เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(2): 79-88. DOI: 10.14456/cmvj.2016.X

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความปริทัศน์

ศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อการวินิจฉัยและป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

ปองพล พงไธสงค์

หน่วยวิจัยสุขภาพเต้านมและน้ำนมคุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ โปรตีนที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียรวมถึงเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโค เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้ามาที่เต้านม โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียจะทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อทั้งทางตรงด้วยการทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียฉีกขาดเสียหายด้วยกลไกต่างๆขึ้นกับชนิดของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียหรืออาจผ่านการทำงานทางอ้อมสนับสนุนขบวนการของระบบภูมิคุ้มกัน ข้อมูลที่ได้จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการกระตุ้นจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกันส่งผลต่อการรับรู้จากเซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่ต่างกันไปด้วย นอกจากนี้งานวิจัยจำนวนมากยังชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนและความรุนแรงของโรคเต้านมอักเสบ ดังนั้นบทความปริทัศน์นี้จึงเขียนขึ้นเพื่อนำเสนอผลงานวิจัยใหม่ที่แสดงถึงศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อการวินิจฉัยและการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม ข้อมูลของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวอาจช่วยพัฒนาแนวทางสำคัญในการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันโรคเต้านมอักเสบในอนาคตและท้ายสุดคือช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

คำสำคัญ แบคทีเรีย สุขภาพเต้านม ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โคนม

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** ปองพล พงไธสงค์ หน่วยวิจัยสุขภาพเต้านมและน้ำนมคุณภาพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม 44000 โทรศัพท์ 043-742823 โทรสาร043-742823 อีเมล์: pongphol.p@msu.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 25 มีนาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 15 พฤษภาคม พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 22 พฤษภาคม พ.ศ.2560*

Review article

The potential of antibacterial proteins for diagnosis and prevention of bovine mastitis

Pongphol Pongthaisong

Udder Health and Milk Quality Research Unit,

Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Talad, Muang, Mahasarakham 44000

Abstract Antibacterial proteins are the proteins that able to act against bacteria and bovine mastitis pathogens. While the bacteria are invading in mammary gland, antibacterial proteins will eliminate in direct or indirect actions. Firstly, they kill by being the causes of the bacterial cell wall rupture via various mechanisms. Secondly, indirect kill by facilitate the host immune responses. According to literature review, it is indicated that different structural cell wall of the bacteria stimulate different responses of mammary gland including mammary epithelium and white blood cell recognition. This difference resulted in divergent antibacterial protein expression. In addition, several reports showed the relationship of the antibacterial protein amount and the severity of bovine mastitis. Therefore, this review proposes recent evidences indicating the potential of antibacterial proteins for diagnosis and prevention of bovine mastitis. Knowledge about these proteins may be important in developing effective diagnostic approaches and lead to the further mastitis prevention, and finally reduced antibiotic usage.

Keywords: bacteria, udder health, non-specific immunity, dairy cattle

*** Corresponding author**: Pongphol Pongthaisong, Udder health and milk quality research unit, Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Nakhonsawan road, Talad, Muang, Mahasarakham, 44000, Tel. 043-742823, Fax. 043-742823, E-mail: pongphol.p@msu.ac.th

Article history; *received manuscript: 25 March 2017, accepted manuscript: 15 May 2017, published online: 22 May 2017*

บทนำ

โรคเต้านมอักเสบเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งในวงการการเลี้ยงโคนมทั่วโลก ในประเทศสหรัฐอเมริกาในฐานะประเทศชั้นนำด้านการผลิตน้ำนมดิบมีรายงานความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรคเต้านมอักเสบสูงถึง 2,000 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี ซึ่งความสูญเสียที่มากมายนี้ประมาณร้อยละ 54.9 เป็นผลมาจากเนื้อเยื่อเต้านมเสียหายจากการถูกเชื้อแบคทีเรียทำลายทำให้ความสามารถในการผลิตน้ำนมลดลง (Guimaraes et al., 2017) นอกจากนี้ความสูญเสียทางเศรษฐกิจยังรวมถึงค่าใช้จ่ายจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติที่ใช้ในการแก้ปัญหาโรคเต้านมอักเสบ การใช้ยาปฏิชีวนะยังอาจส่งผลสืบเนื่องให้เกิดปัญหายาตกค้างในน้ำนมและปัญหาเชื้อดื้อยาได้ในภายหลัง ทั้งนี้ Leelahapongsathon et al. (2014) ได้รายงานทางระบาดวิทยาของของโรคเต้านมอักเสบในประเทศไทยว่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบที่เป็นปัญหาหลัก ได้แก่กลุ่ม Streptoccocci (16.7%), *Streptococcus uberis* (9.4%), *Streptococcus agalactiae* (7.1%) และ *Streptococcus* dysgalactiae (4.0%) ซึ่งเชื้อชนิด *Streptococcus uberis* เริ่มมีความดื้อยาปฏิชีวนะ (Suriyasathaporn, 2011) ดังนั้นจึงควรมีแนวทางอื่นๆ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น การใช้สารเคมีเคลือบปลายเต้านม การใช้วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ และการเพิ่มศักยภาพของกลไกการป้องกันการติดเชื้อภายในเต้านมเอง

กลไกการป้องกันการติดเชื้อภายในเต้านมนอกเหนือจากการใช้โครงสร้างทางกายภาพเป็นด่านป้องกันการติดเชื้อ เช่น กล้ามเนื้อหูรูดของหัวนม (teat sphincter) และ คลองหัวนม (teat canal) ภายในเต้านมยังสามารถหลั่งสารโปรตีนซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อที่รุกรานเข้าสู่เต้านม โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เหล่านี้ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อที่บุกรุกเข้ามาตามพื้นผิวเยื่อบุเนื้อเยื่อเต้านมซึ่งการทำงานของ มีทั้งการกำจัดเชื้อโดยตรง และการกำจัดเชื้อให้หมดไปทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Hancock and Sahl, 2006) การศึกษาการตอบสนองของเต้านมต่อการเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ของเชื้อ *E.coli* โดย Boehmer et al. (2008) พบการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันกลุ่ม transthyretin และ complement C3 precursor อีกทั้งยังได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า พบโปรตีน acute phase protein **α**-1-acid glycoprotein อีกทั้งพบการแสดงออกของโปรตีนที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น cathelicidin, indolicidin, bactenectin, **α**-2-HS-glycoprotein, S100A12 และ **α**-1-antiproteinase เป็นต้น เมื่อมีเชื้อจุลชีพบุกรุกเข้าไปในเต้านม การตอบสนองของเต้านมจะเกิดขึ้นเห็นได้จากการเพิ่มปริมาณโซมาติกเซลล์ (Somatic cell count; SCC) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ร่างกายสร้างขึ้นมาและส่งมายังเต้านมเพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพที่บุกรุก ปริมาณโซมาติกเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในน้ำนมเป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อในเต้านมจึงเป็นประโยชน์ในการประเมินสุขภาพเต้านมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการนอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ยังพบการตอบสนองในระดับโปรตีนโดยพบมีโปรตีนในน้ำนม (milk proteins) อยู่หลายชนิด

แม้ว่าภายในเต้านมมีการสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ยังคงพบว่าโอกาสในการเกิดเต้านมอักเสบในโคนมมีแตกต่างกันไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคนมอาจมีคุณสมบัติด้านความไวในการเกิดโรค (susceptibility) หรือ ความต้านทานโรค (resistance) ได้แตกต่างกัน คุณสมบัติดังกล่าวนี้อาจสัมพันธ์กับกลไกการตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่มีอยู่ในเต้านม (Hogarth et al., 2004, Smolenski et al., 2007) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ภายในเต้านมจึงอาจเป็นจุดเริ่มต้นของแนวทางการควบคุมโรคเต้านมอักเสบแบบไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ และโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่พบอาจมีประโยชน์ในแง่เครื่องมือช่วยวินิจฉัยการเกิด

เต้านมอักเสบได้ (Almeida et al., 2015) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของบทความฉบับนี้ จึงเป็นการเพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่โคสร้างขึ้นเพื่อการวินิจฉัยและการป้องกันโรคเต้านมอักเสบในโคนม

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากร่างกายสิ่งมีชีวิตเพื่อทำหน้าที่ในการปกป้องตัวมันเองจากการบุกรุกของเชื้อจุลชีพที่จะเข้ามาก่ออันตราย และเนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นในการกำจัดเชื้อจุลชีพจึงอาจเรียกโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial proteins /peptides) แหล่งสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีอยู่ 2 แหล่งคือ 1) เซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจ 2) เซลล์เยื่อบุต่างๆ ที่มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อที่บุกรุกเข้ามาในเต้านมโค เซลล์เยื่อบุในส่วนต่างๆของโครงสร้างเต้านม รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มายังเต้านมเป็นแหล่งสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน ซึ่งในน้ำนมโคพบโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดและสามารถจำแนกกลุ่มของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียตามรูปแบบการทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อจุลชีพตาม Sima et al. (2003) เป็น 3 กลุ่มดังนี้ เช่น 1) กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) 2) กลุ่มที่แย่งจับกับธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น แลคโตเฟอริน (lactoferrin) 3) กลุ่มที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเสียสภาพไป เช่น defensin, cathelicidin เป็นต้น ทั้ง 3 กลุ่มนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทการกำจัดเชื้อโดยตรง อย่างไรก็ตามนอกจากหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโดยตรงด้วยรูปแบบต่างๆ ดังที่ Sima et al. (2003) กล่าวไว้แล้ว ยังพบว่า โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ยังช่วยการกำจัดเชื้อให้หมดไปทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล โมโนไซต์ และลิมโฟไซต์ ซึ่งมีบทบาทการกำจัดเชื้อโดยตรงโดยการทำลายสภาพของเซลล์และกำจัดเชื้อผ่านการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยการทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเรียกเซลล์เหล่านี้เข้ามายังบริเวณที่มีการบุกรุกและกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกันทำการกำจัดเชื้อ (Hancock and Sahl, 2006)

กลไกการทำงานของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียในการตอบสนองต่อการติดเชื้อเข้าสู่เต้านมโค

การตอบสนองของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อเพื่อให้การกำจัดเชื้อภายในเต้านมหมดไปภายในระยะเวลาอันสั้น โดยมีขั้นตอนการทำงานแบบด้านการตรวจจับ (sensing arm) และด้านการตอบสนอง (effector arm) โดยตัวรับ (receptors) ที่อยู่บนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุเต้านมทำหน้าที่ในการรับรู้ว่ามีเชื้อแบคทีเรียบุกรุกเข้ามาในเต้านม ตัวอย่างตัวรับ เช่น Toll-like receptor (TLRs) ในเต้านมโคมักถูกรายงานชนิดของ TLR 2 ชนิด คือ TLR2 และ TLR4 โดย TLR2 ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ TLR4 ตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จากความแตกต่างของตัว TLR นี้เองทำให้การตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน

TLR ที่ ปรากฏอยู่บนเซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจรับรู้ (recognize) การมีอยู่ของเชื้อโดยการตรวจสอบโมเลกุลจำเพาะที่อยู่บนผิวของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เรียกว่า pathogen associated molecular patterns (PAMP) หลังจากการรับรู้ PAMP ด้วย TLR แล้วส่วนของ effector arm จะเริ่มทำงานโดยกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ (signaling cascade) คือ nuclear factor **κ**B (NF**κ**B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ไปควบคุมการแสดงออก

ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ proinflammatory cytokines และ chemokines ทำให้เซลล์เยื่อบุเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจหลั่ง proinflammatory cytokines และ chemokines ซึ่งได้แก่ tumor necrosis factor-α, IL-1β, และ IL-6 เพื่อส่งสัญญาณให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเข้ามายังบริเวณที่มีเชื้อแบคทีเรียปรากฏอยู่ในเยื่อบุเต้านม (Oviedo-Boyso et al., 2007) ผลที่ตามมาคือ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น แลคโตเฟอริน β-defensin, cathelicidins, และไลโซไซม์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การศึกษาในโคนมในวันคลอดของ Crookenden et al. (2016) พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมีการแสดงออกของยีน BDBD4, BEFB10 และDEFB1เพิ่มมากขึ้นโดยยีนเหล่านี้ล้วนเป็นยีนที่สำคัญต่อการสร้างโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม β-defensin ซึ่งคาดหมายได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย เหล่านี้เป็นไปเพื่อการกำจัดเชื้อออกจากเยื่อบุเต้านม การรับรู้และตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อตามโมเดลดังกล่าวและทำให้มีโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Boehmer et al. (2008) ที่พบว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำให้โคติดเชื้อ *E. coli* จะมีการแสดงออกของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมเพิ่มขึ้นซึ่งได้แก่ cyclic dodecapeptide (cathelicidin-1), indolicidin (cathelicidin-4), bactenecin-5 (cathelicidin-2), และ bactenecin-7(cathelicidin-3) นอกจากโคนมแล้วยังมีรายงานในสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นอีกที่แสดงให้เห็นว่า cathelicidin สามารถเหนี่ยวนำให้แสดงออกเพิ่มขึ้นได้จากการกระตุ้นของ lipopolysaccharide ในแพะจะพบการเพิ่มขึ้นของ cathelicidin ภายใน4 ชั่วโมงหลังจากที่เต้านมแพะได้รับการฉีด lipopolysaccharide เข้าไป

การทำหน้าที่กำจัดเชื้อของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียตามที่ได้กล่าวมาในเบื้องต้นว่ามี 2 แบบ คือ การกำจัดเชื้อโดยตรงและการทำงานทางอ้อมผ่านการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ในการกำจัดเชื้อโดยตรงโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีกลไกการทำงานเป็น 3 กลุ่ม คือ

1) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์ เช่น โปรตีนไลโซไซม์ทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วยการจับกับ peptidoglycans ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวก แล้วเกิดการ hydrolysis ของพันธะ glycosidic bond ของ peptidoglycans ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายและเชื้อถูกทำลายไป สำหรับแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ไม่ได้มี peptidoglycans เป็นองค์ประกอบหลัก การทำงานของไลโซไซม์ในการกำจัดเชื้อจึงไม่ได้ผลดี (Levy, 2000)

2) โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่แย่งจับกับธาตุที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น การทำงานของโปรตีนแลคโตเฟอรินจะแย่งจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{2+}, Fe^{3+}) ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีพของแบคทีเรียจึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ นอกจากนี้แลคโตเฟอริน ยังมีหน้าที่ในการทำลายเชื้อแบบที่ไม่ขึ้นกับเหล็ก (Iron-independent killing) ได้ กล่าวคือ เมื่อ แลคโตเฟอริน จับกับส่วนที่เป็น lipoteichoic acid ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจะทำให้ประจุของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไปส่งผลดึงดูดให้โมเลกุลอื่นเช่นโปรตีนไลโซไซม์เข้ามาทำลายเชื้อที่บุกรุก และหากแลคโตเฟอริจับกับผนังเซลล์ของเชื้อแกรมลบจะอาศัยความมีความเป็นประจุบวกของแลคโตเฟอรินผลักกับประจุบวก (Ca^{2+} หรือ Mg^{2+}) ที่ฝังอยู่ที่ผนังเซลล์เชื้อแกรมลบส่งผลให้ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์หลุดออกไปเมื่อเกิดการผลักกันของประจุบวกดังกล่าวและเกิดการเสียสภาพและเซลล์แบคทีเรียแตกในที่สุด (Gonzalez-Chavez et al, 2009)

3) เปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อเสียสภาพไปโดยตรง เช่น defensin และ cathelicidin ซึ่ง Brogden (2005) ได้เสนอแนวคิดที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับกลไก

การทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยตรง ดังนี้ 1) Attraction คือ การจับกันของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรียโดยอาศัยแรงดึงดูด (electrostatic) ระหว่างประจุของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย และเซลล์แบคทีเรีย 2) Attachment คือขั้นตอนของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการผ่านเข้าไปหาเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยการฝังบางส่วนของโครงสร้างลงไปและ 3) Insertion คือ การสอด โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการยืดออกและเสียคุณสมบัติในการเลือกผ่าน กลไกการทำงานของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่ไปกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและทำให้เริ่มปฏิกิริยาการอักเสบโดยการหลั่ง proinflammatory cytokines เช่น histamine, prostaglandins รวมทั้ง chemokines เพื่อส่งเสริมการทำงานของ phagocytic cells (Hancock and Diamond, 2000) นั้น โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย อาจเกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้งในรูปแบบเกิดขึ้นทันที (acute) หรือแบบเรื้อรัง (chronic) ในแบบทันทีเริ่มต้นจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียกระตุ้นการปลดปล่อย histamine จากแมสต์เซลล์ทำให้เกิดผลจาก histamine คือ การขยายขนาดของหลอดเลือด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลผ่านออกจากหลอดเลือดเข้ามาบริเวณเยื่อบุเต้านมที่อักเสบและเกิด phagocytosis หรือการยับยั้งการสลาย fibrin clot เพื่อใช้เป็นด่านกักเก็บเชื้อแบคทีเรียไม่ให้กระจายออกไป นอกจากนี้ยังยับยั้งความเสียหายของเนื้อเยื่อโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส ส่วนบทบาทของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการอักเสบแบบเรื้อรังจะเกิดขึ้นเมื่อการตอบสนองแบบ acute imflammation ไม่สามารถเกิดอย่างมีประสิทธิภาพ การตอบสนองแบบเรื้อรังนั้นเริ่มจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ได้รับการกระตุ้นแล้วมีการสร้าง chemokine เพิ่มขึ้นและทำให้การแบ่งตัวของ T lymphocyte ชนิด T-helper cells มากขึ้นเพื่อผลิต Immunoglobulin G และกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดการกำจัดเชื้ออย่างสมบูรณ์

การเพิ่มปริมาณโซมาติกเซลล์มีเป็นการตอบสนองเพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพที่บุกรุก นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ยังพบการตอบสนองในระดับโปรตีน โดยพบมีโปรตีนในน้ำนม (milk proteins) หลายชนิดอยู่ในน้ำนมเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการติดเชื้อในเต้านม โปรตีนหลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามายังเต้านม บทความของ Isobe (2017) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นทำงานในตำแหน่งและช่วงเวลาของการตอบสนองที่แต่ต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน ชนิดของโปรตีนที่เคยมีรายงานได้แก่ haptoglobin (Åkerstedt et al., 2009), lipopolysaccharide–binding protein (Schroedl et al., 2001), Serum amyloid A (Eckersall et al.,2001; Eckersall et al., 2006) โปรตีนที่กล่าวมาเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการอักเสบซึ่งเป็นกลไกกำจัดเชื้อผ่านการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณที่มีการบุกรุกและทำการกำจัดเชื้อภายในเต้านม นอกจากนี้ยังมีโปรตีนและเปปไทด์ในน้ำนมที่มีฤทธิ์กำจัดแบคทีเรีย(antibacterial proteins) ได้แก่ cathelicidin1, 2, 4, 6 และ 7 Peptidoglycan recognition receptor protein (Boehmer et al., 2008; Boehmer et al., 2010) ซึ่งโปรตีนบางชนิดที่แสดงออกมาในน้ำนมอาจมีศักยภาพเป็น biomarker ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยเต้านมอักเสบได้ แต่อย่างไรตามโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้นนั้นเป็นโปรตีนที่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงในเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ จากการทบทวนเอกสารพบว่าขาดข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนที่แสดงออกเมื่อโคเกิดเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ซึ่งจำเป็นต่อการทำความเข้าใจเกี่ยวกับโปรตีนที่มีความสำคัญในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อภายในเต้านมและอาจประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกเริ่ม

(early diagnostic biomarker) ของเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้

นอกเหนือจากโปรตีนทั้งสองกลุ่มที่เคยมีรายงานว่าอาจมีศักยภาพเป็นตัวบ่งชี้ในระยะแรกเริ่มแล้ว ยังมีโปรตีนบางชนิดที่อาจมีศักยภาพในการใช้ประเมินระดับความรุนแรงของเต้านมอักเสบได้ Furukawa et al. (2011) ที่รายงานไว้ว่า ในน้ำนมจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ coagulase negative staphylococci ตามธรรมชาติพบปริมาณของ high-mobility group box 1 (HMGB1) protein มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนม แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการใช้โปรตีนที่พบในน้ำนมเป็น biomarker เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการประเมินความรุนแรงของเต้านมอักเสบ เนื่องจากวิธีการประเมินความรุนแรงของเต้านมอักเสบด้วยเครื่องตรวจเซลล์อัตโนมัติที่มีข้อจำกัดเนื่องจากมีราคาแพง รายงานของ Pongthaisong et al. (2015b) ที่พบ cathelicidin ในน้ำนมของโคที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการจากการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* รวมทั้งได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด cathelicidin อาจใช้บ่งชี้ระดับความรุนแรงของเต้านมอักเสบได้เนื่องจากระดับของโปรตีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าโซมาติกเซลล์ของน้ำนมจากเต้าที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (Pongthaisong et al. 2015a, Addis et al., 2016)

การประยุกต์ใช้โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้นำเสนอไปนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีศักยภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาภายในเต้านม และด้วยหลักฐานที่พบว่าโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียอาจถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มปริมาณขึ้นได้จึงอาจเป็นไปได้ที่จะเพิ่มการแสดง ออกของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียให้การกำจัดเชื้อภายในเต้านมหมดไปได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งชนิดของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการทำงานเพิ่มขึ้นได้นั้นได้แก่ แลคโตเฟอริน, defensin และ cathelicidin

แลคโตเฟอริน มีการศึกษาเกี่ยวกับแนวทางในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ โดยการทำสัตว์ตัดต่อพันธุกรรมในการศึกษาของ Hyv**Ö**nen (2006) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดเชื้อของโคที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมโดยใส่ยีน recombinant human lactoferrin พบว่าปริมาณ แลคโตเฟอริน ที่สร้างขึ้นมีปริมาณสูงขึ้นแต่ไม่สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* ที่ฉีดเข้าไปในเต้านมได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวนี้อาจเป็นเพียงต้นแบบที่ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการเพิ่มการตอบสนองของเต้านมเพื่อประโยชน์ในