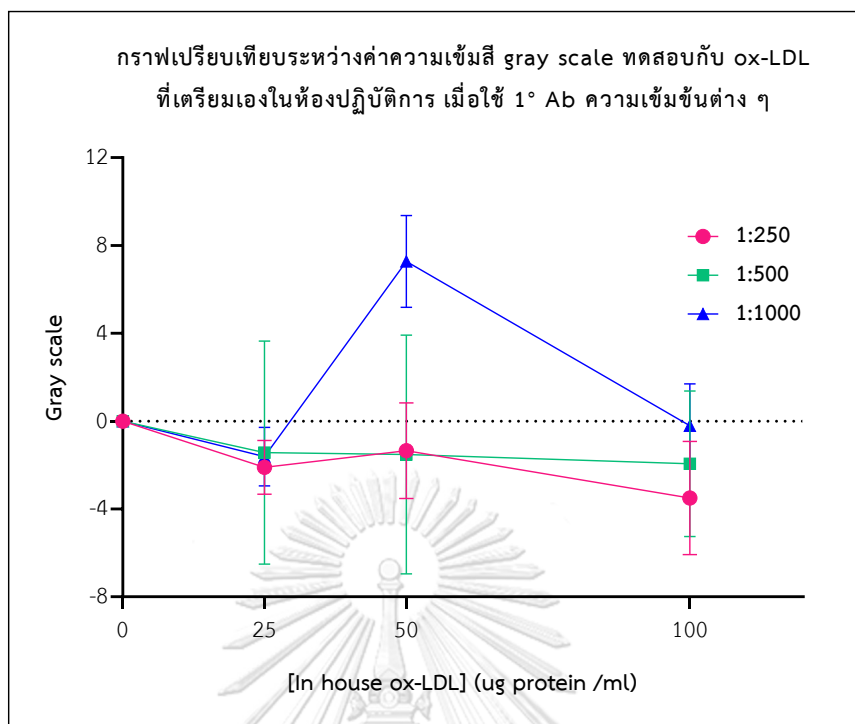
รูปที่ 61 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยา ผลครั้งที่ 3 บนกระดาษ เบอร์ 2 กับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean ± SD (n=2)

4.1.4.2.2.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2

จากการทดลองที่ผ่านมาสีของปฏิกิริยายังไม่ชัดเจน ในการทดลองนี้จึงได้ลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1° Ab โดยได้เพิ่มเป็น 3 ความเข้มข้น คือ 1:250, 1:500 และ 1:1,000 ของ anti HNE ตรึงบนกระดาษกรองเฉพาะเบอร์ 2 ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้น 25 50 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร ได้ผลการทดสอบบนกระดาษ ดังรูปที่ 62 จะเห็นว่าสีของปฏิกิริยายังคงไม่ชัดเจนในทุกช่วงความเข้มข้นของ 1° Ab และเมื่อนำมาอ่านค่าความเข้มสีแล้วสร้างกราฟ ดังแสดงรูป 63 จะเห็นว่ากราฟทั้ง 3 เส้น ที่แสดงถึงแต่ละความเข้มข้นของการตรึง 1° Ab ไม่เป็นเส้นตรง และยังต่ำกว่าค่า 0 ซึ่งหมายถึงมีค่าความเข้มสีน้อยกว่าหลุม ควบคุม ดังนั้นจึงยังไม่สามารถแปลผลการทดลองได้



รูปที่ 62 แสดงผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2 เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:250 1:500 1:1000 ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้นต่าง ๆ

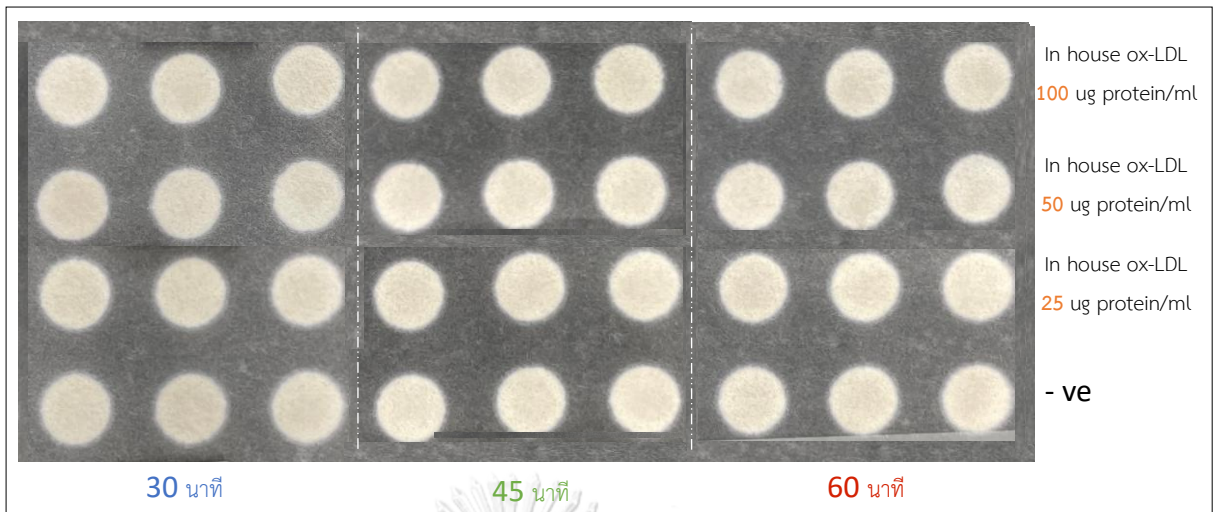


รูปที่ 63 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2 (Gray scale) เมื่อตรึง 1° Ab anti HNE ที่ความเข้มข้น 1:250 1:500 1:1000 ทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

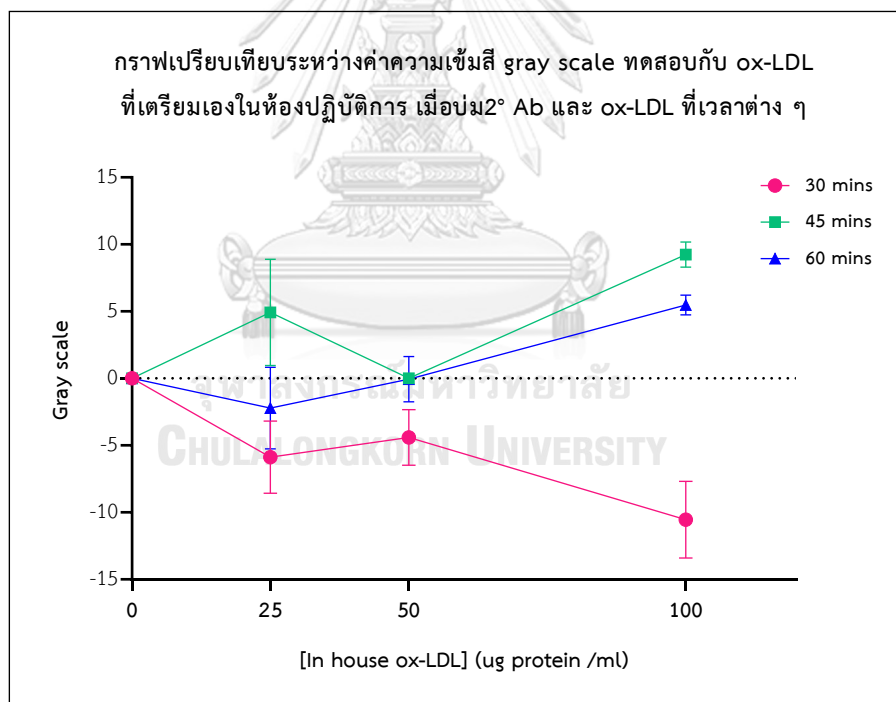
4.1.4.2.2.4 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม ox-LDL

และ 2° Ab โดยทดสอบบนกระดาษกรอง เบอร์ 2

จากการทดลองที่ผ่านมายังไม่เกิดสีปฏิกิริยาที่ชัดเจน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงได้ทดลองบ่ม ox-LDL (เข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร) และทดลองบ่ม 2° Ab ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 3 ช่วงเวลา ได้แก่ 30 นาที 45 นาที และ 60 นาที โดยหวังว่าการเกิดปฏิกิริยาจะดีมากขึ้นถ้าเพิ่มระยะเวลาในการบ่มสาร ได้ผลดังรูป 64 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไม่มีความชัดเจนของสีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ซึ่งเมื่อนำมาอ่านค่าความเข้มสีแล้วสร้างกราฟ ได้ดังรูป 65 จะเห็นว่ากราฟทั้ง 3 เส้น ที่แสดงถึงแต่ละช่วงเวลาของการบ่มยังคงไม่เป็นเส้นตรง และยังต่ำกว่าค่า 0 ซึ่งหมายถึงมีค่าความเข้มสีน้อยกว่าหลุมควบคุม ดังนั้นจึงยังไม่สามารถแปลผลการทดลองได้



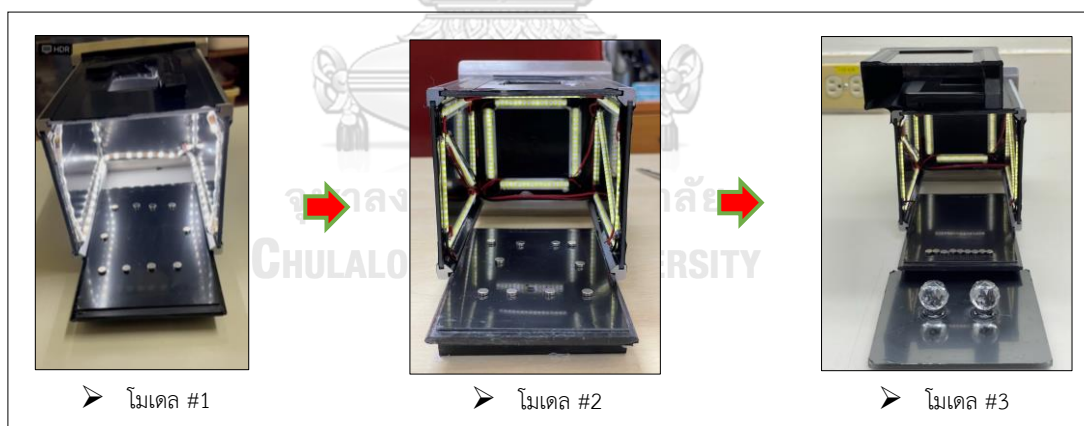
รูปที่ 64 แสดงผลของปฏิกิริยาบนกระดาษ เมื่อทดลองบ่ม ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ และ 2° Ab anti apo B-100 ที่ระยะเวลา 30 45 60 นาทีโดยตรึง 1° Ab ด้วย anti HNE 1:500



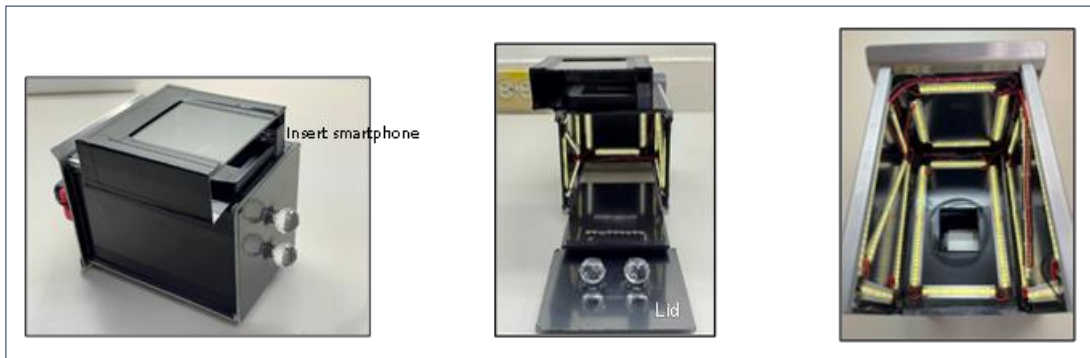
รูปที่ 65 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าความเข้มสีของปฏิกิริยาบนกระดาษ เบอร์ 2(Gray scale) เมื่อทดลองบ่ม ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ และ 2° Ab anti apo B-100 ที่ระยะเวลา 30 45 60 นาที โดยตรึง 1° Ab ด้วย anti HNE 1:500 แสดงผลค่า Mean \pm SD (n=3)

4.2 ผลการประดิษฐ์กล้องถ่ายภาพ

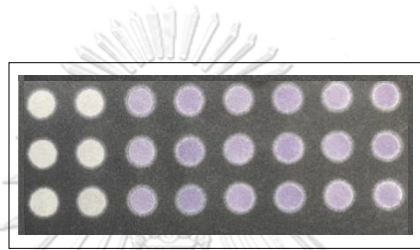
เนื่องจากการอ่านผลโดยใช้เครื่องสแกนเนอร์ไม่สะดวกต่อการทดสอบในภาคสนาม และการถ่ายภาพผลการทดสอบด้วยกล้องดิจิทัลหรือกล้องจากโทรศัพท์เคลื่อนที่มีปัจจัยด้านแสงเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้สีของภาพที่ถ่ายได้ไม่คงที่ ทางผู้วิจัยจึงได้ประดิษฐ์กล้องที่บแสงเพื่อควบคุมปัจจัยดังกล่าว ลักษณะกล้อง ทั้ง 4 ด้านเคลือบด้วยฟิล์มกันแสง ภายในเป็นหลอดไฟ LED ติดอยู่ โดยในช่วงแรกมีวิวัฒนาการของกล้องถ่ายภาพเกิดขึ้น 3 โมเดล ดังแสดงรูปที่ 66 จะเห็นว่าในช่วงแรกแสงที่ตกกระทบบมีจุดมืด (dark spot) เกิดขึ้นเนื่องจากหลอดไฟที่ใช้มีลักษณะเป็นดวง ทำให้เกิดแสงไม่คงที่ ต่อมาเปลี่ยนมาใช้หลอดไฟ LED ชนิด COB ที่ให้แสงตกกระทบบคงที่ ไม่เกิดเป็นจุดมืดของดวงไฟ (โมเดล 2) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาช่องสำหรับสอดโทรศัพท์เคลื่อนที่และช่องสำหรับถ่ายภาพอยู่ด้านบนบนกล่อง (โมเดล 3) ลักษณะกล้องถ่ายภาพมีสวิทช์ปิดและเปิดแหล่งกำเนิดแสงอยู่ด้านนอก ด้านล่างกล่องจะเป็นแผ่นเหล็กสำหรับติดผลการทดสอบที่เป็นกระดาษ ใช้แม่เหล็กหรือเทปใสยึดไว้ปิดฝาด้านบนท้ายก็จะได้กล่องที่บแสง ดังรูป 67 ที่สามารถถ่ายภาพโดยมีแหล่งกำเนิดแสงแหล่งเดียวกัน ภาพที่ได้มีความคมชัด มีแสงตกกระทบบทั่วถึง มีระยะการถ่ายภาพคงที่ไม่ว่าจะถ่ายภาพในช่วงเวลาหรือสถานที่ใด ๆ และสามารถนำภาพไปวิเคราะห์ต่อในกระบวนการต่อไปได้ ตัวให้ความร้อนภาพที่ได้จากการถ่ายโดยใช้กล้องถ่ายภาพ แสดงรูปที่ 68



รูปที่ 66 แสดงรูปแบบอุปกรณ์ถ่ายภาพ ทั้ง 3 โมเดล



รูปที่ 67 แสดงรูปแบบอุปกรณ์สำหรับใช้ถ่ายภาพ โมเดล #3



รูปที่ 68 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายที่ได้จากกล้องถ่ายภาพ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวัดบนกระดาษและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หัตถระดับของ ox-LDL โดยการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษด้วยเทคนิคการพิมพ์เวกซ์ กล่าวคือนำเอากระดาษกรอง Whatman มาพิมพ์เวกซ์เพื่อสร้างขอบเขตในส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยส่วนที่ชอบน้ำจะเป็นบริเวณของหลุมทดสอบและบริเวณของส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นขอบเขตที่ป้องกันไม่ให้ของเหลวซึมออกนอกวงทดสอบ ออกแบบรูปแบบของอุปกรณ์ตรวจวัดกระดาษบนโปรแกรมไมโครซอฟท์เวิร์ด 2010 ให้มีลักษณะคล้ายไมโครเพลท 96 หลุม (12x8) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.65 มิลลิเมตร ระยะระหว่างวงกลม 0.25 มิลลิเมตร แล้วพิมพ์หมึก เวกซ์ สีดำลงบนกระดาษกรองด้วยเครื่องพิมพ์ (ColorQube 8570, Xerox) นำกระดาษมาให้ความร้อนบน แท่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้เวกซ์ละลายและซึมเข้าเนื้อกระดาษกรอง ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ของปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย หลุมที่ไม่เกิดปฏิกิริยา (หลุมควบคุม) และหลุมที่เกิดปฏิกิริยา 1-3 หลุมทดสอบ โดยหดยดปริมาณในหลุมทดสอบ 3-5 ไมโครลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบ่มสาร สำหรับเทคนิคการหยดล้างปฏิกิริยาบนกระดาษนั้น ใช้ 0.05% PBST หยดล้างบนแผ่นรองซับชนิดมีเจล

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปรับปรุงกระดาษให้เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา antigen-antibody complex ประกอบด้วยการออกซิไดซ์กระดาษ และการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ การออกซิไดซ์กระดาษมีวัตถุประสงค์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างจากเซลลูโลสให้เป็นหมู่อัลดีไฮด์และพร้อมสำหรับการตรึงแอนติบอดี ด้วยสารละลายผสมระหว่างสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดต เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ผสมกับสารละลายลิเทียมคลอไรด์ เข้มข้น 3.5 โมลาร์ หยด 10 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ milliQ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ไมโครลิตร แล้วหยดโพลีเอธิลีนไกลคอล 3 ไมโครลิตร 20 นาที ล้าง 3 ครั้ง การทดสอบหมู่อัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษหลังจากถูกออกซิไดซ์นำมาทดสอบกับน้ำยาเฟห์ลิง ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนคอปเปอร์ตาร์เตรต (alkaline tartrate) ในสารละลายเบส หมู่อัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นบนกระดาษจะจับกับคอปเปอร์ตาร์เตรต เกิดเป็นสีแดงอิฐของคิวปรัสออกไซด์ (Cu_2O) เปรียบเทียบกับหลุมควบคุมจะเป็นสีน้ำเงินของน้ำยา ถ่ายภาพผลปฏิกิริยา วัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วนำมาคำนวณค่า ΔRGB นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังศึกษาความคงอยู่ของหมู่อัลดีไฮด์ พบว่า หลังจากออกซิไดซ์กระดาษที่ด้วยวิธีนี้ สามารถคงสภาพความคงอยู่ของหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษไว้ได้นานสุดที่ 72 ชั่วโมง

หลังจากออกซิไดซ์กระดาษแล้ว ผู้วิจัยได้ทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษซึ่งอาศัยพันธะ imine โดยหยด 1° Ab บนกระดาษ นาน 30 นาที ในสภาพที่รักษาความชื้น แล้ว หยดสารละลายไซยาโนโบโรไฮไดรด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ นาน 30 นาที เพื่อคงสภาพแอนติบอดีบนกระดาษนำไปทดสอบความคงเหลือของหมู่อัลดีไฮด์ด้วยการทดสอบกับน้ำยาเฟห์ลิง เมื่อแอนติบอดีจับอยู่บนกระดาษจะมีหมู่อัลดีไฮด์ลดลง เนื่องจากหมู่อัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อามีนของแอนติบอดีด้วยพันธะ imine เมื่อทดสอบกับน้ำยาน้ำยาเฟห์ลิงแล้ว สีของปฏิกิริยาจะเป็นสีเหลืองอ่อนเมื่อเทียบกับหลุมควบคุมที่ไม่ได้หยดแอนติบอดี นอกจากนี้ยังพบว่ากระดาษที่ถูกตรึงแอนติบอดีแล้ว สามารถคงอยู่ได้นานสุด 4 ชั่วโมง ทำการทดสอบ FTIR assay หรือฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ จำแนกประเภทสารเคมี และหาพันธะเคมีหรือหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุล โดยวิเคราะห์กระดาษ 3 สภาวะ ได้แก่ กระดาษสภาพเดิม กระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ และกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์และตรึงแอนติบอดี ทดสอบโดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ากระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ มีการดูดกลืนแสงที่ wave number 1740-1720 ซึ่งแสดงถึงการเกิดหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ และกระดาษที่ถูกตรึงแอนติบอดีมีการดูดกลืนแสงที่ wave number ดังกล่าวลดลง แสดงว่าหมู่อัลดีไฮด์ลดลงจากการจับกันของหมู่อามีนของแอนติบอดีกับหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษด้วยพันธะ imine นอกจากนี้พบว่ามี การดูดกลืนแสงที่ wave number 1690-1640 ซึ่งแสดงถึงการเกิดพันธะ imine บนกระดาษที่ตรึงแอนติบอดี

หลังจากได้สภาวะในการออกซิไดซ์กระดาษและตรึงแอนติบอดีแล้ว ขั้นตอนต่อไป เป็นการทดสอบวิเคราะห์วัดปริมาณ std. ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้คู่แอนติบอดี 2 คู่ ตามตารางที่ 10 ดังนี้

ตารางที่ 10 แสดงรายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัย

รายละเอียด	ชนิดของ 1° Ab	ชนิดของ 2° Ab (gold conjugated)
คู่ที่ 1	anti ox-LDL (serum, polyclonal, Abcam)	anti apo B (goat, polyclonal, Abcam)
คู่ที่ 2	anti HNE (goat/polyclonal/Bethyl Laboratory)	anti apo B-100 (mouse/monoclonal/Santacruz)

แอนติบอดีคู่ที่ 1 ใช้ anti ox-LDL เป็น 1°Ab ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ ox-LDL ที่ไม่ได้จำเพาะต่อส่วนใดส่วนหนึ่ง และใช้ gold conjugated anti apo B (Abcam) เป็น 2°Ab ซึ่งเป็นแอนติบอดี

ต่อส่วนอะโพอโรตีน ชนิด apo B บนอนุภาค LDL ติดฉลากด้วย gold nanoparticle ขนาด 40 นาโนเมตร แล้วใช้สารละลาย silver enhancement ในการทำให้สีของปฏิกิริยาชัดเจนมากขึ้น ถ่ายภาพผลการทดสอบบนกระดาษด้วยโทรศัพท์เคลื่อนที่ โดยใช้กล้องถ่ายภาพที่ได้ประดิษฐ์ขึ้น หลังจากนั้นนำภาพไปอ่านค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณค่า gray scale ตามสูตร

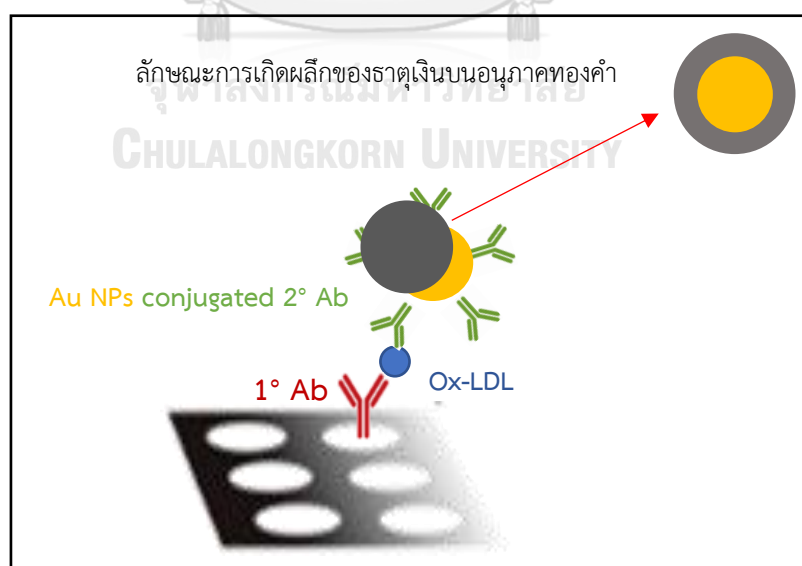
$$\text{gray scale} = 0.299\text{red} + 0.587\text{green} + 0.114\text{blue}$$

เนื่องจากระดับ ox-LDL ยังไม่มีค่าอ้างอิง จึงไม่มีช่วงค่ามาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ ผู้วิจัย จึงอ้างอิงความเข้มข้นของ ox-LDL จากงานวิจัยของ Wahid และคณะ (7) คือ 0.1 – 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ แต่ไม่เห็นผลการทดสอบ ต่อมาได้เพิ่มช่วงค่าความเข้มข้นเป็น 1 – 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามรายงานของ Holvoet และคณะ (36) ผลที่ได้ยังคงไม่ชัดเจนแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของ std. ox-LDL เป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และขณะเดียวกันมีการทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของทั้ง 1° Ab และ 2° Ab ในระหว่างนี้มีการปรับเปลี่ยนสูตรการเตรียมน้ำยา silver enhancement โดยใช้ 0.3% ซิลเวอร์ไนเตรต (สารละลาย A) และใช้ 3% ไฮโดรควิโนน (สารละลาย B) ตาม Vasily และคณะ (60) ผลของปฏิกิริยาที่ได้ยังคงไม่ชัดเจน หลังจากนั้นนำ 2° Ab คือ gold conjugated anti apo B (goat, polyclonal, Abcam) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อทดสอบความคงอยู่ของ gold nanoparticle ภายหลังจากนำมาติดฉลากกับแอนติบอดี ผลได้ว่ายังมีอนุภาคทองคำอยู่ไม่ได้เจือจางหรือหายไป จากผลการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ค่า 1.43 AU ซึ่งมากกว่า 1 AU ตามที่ชุดทดสอบกำหนด ต่อมาทำการทดลองล้าง unbound ของ 2° Ab ที่เป็น free form หรือแอนติบอดีที่ไม่ถูกติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำออกแล้วนำมาทดสอบปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์ std. ox-LDL ผลที่ได้ว่าแม้จะมีค่าความเข้มสีเพิ่มมากขึ้นแต่ผลของปฏิกิริยาบนกระดาษยังคงไม่ชัดเจน ตลอดจนได้ลองเพิ่มช่วงค่าความเข้มข้นของ std. ox-LDL และยังสามารถทดสอบกับ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ พบว่าสีของปฏิกิริยาบนกระดาษยังคงไม่ชัดเจน ผลที่ได้ไม่คงที่และสีของพื้นหลังของปฏิกิริยาในหลุมควบคุมเข้มกว่าหลุมทดสอบ จึงทำให้ค่าความเข้มสีของหลุมทดสอบบางความเข้มข้นต่ำกว่า 0

แอนติบอดีคู่ที่ 2 ใช้ 1° Ab และ 2° Ab เป็น anti HNE และ anti apo B-100 ตามลำดับ ในช่วงแรกได้ลองทดลองวิเคราะห์ std. ox-LDL บนกระดาษกรอง Whatman ทั้งเบอร์ 1, 2 และ 3 ซึ่งมีขนาดของรูกระดาษ (pore size) ที่ 6, 8 และ 11 ไมโครเมตร โดยในตอนแรกได้ทดสอบการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษกรองทั้ง 3 เบอร์ก่อนเพื่อยืนยันความคงอยู่ของแอนติบอดีบนกระดาษ โดยนำไปทดสอบหมู้อัลติไฮด์ด้วยน้ำยาเฟห์ลิง ผลการทดสอบพบว่ากระดาษทั้ง 3 เบอร์ มีแอนติบอดีตรึงอยู่ จึงนำมาทดสอบวิเคราะห์กับ std. ox-LDL พบว่ากระดาษกรอง เบอร์ 2 ให้ผลการทดสอบดีกว่า

และกระดาษมีความคงทนดีกว่า มีขนาดรูกระดาษเล็กกว่ากระดาษเบอร์ 1 ประกอบกับมีอัตราการไหลของของเหลวไม่แตกต่างกัน ภายหลังจากนำกระดาษกรองเบอร์ 2 มาใช้ในปฏิกิริยาโดยใช้ 5% skim milk เป็นน้ำยา blocking และใช้ 0.5 โมลาร์ ของซิเตรตบัฟเฟอร์ ในการเตรียมสารละลาย B ของน้ำยา silver enhancement ในระหว่างนี้มีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของทั้ง 1° Ab และ 2° Ab มีการปั่นล้างแอนติบอดีตัวที่ไม่ถูกติดฉลากกับอนุภาคทองคำ (unbound 2° Ab) มีการทดลองใช้ Ab diluent ชนิดต่าง ๆ ในการเจือจางแอนติบอดี และมีการทดลองเวลาการบ่มที่เหมาะสม ในทดสอบวิเคราะห์กับ std. ox-LDL และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการเพื่อหาสภาวะและเทคนิคที่ลดต่อการวิเคราะห์ พบว่าผลของปฏิกิริยาที่ได้บนกระดาษยังคงไม่ชัดเจน ไม่สามารถวิเคราะห์วัดปริมาณทั้ง std. ox-LDL และ ox-LDL ที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการได้อย่างชัดเจนและคงที่

ในระหว่างทำการวิจัยได้ประดิษฐ์กล่องถ่ายภาพที่มีลักษณะเป็นกล่องทึบสีเหลี่ยม มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดไฟ LED ชนิด COB ที่ให้แสงสีขาวตกกระทบทั่วถึง มีช่องสำหรับสอดโทรศัพท์เคลื่อนที่อยู่ด้านบนที่ประกอบด้วยรูเพียงรูเดียวที่พอดีกับเลนส์ของโทรศัพท์ ด้านล่างเป็นแผ่นโลหะที่สามารถยึดติดผลของปฏิกิริยาบนกระดาษด้วยแม่เหล็ก และส่วนท้ายปิดทึบด้วยฝาที่พอดีกับรูปทรงกล่องถ่ายภาพ ได้เป็นกล่องสำหรับใช้ถ่ายผลของปฏิกิริยาบนกระดาษที่สามารถใช้ในภาคสนาม สะดวก รวดเร็ว มีระยะและแสงคงที่ สามารถนำภาพไปวิเคราะห์ต่อได้หรือใช้เป็นต้นแบบของอุปกรณ์ในการถ่ายภาพเพื่อพัฒนาต่อไปในอนาคต



รูปที่ 69 แสดงแผนภาพการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษของงานวิจัย

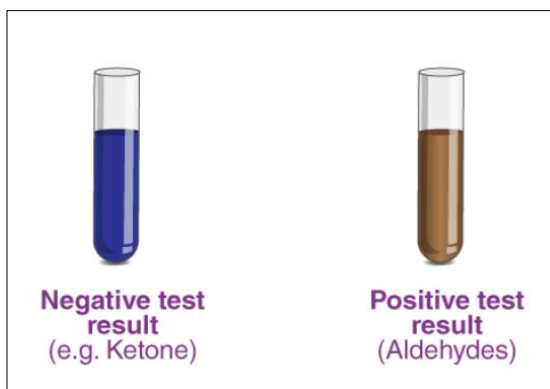
1° Ab = anti-HNE และ 2° Ab = anti-apo B-100

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาและพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจ ox-LDL บนกระดาษนี้ เป็นการประดิษฐ์อุปกรณ์ต้นแบบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ox-LDL ให้มีขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยาก ลดต้นทุน วัสดุอุปกรณ์ ตลอดจนปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ และเพื่อให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค ELISA (9, 36, 37, 61) อย่างไรก็ตามหลังจากได้ทำการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดบนกระดาษเพื่อนำมาวิเคราะห์ ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน พบว่าผลของการวิจัยยังไม่ประสบผลสำเร็จตามเป้าหมายเนื่องด้วยปัจจัยหลากหลายซึ่งจะอภิปรายต่อไป

อนุภาค LDL ในภาวะปกติจะจับกับ LDL receptor เพื่อนำเอาคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ แต่เมื่อ LDL ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ได้เป็น ox-LDL องค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไขมันจะเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ไลโปโปรตีนชนิด apoB-100 ฟอสโฟลิพิด กรดไขมัน เมื่อโครงสร้างของ apoB-100 เปลี่ยนไป ทำให้ไม่สามารถจับกับ LDL receptor แต่สามารถไปจับกับ receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ และเซลล์ดังกล่าวสามารถจับรับเอา ox-LDL ได้ไม่จำกัด เกิดเป็นโฟมเซลล์ เกิดพยาธิสภาพที่เส้นเลือดในชั้น intima ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลอดเลือดหัวใจ จากการตรวจวัดปริมาณ ox-LDL ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากต้องนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ และมีราคาสูง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัด ox-LDL บนฐานกระดาษ เนื่องจากกระดาษเป็นวัสดุที่หาง่าย เป็นมิตรกับธรรมชาติ สามารถเห็นสีของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และจากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดบนกระดาษของงานวิจัยนี้ เริ่มต้นจากการออกซิไดซ์กระดาษที่ใช้เพียงสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.02 – 0.5 โมลาร์ (62, 63) (สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท อิ่มตัวที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของกระดาษให้เกิดเป็นหมู่อัลดีไฮด์สำหรับให้แอนติบอดีมาจับ นำกระดาษไปทดสอบการเกิดหมู่อัลดีไฮด์ด้วยสารละลายเฟห์ลิง ซึ่งเป็นสารละลายสีน้ำเงินของคอปเปอร์ทาเตรตในสารละลายเบส โดยเป็นการผสมระหว่าง 1 ส่วนของสารละลาย A (สีน้ำเงินอ่อนของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต) และ 1 ส่วนของสารละลาย B (Rochelle salt) สารละลายที่มีหมู่อัลดีไฮด์จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มไปเป็นสีน้ำตาลแดงของคิวปัสออกไซด์ (Cu₂O) แสดงรูป 97 โดยสมการของปฏิกิริยาการเกิดได้เป็น



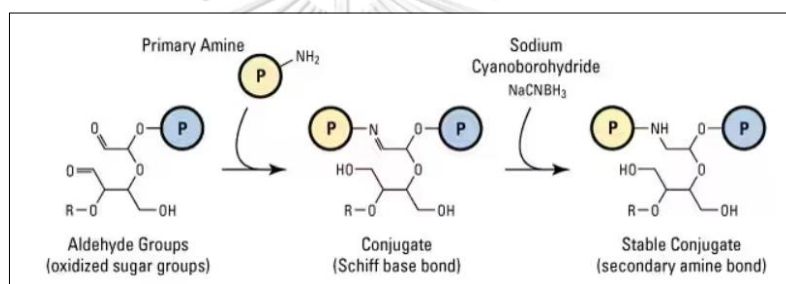


รูปที่ 70 แสดงตัวอย่างสีของปฏิกิริยาของการทดสอบด้วยน้ำยาเฟห์ลิง

งานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์นำเอาน้ำยาเฟห์ลิงดังกล่าวมาทดสอบการเกิดหมู่อัลดีไฮด์บนหลุม
 กระจกทดสอบ โดยการตัดแบ่งกระจกเป็นแนวยาวเดี่ยวที่ประกอบไปด้วยหลุมควบคุม (หยด
 เฉพาะน้ำยาเฟห์ลิง) และหลุมที่ต้องการทดสอบหาหมู่อัลดีไฮด์ใช้เทปใสติดรอบทั้ง 4 ด้าน เพื่อให้
 กระจกได้รับความร้อนอย่างทั่วถึงมากที่สุดที่วางทดสอบทุกวง แต่เนื่องจากกระจกที่ผ่านการหยด
 ด้วยของเหลวมาแล้วจะมีลักษณะโค้ง จึงทำให้กระบวนการติดกระจกให้แนบกับ แท่นให้ความร้อน
 เป็นข้อจำกัดของการทดสอบนี้ ทำให้บางหลุมทดสอบมีสีของปฏิกิริยาไม่ชัดเจนทั่วถึง อย่างไรก็ตามใน
 การทดสอบส่วนใหญ่ของงานวิจัยจะทำ 3 ซ้ำ นำกระจกไปวัดค่าความเข้มข้นแล้วนำค่าเฉลี่ยมา
 พิจารณา สำหรับการออกซิไดซ์กระจกเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของกระจกกรองจากเซลลูโลสให้เกิด
 เป็นหมู่อัลดีไฮด์ ด้วยสารละลายผสมระหว่าง 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์และ 0.4
 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท มาประยุกต์ใช้เพื่อให้ผลการออกซิไดซ์เกิดหมู่อัลดีไฮด์
 มากที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าได้มีการนำเอาสารละลายของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ มาช่วยใน
 การออกซิไดซ์เซลลูโลสผสมกับสารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดทร่วมกับการให้ความร้อน พบว่าให้
 ประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์กระจกดีขึ้นจากการเกิดหมู่ไฮดรอกซิล สำหรับการเกิดปฏิกิริยา
 ออกซิเดชันกับโซเดียมเพอร์ริออเดท โดยลิเทียมไอออนไปจับกับไฮดรอกซิลออกซิเจนอะตอม ที่
 ตำแหน่งคาร์บอนอะตอม ตัวที่ 3 ของเซลลูโลส ทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล
 ของเซลลูโลส ระหว่างออกซิเจนอะตอมของหนึ่งโมเลกุลกับไฮดรอกซิลไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุล
 ถัดไป นอกจากนี้ยังพบว่าลิเทียมคลอไรด์ ช่วยให้เกิดการสลายตัวของโซเดียมเพอร์ริออเดท (64)
 งานวิจัยนี้ได้ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายลิเทียมคลอไรด์ร่วมกับสารละลาย
 โซเดียมเพอร์ริออเดท ทดสอบด้วยน้ำยาเฟห์ลิงเทียบกับหลุมที่ผ่านการออกซิไดซ์เพียงสารละลาย
 โซเดียมเพอร์ริออเดทอย่างเดียว และพบว่าความเข้มข้น 3.5 โมลาร์ ของสารละลายลิเทียมคลอไรด์และ

0.4 โมลาร์ ของสารละลายไซเตียมเพอร์ริออเดท ให้ผลการออกซิไดซ์ดีที่สุดโดยไม่ได้ใช้ความร้อนช่วย เนื่องจากการใช้ความร้อนทำให้กระดาษแห้ง แสดงผลของปฏิกิริยาบนกระดาษรูปที่ 25 และแสดงในกราฟรูปที่ 26

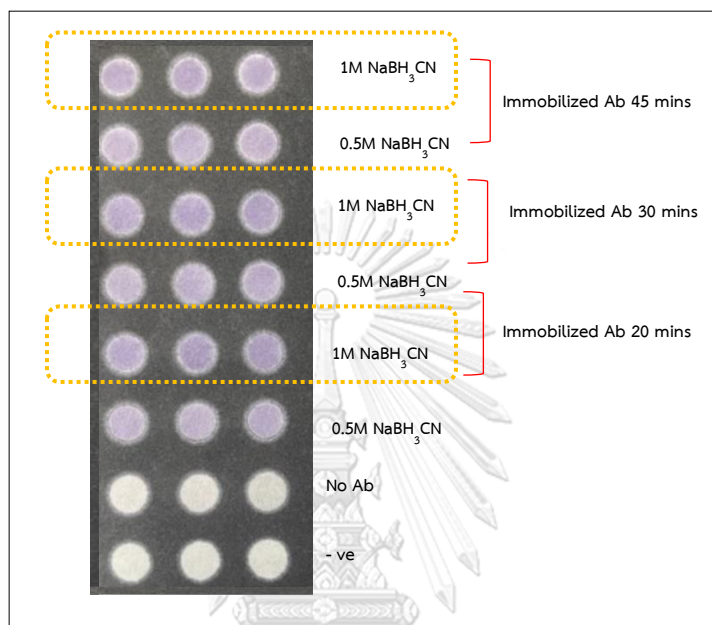
เมื่อได้กระดาษที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (RCHO) กระบวนการต่อไปคือการตรึงแอนติบอดีบนกระดาษ ด้วยปฏิกิริยา amination ระหว่างหมู่ amine ($-NH_2$) ซึ่งปรากฏอยู่ตำแหน่ง N-terminal ของโพลีเปปไทด์แต่ละสาย เรียกว่า alpha amine และอยู่ ณ ตำแหน่งบน Lysine residues (F_2) เรียกว่า epsilon amine จับเป็นโครงสร้าง Schiff base หรือด้วยพันธะ imine ซึ่งเป็นพันธะที่ยังไม่แข็งแรง จึงต้องใช้สารละลายไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ซึ่งเป็นสาร reducing agent มาช่วยให้พันธะจับกันแน่นมากขึ้น ปฏิกิริยาดังรูปที่ 98 จากการวิจัยนี้พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายไซเตียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่เหมาะสม คือ 1 โมลาร์



รูปที่ 71 แสดงปฏิกิริยาการเกิดพันธะ imine

นอกจากการทดสอบด้วยน้ำยาเฟห์ลิงแล้ว ได้ยืนยันผลการทดสอบหมู่อัลดีไฮด์ด้วย FTIR บนกระดาษ ได้แก่ กระดาษไม่ออกซิไดซ์ กระดาษที่ออกซิไดซ์ และกระดาษที่ออกซิไดซ์แล้วตรึงแอนติบอดี ผลการทดสอบด้วย FTIR พบว่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สนใจยังไม่ชัดเจน (รูปที่ 37) ซึ่งอาจจะเกิดมาจากการทดสอบ FTIR ไม่ได้ทำการทดสอบทันทีที่ส่งกระดาษทดสอบ อย่างไรก็ตามก่อนเริ่มนำสถานะที่ได้ดังกล่าวไปทดลองต่อ ผู้วิจัยได้ลองนำชุดน้ำยา ELISPOT kit ของบริษัท MABTECH ที่ใช้ทดสอบการหลั่ง interferon gamma ($IFN-g$) มาทดสอบกับแอนติเจนชนิด phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นหลุมควบคุมใน ELISPOT assay นำมาทดสอบบนกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ในสถานะที่ทดสอบได้ ในระหว่างที่ตรึงแอนติบอดีจากชุดทดสอบดังกล่าวบนกระดาษ ได้ลองใช้สารละลายไซเตียมไซยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ เปรียบเทียบเพื่อยืนยันผลที่ได้ก่อนหน้านี้ด้วย ซึ่งผลของปฏิกิริยาสามารถเห็นเป็นสีเกิดขึ้นบนกระดาษเมื่อเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม ดังแสดงรูป 71

นอกจากนี้พบว่าผลของการใช้ 1 โมลาร์ สารละลายไซยาโนโบโรไฮไดรด์ให้สีของปฏิกิริยาเข้มกว่า 0.5 โมลาร์ เมื่อนำไปสร้างกราฟเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงได้ว่าวิธีการในการออกซิไดซ์และตรึงแอนติบอดีบนกระดาษในงานวิจัยนี้ ได้ยืนยันผลด้วยการทดสอบเฟห์ลิง การทดสอบ FTIR และการนำชุดน้ำยาของการวิเคราะห์ ELISPOT มาทดสอบบนกระดาษตามวิธีที่ได้แล้ว



รูปที่ 72 แสดงผลการทดสอบน้ำยาจากชุด ELISPOT บนกระดาษกรอง

จากผลการวิจัยยังไม่เห็นผลการตรวจวิเคราะห์ std. ox-LDL อาจเนื่องจากแอนติบอดีชนิด IgG มีโครงสร้างดังแสดงในรูป 73a. ที่มีหมู่ amine ($-NH_2$) ที่ตำแหน่ง N-terminal ของแต่ละ โพลีเปปไทด์ (F_{ab}) ซึ่งเป็นส่วนของ antigen binding site และอยู่ที่ตำแหน่งของ Lysine residues ที่ (F_c) กล่าวคือ เมื่อเกิดปฏิกิริยา amination กับหมู่อัลดีไฮด์บนกระดาษที่ถูกออกซิไดซ์ ($-COOH$) การจับอาจจะเป็นแบบสุ่ม (random immobilization) ดังแสดงในรูป 73b. ที่อาจจะมีลักษณะการจับหลากหลาย เช่น จับที่ตำแหน่ง (F_c) จับที่ตำแหน่ง (F_{ab}) หรือจับกับด้านข้าง หรือจับแบบนอนราบ ดังนั้นลักษณะการจับของ 1° Ab บนพื้นผิว จึงอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่มีผลต่อการจับกับแอนติเจนที่สนใจ (65) อย่างไรก็ตามก็ตีการพัฒนาความแม่นยำในการจับของแอนติบอดีบนเครื่องมือในงาน immunosensor ยังคงเป็นประเด็นหนึ่งที่ยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป เพื่อไม่ให้สูญเสียตำแหน่งของการจับกับแอนติเจนที่สนใจ (66)

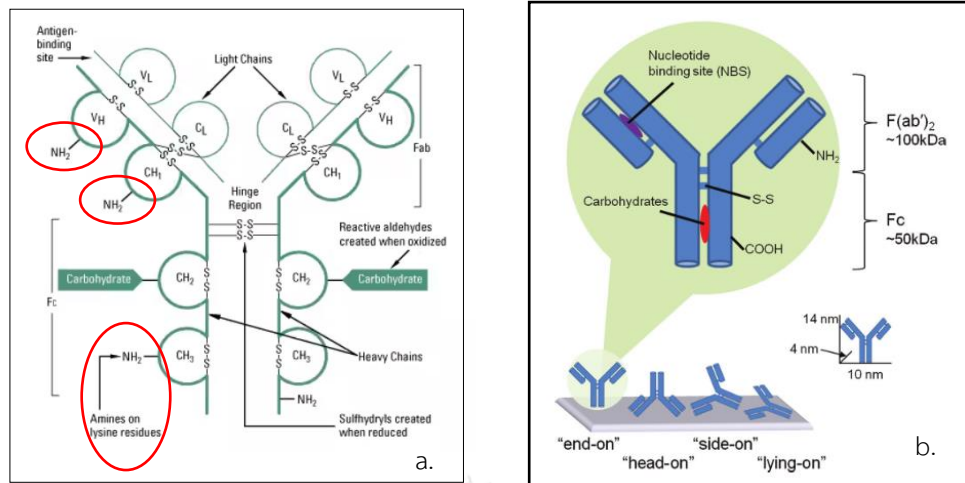
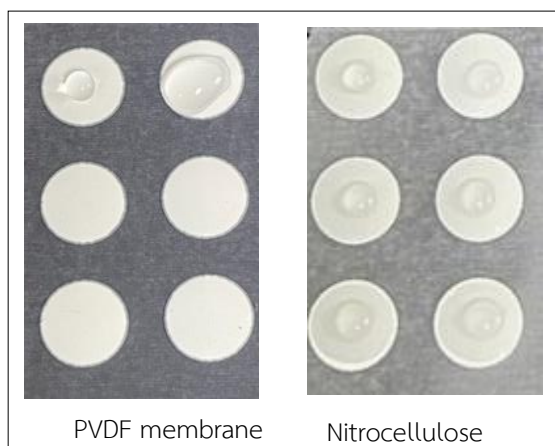


FIG. 1. Antibody orientation, dimensions, and important chemical species for targeting.

รูปที่ 73 แสดงโครงสร้างของแอนติบอดี (65)

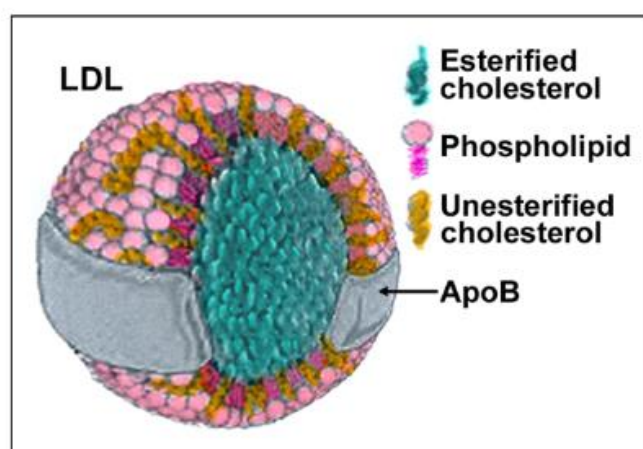
กระดาษกรองที่ใช้ในงานวิจัย เป็นกระดาษกรองเซลลูโลสที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เกิดหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งไม่ใช่วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการจับของโปรตีนโดยเฉพาะ ดังเช่นในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น เช่น ELISPOT assay, ELISA, Western blot หรือ ในงาน lateral flow ส่วนใหญ่จะใช้พื้นผิว หรือ membrane ที่เป็น high protein binding เช่น Polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) หรือ nitrocellulose membrane เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ทดลองนำเอา membrane ทั้ง 2 ชนิด มาใช้เป็นฐานกระดาษ พบว่าเมมเบรนดังกล่าวไม่สามารถให้น้ำซึมผ่านได้ ดังรูป 74 จะเห็นว่าเป็นลักษณะหยดน้ำบนเมมเบรน ประกอบกับเมมเบรนทั้ง 2 ชนิดมีความเปราะบางฉีกขาดง่ายไม่เหมาะกับการพิมพ์แวกซ์ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำเมมเบรนทั้ง 2 ชนิดมาประยุกต์ใช้กับเทคนิคของงานวิจัยนี้ได้ แม้จะมีการเปลี่ยนคุณสมบัติการเป็น hydrophobicity ของ PVDF membrane ให้เป็น hydrophilic ด้วยเทคนิค plasma treatment (67, 68) แต่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ



รูปที่ 74 แสดงลักษณะผลการนำเอา PVDF membrane และ nitrocellulose membrane มาประยุกต์ใช้

ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ หรือ LDL ประกอบไปด้วย ไขมันกว่า 80% โดยครึ่งหนึ่งเป็นไขมันชนิด polyunsaturated fatty acid (PUFA) ในหนึ่งอนุภาคประกอบไปด้วยฟอสโฟลิพิด 700 โมเลกุล คอลเลสเตอรอลอิสระ จำนวน 600 โมเลกุล คอลเลสเตอรอลเอสเตอร์ 1600 โมเลกุล ไตรกลีเซอไรด์ จำนวน 185 โมเลกุล และ 1 โมเลกุลของอะโพลipoprotein B-100 (apo B-100) ที่ประกอบไปด้วยหมู่อะมิโน 4,536 หมู่ อยู่ด้านนอก ในภาวะปกติ LDL จะจับกับ LDL receptor ที่ peripheral tissue โครงสร้างของโปรตีนและไขมันใน LDL สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ (69, 70) กระบวนการออกซิเดชันแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ในระยะแรกเรียกว่า lag phase เป็นช่วงที่สาร endogenous antioxidants เช่น วิตามิน E จะถูกทำลาย ในระยะที่ 2 เรียกว่า proliferation phase ไขมันชนิดไม่อิ่มตัว หรือ PUFA ที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาค LDL จะถูกออกซิไดซ์ได้เป็น fatty acid fragment และออกซิไดซ์ที่ PUFA ซึ่งเป็นองค์ประกอบของส่วนฟอสโฟลิพิดได้เป็น oxidized phospholipid (ox-PL) ที่ยังคงมีความสามารถในการจับกับ LDL receptor ได้อยู่บ้าง เรียกช่วงนี้ว่า minimally modified LDL ในระยะที่ 3 เรียกว่า Decomposition stage ส่วนของ fatty acid fragment ดังกล่าวเปลี่ยนเป็นหมู่อัลดีไฮด์จับกับส่วนของ Lysine residues ที่อะโพลipoprotein B เกิดเป็น epitope ใหม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอย่างสมบูรณ์แบบที่ apo B ได้เป็น oxidized LDL (71) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ จากการถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไม่สามารถจับกับ LDL receptor แต่จับกับ scavenger receptor ที่ผิวเซลล์แมคโครฟาจนำ ox-LDL เข้าสู่เซลล์ การนำ ox-LDL เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจไม่มีที่สิ้นสุด ทำให้ไขมันสะสมในแมคโครฟาจมากขึ้น เกิดเป็นโฟมเซลล์ พยาธิสภาพดังกล่าวเกิดขึ้นบริเวณชั้น intima ของหลอดเลือด เมื่อเกิดการสะสมของโฟมเซลล์มากขึ้นเกิดเป็นรอยโรคที่หลอดเลือดหรือ fatty

streak lesion มีการหลั่งสาร chemoattractant เกิดการสะสมและทับถมของเม็ดเลือดขาว เกิดเลือดมากขึ้นในบริเวณดังกล่าวเกิดเป็นก้อนพลาตที่สามารถกระตุ้นการหลั่งสาร proinflammatory mediators เกิดการสูญเสียหน้าที่ของหลอดเลือด โดยยับยั้งการทำงานของสาร nitric oxide (NO) มีผลต่อการต้านภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด (72-74) นอกจากนี้ยังพบว่า ox-LDL เกี่ยวข้องกับภาวะอื่น ๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเมตาบอลิกซินโดรม โรคเบาหวาน

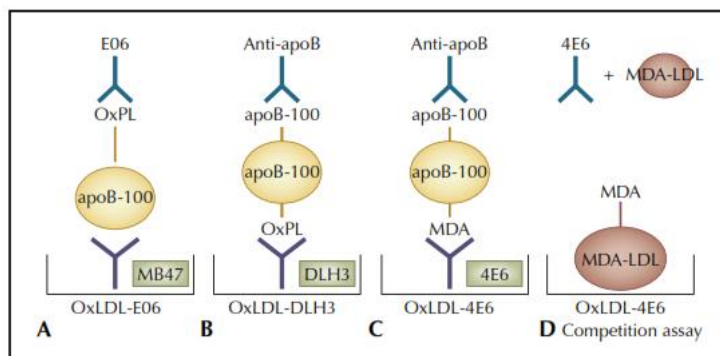


รูปที่ 75 แสดงองค์ประกอบของโครงสร้างของอนุภาค LDL ที่สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ (75)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า fully ox-LDL ในกระแสเลือดมีช่วงชีวิตสั้น กล่าวคือสามารถถูกกำจัดได้อย่างรวดเร็วด้วยกระบวนการ phagocytosis โดย reticuloendothelial system เช่น แมคโครฟาจ dendritic cells, sinusoidal endothelial cells และ Kupffer cells ในตับ รวมไปถึง anti ox-LDL (76) อย่างไรก็ตามยังสามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือด (77) มีการพัฒนาแอนติบอดีเพื่อตรวจวัดระดับของ circulating ox-LDL ด้วยเทคนิค ELISA โดยมีการพัฒนาแอนติบอดีชนิด monoclonal ที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ 4E6 (78), E06 (79), และ DLH3 (80) ซึ่งแอนติบอดีชนิด 4E6 ได้นำมาใช้เป็นชนิดแรก จัดเป็นแอนติบอดีชนิดที่ recognizing an apo B fragment โดยสามารถจับได้กับ epitope ที่อยู่บนโครงสร้างของ apo B ที่เปลี่ยนไป ซึ่งเกิดจากการจับของ PUFA ชนิด malondialdehyde (MDA) ที่ตำแหน่ง Lysine residues ของ apo B ในทาง clinical trial ได้นำแอนติบอดีชนิด 4E6 นำมาใช้อย่างกว้าง เช่น ใช้แอนติบอดีชนิด 4E6 วัดระดับ ox-LDL ด้วย ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA โดยตรึง แอนติบอดีชนิด 4E6 บน ELISA plate เพื่อจับ ox-LDL ในพลาสมา และใช้ anti-apo B-100 เป็นแอนติบอดีอีกตัวในการจับ ดังรูป 75C. ปัจจุบันมีการนำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจวัดด้วยเทคนิค Competitive ELISA ในชื่อการค้า Mercodia

ประเทศ Sweden โดยบ่ม พลาสมา กับแอนติบอดีชนิด 4E6 ก่อนแล้ว นำมาบ่มบนเพลทที่ตรึงด้วย reference ox-LDL ถ้าแอนติบอดี 4E6 จับกับ reference ox-LDL น้อย แสดงว่าในพลาสมา มีปริมาณของ ox-LDL อยู่มาก ดังรูป 75D. ข้อจำกัดของแอนติบอดีชนิด 4E6 คือ จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง Lysine residues ของ apo B มากกว่า 60 ตำแหน่ง จึงจะสามารถตรวจวิเคราะห์โดยใช้แอนติบอดีชนิดนี้ได้ (81, 82) และอีกหนึ่งข้อจำกัด คือ การใช้แอนติบอดีชนิด 4E6 วัดระดับของ ox-LDL พบว่าระดับของ ox-LDL มีค่าใกล้เคียงกับระดับของ LDL ในพลาสมา เนื่องจาก 4E6 เกิด cross-reactivity กับ native LDL จึงไม่จำเพาะกับ epitope ของ ox-LDL แม้จะจับกับ ox-LDL ได้ดีกว่า native LDL มากกว่าถึง 1000 เท่า (9) และแม้ว่าจะมีการนำ 4E6 มาใช้วัดระดับ ox-LD ใน clinical trial อย่างแพร่หลายแต่ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ epitope บน ox-LDL (83)

ในขณะที่ DLH3 และ E06 จัดเป็นแอนติบอดีชนิด recognizes oxidative modification ที่จำเพาะกับตำแหน่ง oxidized phosphatidylcholine (ox-PC) ซึ่งเป็นตำแหน่ง PUFAs บน ฟอสโฟลิพิดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากกระบวนการออกซิเดชัน สำหรับแอนติบอดีชนิด DLH3 จำเพาะกับส่วน ox-PC ของ ox-LDL นำมาทดสอบด้วยเทคนิค sandwich ELISA ใช้แอนติบอดีชนิด DLH3 เป็น primary antibody แล้วทดสอบกับตัวอย่างที่ปั่นแยก LDL ด้วยเทคนิค density gradient ultracentrifugation ใช้ anti-apo B เป็น detection Ab ดังรูป 75B. (79) จากการศึกษาพบว่า DLH3 สามารถจับได้กับ ox-PC ทั้งที่เป็น free form และ conjugated form ที่เกิดจากการจับกันระหว่างหมู่ฮัลต์ไฮด์ของโครงสร้าง ox-PC กับโปรตีน มีการนำแอนติบอดีชนิดดังกล่าวมาใช้ในงาน immunohistochemistry เช่นเดียวกับการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ atherosclerotic lesion นอกจากนี้ยังพบว่า ox-PC ยังแสดงบนเซลล์ hepatocytes ของคนที่เป็นโรคตับ ชนิด nonalcoholic steatohepatitis สำหรับแอนติบอดีชนิด E06 เป็นแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน phosphorylcholine (PhoCho) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic moiety บน phosphatidylcholine (80, 84) ถูกนำมาใช้ในงาน hypercholesterolemia และ spontaneous atherosclerosis (80) เทคนิค sandwich ELISA ที่นำ E06 มาใช้วิเคราะห์เป็นการวัด ox-PC ต่อ 1 หน่วย apo B โดยการตรึงแอนติบอดีชนิด MB-47 ที่จำเพาะต่อส่วน apo B-100 ที่ปรากฏอยู่บนอนุภาคทั้ง LDL, intermediate-density lipoprotein (IDL) และ lipoprotein a (Lp(a)) บนเพลทก่อน แล้วใช้ E06 ที่ติดฉลากกับไบโอตินจับกับส่วนที่จำเพาะต่อส่วน ox-PC ของ ox-LDL 102A. จึงเป็นข้อดีของวิธีนี้ก็คือค่าที่ได้จากการตรวจวัด ox-LDL นี้ไม่เกี่ยวข้องกับระดับคอเลสเตอรอลหรือ LDL ดังเดิม (83, 84) อย่างไรก็ตามก็ยังมีการศึกษาพบว่า amino acid sequence ของแอนติบอดีดังกล่าวคล้ายกับแอนติบอดีที่ใช้ในกลุ่มเชื้อวัณโรค (T15) (85)



รูปที่ 76 แสดงการนำแอนติบอดีชนิด ๆ มาทดสอบวัด ox-LDL ด้วยเทคนิค ELISA (86)

จากการศึกษาพัฒนาแอนติบอดีที่ใช้ในเทคนิค ELISA ข้างต้น (4E6, DLH3, E06) ที่เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตำแหน่งของ ox-LDL ที่เปลี่ยนไป ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ระดับ ox-LDL เนื่องด้วยปัจจัยข้อจำกัด เช่น ความจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิด, เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ และหน่วยที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละเทคนิคแตกต่างกันจึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ประกอบกับชุดตรวจที่มีจำหน่าย เช่น ชุดตรวจของบริษัท Merckodia (coated plate: 4E6, detection Ab: anti apo B), Abcam (coated plate: anti HNE or anti MDA, detection Ab: anti apo B-100) และ CELL BIOLAB (coated plate: anti HNE or anti MDA, detection Ab: anti apo B-100) โดยแต่ละบริษัทใช้แอนติบอดีในการตรวจจับแตกต่างกัน และไม่ได้ระบุหรือแจ้งรายละเอียดในการใช้แอนติบอดีอย่างชัดเจน ที่สำคัญคือไม่มีแอนติบอดีแยกจำหน่าย จึงทำให้การพิจารณาในการเลือกใช้แอนติบอดีในงานวิจัยมีข้อจำกัดหลายประการ รวมถึงแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัยก่อนหน้า เช่น E06 และ MB47 เคยมีจำหน่ายในนามของบริษัท Avanti ปัจจุบันได้ยกเลิกการจำหน่าย จึงทำให้เหลือตัวเลือกในการใช้แอนติบอดีมีไม่มากและจำกัด ทั้งนี้ในช่วงแรกเลือกที่จะใช้ anti ox-LDL ของบริษัท Abcam (จำหน่ายเพียงผู้เดียว) ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด crude อยู่ในรูปซีรัมที่ไม่ทราบความเข้มข้นและไม่จำเพาะต่อตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของ ox-LDL โดยหวังว่าแอนติบอดีชนิดนี้จะสามารถจับกับ ox-LDL ได้ และเลือกใช้ polyclonal anti apo B ของบริษัท Abcam เป็น secondary antibody และจากผลที่ไม่สำเร็จจากการใช้แอนติบอดีคู่นี้ อาจเป็นเกิดจากความไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่ไม่สามารถจับกับตำแหน่งของ ox-LDL ได้

กระบวนการออกซิเดชันของ LDL เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างของโปรตีนและไขมัน (heterogeneity) ซึ่งกระบวนการหลัก ๆ จะเป็นการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่ PUFA แสดงบนส่วนของฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ โดยผลิตผลที่ได้จากกระบวนการ lipid peroxidation มีคุณสมบัติเป็น

reactive aldehyde เช่น malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (4-HNE) (87) โดย aldehyde product ดังกล่าวจะไปจับกับ lysine residues ด้วยในรูปของ Schiff base เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ LDL จึงได้ว่าทั้ง MDA และ HNE เกี่ยวข้องกับ ox-LDL ทั้งในเรื่องโครงสร้างที่เปลี่ยนไปและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตำแหน่งของ MDA และ HNE สามารถเกิด cross-react กับ ox-LDL ได้ (88) และในการเกิดออกซิเดชันนี้จะเกิด HNE มากกว่า MDA เนื่องจากคุณสมบัติของ MDA มีความเป็น hydrophilic จึงทำให้ไม่คงทนอยู่กับอนุภาค LDL (89) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้นจึงเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกแอนติบอดีชนิด HNE มาใช้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ตัวเลือกต่อไป เนื่องด้วยสามารถเกิด cross-react กับ ox-LDL และ มีความคงทนและปริมาณมากกว่า MDA สำหรับ HNE (Abcam) ต่อมาเลือกเป็น goat polyclonal anti HNE ของบริษัท Bethyl เพื่อนำมาตรึงบนกระดาษทดสอบ และเลือกใช้ mouse monoclonal anti apo B-100 ของบริษัท Santacruz มาเป็น secondary antibody เนื่องจากเห็นว่าในท้องตลาดที่มีการจำหน่ายชุดทดสอบ ELISA ทั้งของบริษัท Abcam และ CELL BIOLAB มีการใช้แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด อยู่ในชุดของการทดสอบ ox-LDL ประกอบกับ HNE เป็นตำแหน่งของ PUFA ที่ถูกออกซิไดซ์ที่คงทนและพบได้มาก แม้จะพบได้ในอนุภาคไลโปโปรตีนชนิดอื่น ๆ ก็ตาม เช่น VLDL, LDL และ LP (a) แต่แอนติเจนหรือสิ่งที่นำมาตรวจเป็น LDL ที่ได้จากการปั่นแยก LDL ออกจากไลโปโปรตีนชนิดอื่น ๆ ด้วยเทคนิค ultracentrifugation และใช้ std ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนมาทดลองสำหรับ detection Ab ที่นำมาทดลองนั้นเป็นแอนติบอดีต่อส่วนของ apo B-100 และทั้งที่เป็นแอนติบอดีชนิด monoclonal ที่อาจยังไม่มีควาจำเพาะต่อส่วนของ apo B ที่เปลี่ยนไป จึงทำให้ผลที่ได้ยังคงเห็นปฏิกิริยาไม่ชัดเจนหรือยังไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากความจำเพาะของแอนติบอดีต่อส่วน epitope ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุภาค LDL ที่มีความซับซ้อน

การใช้คอปเปอร์ซัลเฟตมาออกซิไดซ์อนุภาค LDL ที่แยกได้จากกระบวนการ fraction โดยการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นการเปลี่ยนโครงสร้างดั้งเดิมให้เป็น ox-LDL ใน in vitro เพื่อนำมาเป็นโมเดลในการทดลองนั้นสามารถทำได้ ซึ่งกระบวนการลิพิดเพอร์ออกซิเดชันเกิดขึ้นภายหลัง lag period หรือหลังช่วง 60-90 นาที ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาสามารถที่จะตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอร์ออกซิเดชันได้ เช่น การตรวจสอบการเกิดโครงสร้างของ conjugated diene ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 233 นาโนเมตร การทดสอบ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เพื่อทดสอบการเกิดโครงสร้างของสารประกอบอัลดีไฮด์ และการตรวจวัดประจุลบที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค agarose gel electromobility ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แยกอนุภาค LDL จากซีรัมด้วยกระบวนการ fraction ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ แล้วตรวจติดตามการเกิดออกซิเดชันด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 นาโนเมตร นำ ox-LDL ที่ได้ไปใช้ในการทดลอง เนื่องจาก std. ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้นของจากบริษัท CELL BIOLAB หหมด

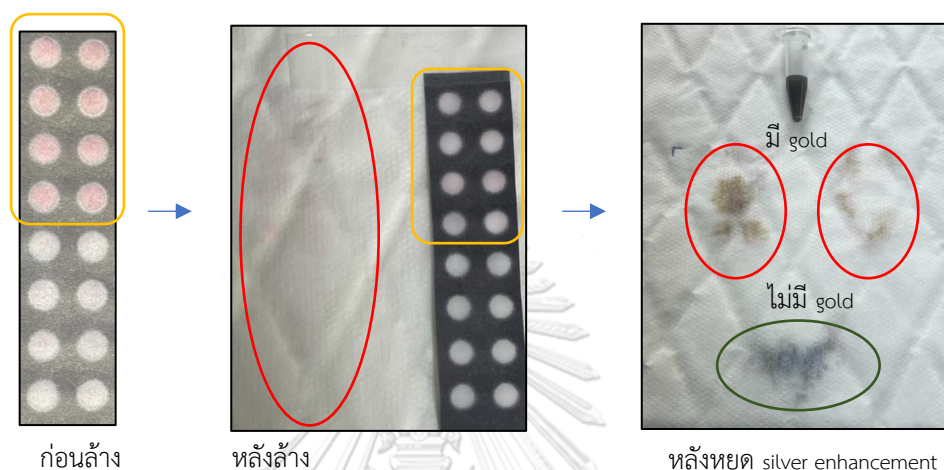
ระหว่างการวิจัย และจากการที่นำ ox-LDL ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการมาทดลองนั้น ผู้วิจัยได้ลองนำเอา LDL ที่ถูกออกซิไดซ์ทั้งในช่วงต้นและช่วงกลางมาทดสอบกับชุดแอนติบอดีที่มีแล้วแต่ผลที่ได้ก็ยังคงไม่เกิดสีของปฏิกิริยา โดยหวังว่า ox-LDL ที่อยู่ในระหว่าง mild oxidation (minimal ox-LDL) อาจเกิดปฏิกิริยาสามารถจับได้กับแอนติบอดีที่มี

แนวความคิดนำน้ำยาจากในชุดทดสอบ ELISA มาประยุกต์ทดลองใช้บนกระดาษ เป็นช่องทางที่ดี เนื่องจากภายในชุดทดสอบมีทั้งแอนติบอดีและ std. ที่ได้ผ่านการทดสอบมาแล้วว่าเข้าคู่กันได้ แต่ข้อจำกัดของการนำมาใช้นั้นมีอยู่มาก เช่น แอนติบอดีที่ตรึงอยู่ที่ไมโครเพลทมีการตรึงมาแล้วจากบริษัท ไม่มีแยกจำหน่าย และ Secondary antibody ที่ใช้ในชุดทดสอบเป็นการติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ใช้ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) เป็นโครโมเจนิกซับสเตรท ในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน TMB (ไม่มีสี) เป็น TMB²⁺ (สีเหลือง) บนไมโครเพลทแล้วนำไปทดสอบอ่านค่าการดูดกลืนแสง และการประยุกต์นำ detection Ab จากชุดทดสอบ ELISA ที่ติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมาทดสอบบนกระดาษนั้น สีของปฏิกิริยาที่จะสังเกตด้วยตาเปล่านั้นอาจจะจางมาก เนื่องจากความคงอยู่ของเอนไซม์ (49) ประกอบกับถ้าจะนำแอนติบอดีดังกล่าวมาติดฉลากอนุภาคทองคำก็เป็นไปได้ยากเนื่องจากแอนติบอดีที่มีในชุดทดสอบ ELISA kit ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาแล้ว และส่วนใหญ่ในแต่ละบริษัทที่มีชุดทดสอบ ELISA จำหน่ายไม่มีรายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้ในชุด kit ชัดเจนจึงเป็นการยากที่จะเลือกแอนติบอดีมาทดสอบ

การหาสถานะที่เหมาะสมของแอนติบอดีคู่ต่าง ๆ เพื่อทดสอบวิเคราะห์ปริมาณ ox-LDL ด้วยวิธี ELISA ที่หาสถานะเอง (ไม่ใช่ชุด kit แต่ซื้อแอนติบอดีแยกมาทดสอบ) ก่อนนำแอนติบอดีคู่นั้น ๆ มาทดสอบบนกระดาษเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถเปรียบเทียบวิธีการบนไมโครเพลทและกระดาษได้ แต่จะต้องหาสถานะที่เหมาะสมบนไมโครเพลทก่อน และด้วยงบประมาณในการสั่งซื้อแอนติบอดียังมีจำกัด กล่าวคือ จะต้องซื้อแอนติบอดีที่เป็น 2°Ab 2 ชนิด คือ แอนติบอดีที่ติดฉลากกับเอนไซม์เพื่อมาหาสถานะบนไมโครเพลท และชนิดที่สองเป็น unconjugated Ab ที่จะต้องนำมาติดฉลากแยกกับอนุภาคทองคำเพื่อนำไปทดสอบบนกระดาษ และอีกข้อจำกัดคือ แอนติบอดีที่จะนำมาทดสอบหรือที่สนใจนั้นไม่มีจำหน่ายหลากหลายรูปแบบ (unconjugated, conjugated)

อีกหนึ่งเหตุผลอาจเกิดจากข้อจำกัดของการสั่งซื้อแอนติบอดีและสาร std. ox-LDL ที่ทราบความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แยกซื้อคนละบริษัทไม่ได้มาจากชุดทดสอบหรือบริษัทการผลิตแหล่งเดียวกัน รวมถึงระยะเวลาในการขนส่งที่สินค้ามาไม่พร้อมกัน อาจทำให้ความคงทนของน้ำยาลดลงเนื่องจากสถานการณ์โควิดระบอบหนักในช่วงที่มีการเริ่มงานวิจัย จึงทำให้การขนส่งสินค้าล่าช้า ประกอบกับองค์กรปิดชั่วคราว ในการส่งตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ จึงดำเนินการได้ยากและล่าช้า ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดบกพร่องที่ไม่ได้ส่งตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีคู่ที่เลือกกับแอนติเจนหรือ ox-LDL ให้แน่ใจก่อนเริ่มงานวิจัย และอีกหนึ่งเหตุผลที่อาจทำให้การเกิดปฏิกิริยาไม่สำเร็จอาจเกิด

จากลักษณะของอนุภาค LDL ที่ประกอบไปด้วยอะโปโปรตีน apo B-100 เพียง 1 โมเลกุล และด้วยลักษณะที่เป็นอนุภาคกลม ดังรูป 74 จึงอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้การจับของแอนติบอดีชนิด anti apo B-100 จับไม่โดนตำแหน่งดังกล่าว รวมถึงเทคนิคการตรวจวัดบนกระดาษนี้ไม่สามารถที่จะเคาะให้ปฏิกิริยาเข้ากันได้เหมือนการเคาะเพลทของเทคนิค ELISA



รูปที่ 77 แสดงลักษณะกระดาษก่อนและหลังล้าง 2° Ab และสีของ softex หลังหยด silver enhancement

สำหรับเทคนิค silver enhancement ที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยนี้ เพื่อต้องการให้ปฏิกิริยาของสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษทดสอบชัดเจน จากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างซิลเวอร์และอนุภาคระดับนาโนนั้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ (49, 60) แต่สำหรับงานวิจัยนี้ทางผู้วิจัยเห็นว่าในการเกิดสีของปฏิกิริยานั้น เกิดสีพื้นหลังขึ้นมากทำให้ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้ ซึ่งอาจเกิดจากสีของซิลเวอร์ รบกวนการเกิดสีของปฏิกิริยา กล่าวคือ ในตัวของ working silver enhancement นั้นเมื่อได้ผสมระหว่างสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว ในสัดส่วนดังกล่าวมีการเกิดสีขึ้นเช่นกัน ประกอบกับการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นบนกระดาษขาวจึงทำให้เห็นสีพื้นหลังได้ชัดเจนกว่าสีของปฏิกิริยาจริง

การติดฉลากแอนติบอดี 2° Ab ด้วยอนุภาคทองคำจากชุด gold conjugation kit ของบริษัท Abcam นั้น ใช้ขนาด 40 นาโนเมตร ซึ่งแอนติบอดีที่นำมาติดฉลากเป็นชนิด IgG ซึ่งมี ขนาด 14 x 10 x 4 นาโนเมตร (65) หลังจากนำมาติดฉลากด้วยวิธีของชุดทดสอบแล้ว ได้ลักษณะเป็น colloidal gold ของอนุภาคทองคำที่มีแอนติบอดีอยู่ล้อมรอบ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบในงานวิจัยได้ว่า หลังจากการล้างเมื่อครบเวลาการบ่ม 2° Ab แล้วนั้น สีของกระดาษก่อนและหลังล้างมีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง กล่าวคือ ก่อนล้างทั้งเจือจางมากและเจือจางน้อย จะสังเกตเห็นสีชมพูของ gold แต่

เมื่อทำการล้างแล้ว (ล้าง 1 ครั้ง) สีของกระดาษที่ทดสอบไม่ปรากฏสีชมพูบนกระดาษขาว ดังรูป 76 จึงอาจเป็นไปได้ว่าการจับของแอนติบอดี F_{ab} ของ 2° Ab กับตำแหน่งบนอนุภาค ox-LDL อาจจับกันไม่แข็งแรงมากพอ ประกอบกับ colloidal gold ที่มีแอนติบอดีติดอยู่อาจจะหนักเกินกว่าจะยึดติดบนอนุภาค ox-LDL ได้ และเมื่อชะล้างจึงทำให้หลุดได้ง่ายมากขึ้น แม้จะเปลี่ยนมาใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ในช่วงท้าย เนื่องจากเห็นว่ามีส่วนว่างระหว่างรูกระดาษน้อยกว่าเบอร์ 1 โดยความหนาและอัตราการไหลของของเหลวระหว่างกระดาษเบอร์ 1 และเบอร์ 2 ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การทดสอบการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำจะต้องซื้อชุดทดสอบเพื่อทดสอบแอนติบอดีดังกล่าวมีราคาสูง แต่ในงานวิจัยได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อเป็นการประเมินในเบื้องต้นว่าอนุภาคทองคำมีความเข้มข้นเพียงพอหลังจากติดฉลากกับแอนติบอดี รวมถึงในการติดฉลากแอนติบอดีกับอนุภาคทองคำในงานวิจัยไม่ได้ใช้ชุดทดสอบ (purify antibody kit) สำหรับทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ก่อนติดฉลาก ซึ่งอาจทำให้แรงของการจับระหว่างแอนติบอดีและอนุภาคทองคำอาจไม่ดีพอ

กล้องถ่ายภาพที่ได้เป็นผลพวงของสถานการณ์โควิด 19 จากการรอน้ำยาและแอนติบอดีจึงได้ประดิษฐ์กล้องดังกล่าวขึ้น เพื่อหวังว่าจะเป็นต้นแบบของการพัฒนาต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจพัฒนาให้เป็นกล้องที่มีเลนส์มุมกว้าง ให้ได้เป็นเครื่องมือ point of care (POC) ที่สามารถเคลื่อนที่ ออกผลโดยพัฒนาซอฟต์แวร์ วิเคราะห์ค่าความเข้มสี และคำนวณค่าออกมาได้ มีความสามารถในการตรวจคุณภาพแสงโดยเพิ่มเครื่องมือสำหรับวัดแสง

สำหรับข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป อาจจะเริ่มจากการออกแบบหลอดทดสอบให้มีระยะกว้างขึ้นหรือในรูปแบบอื่น การพิมพ์เวกซ์ที่ใช้สำหรับสร้างขอบเขตในหลอดทดสอบอาจจะใช้สีอื่นเนื่องจากสีดำของเวกซ์ อาจรบกวนการอ่านค่าความเข้มสีที่เป็นโหมด gray scale รวมถึงการติดฉลากแอนติบอดีอาจจะเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ที่ติดมาแล้วจากบริษัทแล้วใช้ BCIP/NBT เป็นซับสเตรทในการทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสาร

1.1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH8 (สำหรับละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์):

ชั่ง 3.346 กรัม ของไดเบสิกโพรแตสเซียมฟอสเฟต และ 0.1046 กรัม ของโมนอบีสิกโพรแตสเซียมฟอสเฟต ละลายในน้ำ milliQ 200 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง 18.852 มิลลิกรัม ของโซเดียมไฮยาโนโบโรไฮไดรด์ ละลายกับ 300 ไมโครลิตร ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH8

1.3 การเตรียม 1x ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ละลาย 1 เม็ด ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียม Phosphate buffer saline tween ที่ 0.05%

0.05% PBST: 1x ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร แล้วเติม 15 ไมโครลิตร ของ Tween 20

1.5 การเตรียมสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4

ชั่งโซเดียมซีเตรตไดไฮเดรทไตรเบสิก 297.864 มิลลิกรัม และ 381.8 มิลลิกรัม ของซีตริกแอซิดโมนไฮเดรท ในน้ำ 300 มิลลิลิตร

1.6 การเตรียม Silver enhancement (สารละลายเข้มข้น)

- สารละลาย A: 0.3% ซิลเวอร์ไนเตรต ชั่ง 3 มิลลิกรัม ของซิลเวอร์ไนเตรต ละลายในน้ำ milliQ 1 มิลลิลิตร

- สารละลาย B: 3% ไฮโดรควิโนน ชั่ง 30 มิลลิกรัม ของไฮโดรควิโนน ละลายในซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร (0.01, 0.1 และ 0.5 โมลาร์)

1.7 การเตรียม น้ำยา blocking

- 4% skim milk: ชั่ง 200 มิลลิกรัม ของ skim milk ละลายใน 0.05% PBST 5 มิลลิลิตร
- 5% skim milk: ชั่ง 250 มิลลิกรัม ของ skim milk ละลายใน 0.05% PBST 5 มิลลิลิตร
- 6% skim milk: ชั่ง 300 มิลลิกรัม ของ skim milk ละลายใน 0.05% PBST 5 มิลลิลิตร
- 3% BSA: ชั่ง 150 มิลลิกรัม ของ skim milk ละลายใน 0.05% PBST 5 มิลลิลิตร
- 5% BSA: ชั่ง 250 มิลลิกรัม ของ skim milk ละลายใน 0.05% PBST 5 มิลลิลิตร

1.8 การเตรียม น้ำยา Bradford

ผสมสี Dry reagent 1.5 มิลลิลิตร กับน้ำ Deionized water (DDI) 6 มิลลิลิตร (สัดส่วน 1:5) นำมากรอง

2. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

- สารละลาย NaIO_4 : สารละลายโซเดียมเพอร์ริออเดท
- สารละลาย LiCl : สารละลายลิเทียมคลอไรด์
- $\mu\text{g/mL}$: ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- mg/mL : มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- สารละลาย NaBH_3CN : สารละลายไซยาโนโบโรไฮไดรด์
- 1° Ab : แอนติบอดีชนิดปฐมภูมิ
- 2° Ab : แอนติบอดีชนิดทุติยภูมิ
- gold conjugated Ab: แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ
- std. ox-LDL: สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ของออกซิไดซ์ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารคอปเปอร์ซัลเฟต
- LDL: อนุภาคไลโปโปรตีน ชนิดความหนาแน่นต่ำ
- Ox-LDL: ออกซิไดซ์ไลโปโปรตีน ชนิดความหนาแน่นต่ำ

ภาคผนวก ข วิธีการดำเนินการวิจัยอื่น ๆ

1. การทดสอบหาวิธีการซึบสารน้ำบนกระดาษ

เพื่อทดลองหาวิธีการอื่น นอกเหนือจากการใช้สำลีก้านในการซึบน้ำส่วนเกินภายหลังจากการหยดล้างน้ำของปฏิกิริยาแต่ละวง เนื่องจากการใช้สำลีก้านในการซึบน้ำส่วนเกินค่อนข้างใช้เวลามาก และอาจจะทำให้เกิดการกระทุ้งกระดาษรองขณะซึบน้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกหาวิธีการอื่นเพื่อหาแนวทางในการลดระยะเวลาในขั้นตอนดังกล่าว โดยใช้ผ้าก๊อชขนาด 4x4 นิ้ว พับทบ 2 ชั้นวางบนกล่องทิปเปล่า เปรียบเทียบกับการใช้แผ่นซับชนิดมีเจล มี 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1: ทดลองหยดสี 3 สี ได้แก่ สีเขียวของสี light green สีส้มแดงของสี 1% eosin และสีน้ำเงินของสี aniline blue หยดอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงบนพื้นที่แต่ละวงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่สร้างขึ้น ตามรูป จากนั้นนำกระดาษดังกล่าวไปวางบนผ้าก๊อชพับทบ 2 ชั้น ที่วางอยู่บนกล่องทิปเปล่า ทำการหยดล้างน้ำด้วยน้ำ milliQ จำนวน 10 ไมโครลิตร ในแต่ละวง 3 ครั้ง

จากการผลทดลองพบว่าการใช้ผ้าก๊อชเพื่อซึบน้ำส่วนเกินภายหลังจากการหยดล้าง ทำให้สีแต่ละวงเข้ามาปนเปื้อนวงด้านข้างอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 78

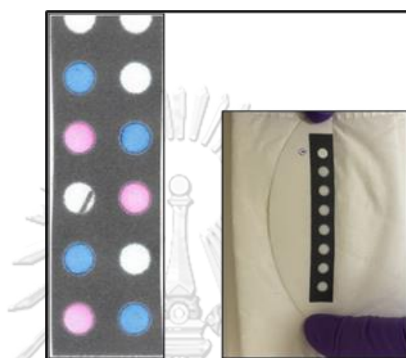


รูปที่ 78 แสดงลักษณะการทดลองก่อนและหลังการหยดล้างบนผ้าก๊อช

การทดลองที่ 2: ทดลองหยดสี 3 สี ได้แก่ สีเขียวของสี light green สีส้มแดงของสี 1% eosin และสีน้ำเงินของสี aniline blue หยดอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงบนพื้นที่แต่ละวงบนอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่สร้างขึ้น ตามรูป จากนั้นนำกระดาษรองดังกล่าวไปวางบนแผ่นรองซับ

ชนิดมีเจล หยดล้างแต่ละวงด้วยน้ำ milliQ 10 ไมโครลิตร 3 ครั้ง โดยไม่ขยับกระดาษขณะหยดล้าง น้ำและเมื่อหยดครบทุกวงแล้ว ค่อย ๆ ขรีงกระดาษให้แนบกับแผ่นรองซับ

จากผลการทดลองหยดสี 3 สีบนหลุมทดสอบพบว่าภายหลังจากการล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง บนแผ่นรองซับชนิดมีเจล สีที่ใช้ในแต่ละวงทดสอบไม่ซึมข้ามวงและวิธีการซับขณะหยดล้างไม่ยุ่งยาก รูปที่ 79 สามารถลดระยะเวลาในขั้นตอนการหยดล้างได้มาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการนี้เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย

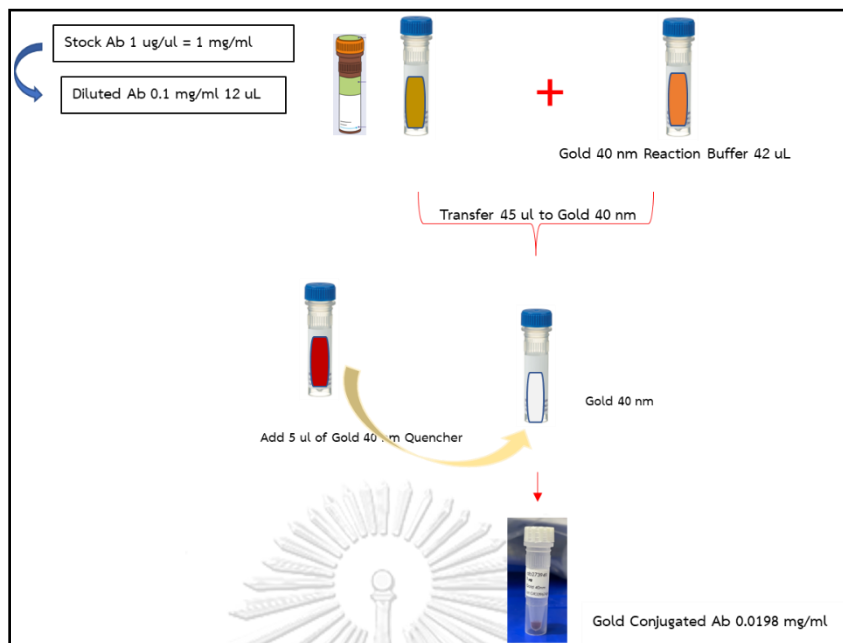


รูปที่ 79 แสดงลักษณะการทดลองก่อนและหลังการหยดล้างบนแผ่นรองซับชนิดมีเจล

2. การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำ

2.1 วิธีการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำ

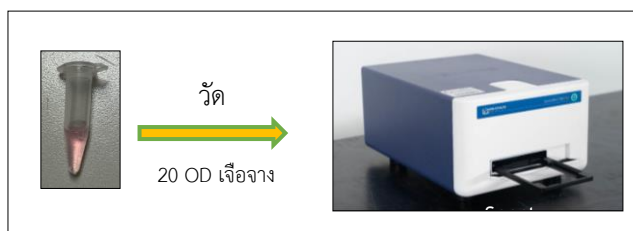
ติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำจากชุด Gold conjugation kit ของ Abcam ทำโดยการเจือจางแอนติบอดีด้วยตัวเจือจางที่มากับชุดทดสอบ ให้ได้ความเข้มข้นแอนติบอดีเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เจือจาง 10 เท่า) ในที่นี้ไปเปิด 2 ไมโครลิตร ของ anti-Apo B Ab (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงในตัวเจือจาง 18 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดแอนติบอดีที่ถูกเจือจางมา 12 ไมโครลิตร เพื่อมาผสมกับ 42 ไมโครลิตร ของ Gold 40 นาโนเมตร reaction buffer ผสมให้เข้ากัน โดยการดูดขึ้นลงแล้วค่อยดูด 45 ไมโครลิตร ของสารเจือจางดังกล่าวไปละลายอนุภาคทองคำ (gold 40 นาโนเมตร) ค่อย ๆ ดูดขึ้นลงจนอนุภาคทองคำละลาย ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วจึงเติม 5 ไมโครลิตร ของ quencher แล้วจึงค่อย ๆ ดูดขึ้นลงทิ้งไว้ 5 นาที ก็จะได้ gold conjugated anti-Apo B ที่ความเข้มข้นประมาณ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 80



รูปที่ 80 แสดงขั้นตอนโดยย่อของการติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทองคำ

2.2 การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ gold conjugated anti-apo B Ab

เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาสีของปฏิกิริยายังคงจางมากเห็นผลไม่ชัดเจน ผู้วิจัยจึงได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ gold conjugated anti-apo B Ab ตามฉลากที่มาพร้อมกับชุดทดสอบ เพื่อให้แน่ใจว่าความเข้มข้นของอนุภาคทองคำมีเพียงพอ เนื่องจากชุดทดสอบ เป็นแบบ 20 OD ดังนั้นก่อนที่จะนำแอนติบอดีที่ถูกติดฉลากกับอนุภาคทองคำไปวัดนั้นต้องทำการเจือจาง 20 เท่า เพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 1 OD ตามฉลากที่แนบมา โดยการนำไปเจือจาง 1:20 กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทั้งหมด 100 ไมโครลิตร ไปเปตลงในภาดหลุม และไปเปต 100 ไมโครลิตร ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นหลุมควบคุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง SpectraMax รุ่น ABS Plus ซึ่งค่าของการดูดกลืนแสงที่ควรจะได้ควรประมาณ 1 AU (absorbent unit) ที่ความยาว 1 เซนติเมตร ของระยะความหนาที่แสงส่องผ่านคิวเวท โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เป็นค่าที่เทียบเท่ากับการวัดด้วยคิวเวท จากคุณสมบัติของเครื่อง SpectraMax ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.431 เมื่อลบด้วยค่าหลุมควบคุม จึงได้ว่าความเข้มข้นของอนุภาคทองคำหลังจากถูกติดฉลากกับแอนติบอดีมีความเข้มข้นเพียงพอ ตามที่ฉลากได้กำหนดไว้ (รูปที่ 81)

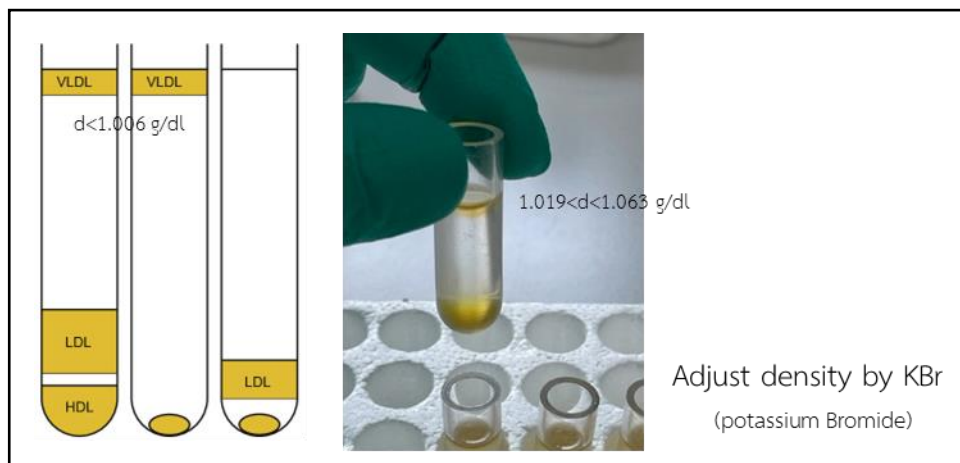


รูปที่ 81 แสดงวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง SpectraMax รุ่น ABS Plus

3. การแยกอนุภาคไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL)

วิธีการ:

1. ปั่นแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงที่ 3,000 rpm นาน 10 นาที โดยปกติซีรัมจะมีค่าถ่วงจำเพาะที่ 1.006 กรัม/มิลลิลิตร นำมาปรับให้ได้ค่าถ่วงจำเพาะเป็น 1.019 กรัม/มิลลิลิตร ด้วยโปรแทสเซียมโบรไมด์
2. นำซีรัมที่ได้จากข้อ 1 ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง Hitachi ultracentrifuge รุ่น CS 150GXL ที่ความเร็ว 100,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ใช้พลาสติกไปเปิดดูเอาส่วน VLDL ที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง
4. นำตัวอย่างที่เหลือมาปรับให้ได้ค่าถ่วงจำเพาะเป็น 1.063 กรัม/มิลลิลิตร ด้วยโปรแทสเซียมโบรไมด์ เข้มข้น 1.063 กรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง Hitachi ultracentrifuge รุ่น CS 150GXL ที่ความเร็ว 130,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
5. ใช้พลาสติกไปเปิดดูเอาส่วน LDL ที่อยู่ด้านบนเก็บใส่หลอดที่สะอาด
6. ล้างส่วนเกินของสารละลายโปรแทสเซียมโบรไมด์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
7. นำ LDL ที่ได้ไปวัดโปรตีน โดยใช้น้ำยา Bradford ในสัดส่วน ตัวอย่าง : working Bradford reagent ที่ 10 ไมโครลิตร : 20 ไมโครลิตร ไปเปิดขึ้นลงให้เข้ากันใน 96 หลุมไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 5 นาที (ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง) นำไปวัด OD ที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณหาค่าโปรตีนที่ได้
8. เมื่อได้ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างแล้ว ออกซิไดซ์ LDL ด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ที่ 5 ไมโครโมลาร์ ต่อ โปรตีน 50 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 15, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาช่วงดังกล่าว หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย EDTA เก็บตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส



รูปที่ 82 แสดงขั้นตอนการแยกอนุภาคไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL)



ภาคผนวก ค
เอกสารที่เกี่ยวข้อง



คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 อาคารจามจุรี 1 ชั้น 2 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์: 02-218-3202, 02-218-3049 Email: eccu@chula.ac.th

COA No. 139/66

ใบรับรองโครงการวิจัย

ยกเว้นการพิจารณาประเด็นทางจริยธรรมการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 650090 : การพัฒนาวิธีการตรวจออกซิโคซีโลไฟโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ โดยใช้
เทคนิคการตรวจวัดบนฐานกระดาษร่วมกับ Immunogold Silver
Enhancement

ผู้วิจัยหลัก : นางสาว สุจิตรา ต๊ะยามัน

หน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการยกเว้นการทบทวนจริยธรรมการวิจัยโดยใช้หลักของ Office for Human Research
Protections (OHRP Exempt Categories) 45 CFR part 46.101 (b)

โดยมีเงื่อนไขว่าผู้วิจัยดำเนินการวิจัยอย่างเคร่งครัดตามที่ปรากฏในโครงการวิจัยฉบับที่ส่งให้คณะกรรมการ
พิจารณา หากมีการเปลี่ยนแปลงต้องแจ้งคณะกรรมการฯ ก่อนมีการดำเนินการวิจัยต่อไป

ลงนาม

(รองศาสตราจารย์ นพ. ปวีตา ทิตนประดิษฐ์)

ประธาน

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ระวีพันธ์ มิ่งศักดิ์)

กรรมการและเลขานุการ

วันที่รับรอง : 27 มิถุนายน 2566

หมายเหตุ

โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่งแบบรายงานสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 01-15) และขอคืนข้อมูลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยสิ้นสุด
สำหรับโครงการวิจัยที่เป็นวิชาเฉพาะมีข้อบ่งชี้ขอผลการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยสิ้นสุด



Digital Certificate

เลขที่โครงการวิจัย 650090
วันที่รับรอง 27 มิ.ย. 2566
วันที่หมดอายุ 26 มิ.ย. 2567

บรรณานุกรม

1. World Health Organization. Cardiovascular Disease [cited 2021 Feb 13]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
2. กระทรวงสาธารณสุข กรมควบคุมโรค. สถานการณ์โรคหลอดเลือดหัวใจ Coronary Artery Disease (CDA) 2561 [cited 2021 Feb 13]. Available from: <https://ddc.moph.go.th/uploads/files/1081120191227084415.pdf>.
3. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-62.
4. Liu Q, Liu Y, Shi J, Gao M, Liu Y, Cong Y, et al. Entire Peroxidation Reaction System of Myeloperoxidase Correlates with Progressive Low-Density Lipoprotein Modifications via Reactive Aldehydes in Atherosclerotic Patients with Hypertension. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(4):1245-54.
5. Itabe H, Obama T, Kato R. The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. *Journal of lipids*. 2011;2011:418313.
6. Gillotte KL, Hörkkö S, Witztum JL, Steinberg D. Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res*. 2000;41(5):824-33.
7. Ali W, Kushwaha U, Wamique Azmi M, Vishwakarma P, Tasleem M, Khan M, et al. Oxidized LDL as A Biomarker in Metabolic Syndrome. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2017;08.
8. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2006;8(1):55-61.
9. Itabe H, Ueda M. Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications. *J Atheroscler Thromb*. 2007;14(1):1-11.
10. Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Tsujioka K, Kajiya F. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis*. 2007;194(2):e9-17.
11. Ahotupa M, Asankari TJ. Baseline diene conjugation in LDL lipids: an indicator of

circulating oxidized LDL. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11-12):1141-50.

12. Miyazaki T, Shimada K, Sato O, Kotani K, Kume A, Sumiyoshi K, et al. Circulating malondialdehyde-modified LDL and atherogenic lipoprotein profiles measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2005;179(1):139-45.

13. Ohmori R, Momiyama Y, Tanaka N, Kato R, Taniguchi H, Nakamura H, et al. LDL fractions assessed by anion-exchange high-performance liquid chromatography in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2006;187(1):213-4.

14. Chakraborty S, Cai Y, Tarr MA. Mapping oxidations of apolipoprotein B-100 in human low-density lipoprotein by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2010;404(2):109-17.

15. Sriporote P, Khaokhiew T, Promptmas C. Piezoelectric-based Immunosensor for Oxidized Low Density Lipoprotein Determination 2012.

16. Cheng C-M, Martinez AW, Gong J, Mace CR, Phillips ST, Carrilho E, et al. Paper-Based ELISA. *Angewandte Chemie International Edition.* 2010;49(28):4771-4.

17. Khan MS, Thouas G, Shen W, Whyte G, Garnier G. Paper Diagnostic for Instantaneous Blood Typing. *Analytical Chemistry.* 2010;82(10):4158-64.

18. Hui Q, Pan Y, Yang Z. Paper-based devices for rapid diagnostics and testing sewage for early warning of COVID-19 outbreak. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.* 2020;2:100064.

19. Murdock RC, Gallegos KM, Hagen JA, Kelley-Loughnane N, Weiss AA, Papautsky I. Development of a point-of-care diagnostic for influenza detection with antiviral treatment effectiveness indication. *Lab Chip.* 2017;17(2):332-40.

20. Hossain SM, Ozimok C, Sicard C, Aguirre SD, Ali MM, Li Y, et al. Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(6):1567-76.

21. Hsu C-K, Huang H-Y, Chen W-R, Nishie W, Ujiie H, Natsuga K, et al. Paper-Based ELISA for the Detection of Autoimmune Antibodies in Body Fluid-The Case of Bullous Pemphigoid. *Analytical chemistry.* 2014;86.

22. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion DfHDaSP, CDC. Coronary Artery Disease (CAD) [updated Dec 9, 2019; cited 2021 Feb 4]. Available

from: https://www.cdc.gov/heartdisease/coronary_ad.htm.

23. National Heart L, and Blood Institute, NIH. Coronary Heart Disease [cited 2021 Feb 4]. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/coronary-heart-disease>.

24. National Cholesterol Education Program NH, Lung and Blood Institute, NIH. Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) May 2001 [cited 2021 Feb 7]. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/resources/heart/atp-3-cholesterol-full-report.pdf>.

25. Garg A. What is the role of alternative biomarkers for coronary heart disease? *Clinical Endocrinology*. 2011;75(3):289-93.

26. ปิยมหาราชการุณย์. บทความสุขภาพ หลอดเลือดหัวใจตีบ ภัยใกล้ตัว [updated 2020 Dec 8 cited 2021 Mar 15]. Available from: <https://www.siphhospital.com/th/news/article/share/850/Coronaryheartdisease>.

27. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Boston: Butterworths

Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.; 1990.

28. Chavez-Sanchez L, Chavez-Rueda K, Legorreta V, Montoya-Daaz E, Blanco-Favela F. The Innate Immune Response Mediated by TLRs in Atherosclerosis. 2012.

29. Steinbrecher UP, Zhang H, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990;9(2):155-68.

30. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320(14):915-24.

31. E. Leiva SW, L. Guzmán and R. Orrego. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. September 17th 2015.

32. Friedman P, Hörkkö S, Steinberg D, Witztum JL, Dennis EA. Correlation of Antiphospholipid Antibody Recognition with the Structure of Synthetic Oxidized Phospholipids: IMPORTANCE OF SCHIFF BASE FORMATION AND ALDOL CONDENSATION*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(9):7010-20.

33. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 2010;610:403-17.

34. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*. 1990;343(6258):531-5.
35. Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: From atherosclerosis to periodontitis. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2012;51:1-8.
36. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(5):844-8.
37. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2243-7.
38. Hörkkö S, Bird DA, Miller E, Itabe H, Leitinger N, Subbanagounder G, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(1):117-28.
39. Shaw PX, Hörkkö S, Chang M-K, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(12):1731-40.
40. Frostegård J, Svenungsson E, Wu R, Gunnarsson I, Lundberg IE, Klareskog L, et al. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(1):192-200.
41. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*. 2010;82(1):3-10.
42. Pelton R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009;28(8):925-42.
43. Martinez AW, Phillips ST, Wiley BJ, Gupta M, Whitesides GM. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab Chip*. 2008;8(12):2146-50.

44. Abe K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. *Analytical chemistry*. 2008;80:6928-34.
45. Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-Cost Printing of Poly(dimethylsiloxane) Barriers To Define Microchannels in Paper. *Analytical Chemistry*. 2008;80(9):3387-92.
46. Wang S, Ge L, Song X, Yu J, Ge S, Huang J, et al. Paper-based chemiluminescence ELISA: lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing. *Biosens Bioelectron*. 2012;31(1):212-8.
47. Pang B, Zhao C, Li L, Song X, Xu K, Wang J, et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157:H7 detection. *Anal Biochem*. 2018;542:58-62.
48. Manmana Y, Chutvirasakul B, Suntornsuk L, Nuchtavorn N. Cost effective paper-based colorimetric devices for a simple assay of dopamine in pharmaceutical formulations using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – silver nitrate as a chromogenic reagent. *Pharmaceutical Sciences Asia*. 2019;46:270-7.
49. Murdock RC, Shen L, Griffin DK, Kelley-Loughnane N, Papautsky I, Hagen JA. Optimization of a Paper-Based ELISA for a Human Performance Biomarker. *Analytical Chemistry*. 2013;85(23):11634-42.
50. Rocks BF, Bertram VMR, Bailey MP. Detection of Antibodies to the Human Immunodeficiency Virus by a Silver-Enhanced Gold-Labelled Immunosorbent Assay. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1990;27(2):114-20.
51. Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*. 2002;295(5559):1503-6.
52. Li ZP, Liu CH, Fan YS, Wang YC, Duan XR. A chemiluminescent metalloimmunoassay based on silver deposition on colloidal gold labels. *Anal Biochem*. 2006;359(2):247-52.
53. Yeh C-H, Hung C-Y, Chang TC, Lin H-P, Lin Y-C. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009;6(1):85-91.
54. Page Faulk W, Malcolm Taylor G. Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*.

1971;8(11):1081-3.

55. Lackie PM. Immunogold silver staining for light microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*. 1996;106(1):9-17.

56. Patel N, Rocks BF, Bailey MP. A silver enhanced, gold labelled, immunosorbent assay for detecting antibodies to *Rubella* virus. *J Clin Pathol*. 1991;44(4):334-8.

57. Liu R, Zhang Y, Zhang S, Qiu W, Gao Y. Silver Enhancement of Gold Nanoparticles for Biosensing: From Qualitative to Quantitative. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2014;49:121-38.

58. Danscher G, Stoltenberg M. Autometallography (AMG) - Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2006;41:57-139.

59. Hainfeld JF, Powell RD. New frontiers in gold labeling. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(4):471-80.

60. Panferov V, Safenkova I, Byzova N, Varitsev Y, Zherdev A, Dzantiev B. Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus. *Food and Agricultural Immunology*. 2017;29:1-13.

61. Tsimikas S, Aikawa M, Miller FJ, Jr., Miller ER, Torzewski M, Lentz SR, et al. Increased plasma oxidized phospholipid:apolipoprotein B-100 ratio with concomitant depletion of oxidized phospholipids from atherosclerotic lesions after dietary lipid-lowering: a potential biomarker of early atherosclerosis regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):175-81.

62. Wang S, Ge L, Song X, Yan M, Ge S, Yu J, et al. Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay. *The Analyst*. 2012;137:3821-7.

63. Zhu X, Xiong S, Zhang J, Zhang X, Tong X, Kong S. Improving paper-based ELISA performance through covalent immobilization of antibodies. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;255:598-604.

64. Sirvio J, Hyvakkö U, Liimatainen H, Niinimäki J, Hormi O. Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators.

Carbohydrate Polymers. 2011;83(3):1293-7.

65. Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*. 2017;12(2):02d301.
66. Lu B, Smyth MR, O'Kennedy R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*. 1996;121(3):29R-32R.
67. Zhao Z-P, Li J, Zhang D-X, Chen C-X. Nanofiltration membrane prepared from polyacrylonitrile ultrafiltration membrane by low-temperature plasma: I. Graft of acrylic acid in gas. *Journal of Membrane Science*. 2004;232(1):1-8.
68. Stoleru E, Baican M, Coroaba A, Hitruc E, Lungu M, Vasile C. Plasma-activated fibrinogen coatings onto poly(vinylidene fluoride) surface for improving biocompatibility with tissues. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2015;31.
69. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2023, MDText.com, Inc.; 2000.
70. Stocker R. Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5(6):422-33.
71. Steinbrecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem*. 1987;262(8):3603-8.
72. Orsó E, Grandl M, Schmitz G. Oxidized LDL-induced endolysosomal phospholipidosis and enzymatically modified LDL-induced foam cell formation determine specific lipid species modulation in human macrophages. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(6):479-87.
73. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:152786.
74. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low

density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(9):2995-8.

75. Zingg J-M, Vlad A, Ricciarelli R. Oxidized LDLs as Signaling Molecules. *Antioxidants* [Internet]. 2021; 10(8).
76. Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(2):128-37.
77. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(1):39-75.
78. Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E, Luijtens K, Arnout J, et al. Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost*. 1996;76(5):663-9.
79. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, et al. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res*. 1996;37(1):45-53.
80. Palinski W, Hörkö S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, et al. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J Clin Invest*. 1996;98(3):800-14.
81. Holvoet P, Zhao Z, Deridder E, Dhoest A, Collen D. Effects of deletion of the carboxyl-terminal domain of ApoA-I or of its substitution with helices of ApoA-II on in vitro and in vivo lipoprotein association. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19395-401.
82. Gleisner A, Martinez L, Pino R, Rojas IG, Martinez A, Asenjo S, et al. Oxidative stress markers in plasma and urine of prepubertal patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006;19(8):995-1000.
83. Holvoet P, Macy E, Landeloos M, Jones D, Jenny NS, Van de Werf F, et al. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of circulating oxidized LDL. *Clin Chem*. 2006;52(4):760-4.
84. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, Patel R, Pattison J, Miller E, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(3):360-70.

85. Binder CJ, Hörkkö S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med.* 2003;9(6):736-43.
86. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2006;8(1):55-61.
87. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992;13(4):341-90.
88. Palinski W, Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, et al. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis.* 1990;10(3):325-35.
89. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine.* 1991;11(1):81-128.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว สุจิตรา ต๊ะยามัน
วัน เดือน ปี เกิด	18 ตุลาคม 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เข้าศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	ปัจจุบันทำงานในตำแหน่ง Medical Research Technologist and Histotechnologist สถานที่ทำงาน ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก แผนก สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายสหรัฐ (AFRIMS) 109 เพชรจินดาแมนชั่น ซอยราชวิถี 7 (วัดนโยธิน) ถนนรางน้ำ แขวงทุ่ง พญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
ผลงานตีพิมพ์	1. Imerbsin, Rawiwan; Chumpolkulwong, Kesara; Hanrujirakomjohn, Alongkorn; Saithasao, Mana; Sirivisoot, Sirintra; Tayamun, Sujitra; Inamnuay, Laksanee; and Lombardini, Eric D. (2014) "Seminal Vesicle Carcinoma-In-Situ in An Adult Rhesus Macaque: A Case Report and Review of The Literature," The Thai Journal of Veterinary Medicine: Vol. 44: Iss. 3, Article 12. 2. Roberts BM, Chumpolkulwong K, Tayamun S, Inamnuay L, Rungsipipat A, Lombardini ED. Mammary carcinoma in a male rhesus macaque (Macaca mulatta): histopathology and immunohistochemistry of ductal carcinoma in situ. J Med Primatol. 2014;43(3):213-6. 3. Hsu DC, Wegner MD, Sunyakumthorn P, Silsorn D, Tayamun S, Inthawong D, et al. CD4+ Cell infiltration into subcutaneous adipose tissue is not indicative of productively infected cells

during acute SHIV infection. *Journal of Medical Primatology*. 2017;46(4):154-7.

Presentations: Sujitra Tayamun, Manutsanun Sumonwiriya, Noppon Popruk, Rawiwan Im-erbsin, Kesara Chumpolkulwong, Matthew D. Wegner, Luis A. Lugo-Roman, Piyanate Sunyakumthorn, Nam-Hyuk Cho: Clinical characterization of *Orientia tsutsugamushi* Gilliam strain in rhesus macaques (*Macaca mulatta*)

นำเสนอที่งาน:

1. 30th Meeting of the American Society for Rickettsiology: Rickettsial Diseases at the Vector-Pathogen Interface 8-11 June 2019, Hotel Eldorado Spa&Resort, Santa Fe, New Mexico, USA
2. The 13th TALAS International Symposium (Advanced IACUC Training, Global Trends of Animal Welfare and Current IACUC Issues) 26th - 28th June 2019, Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand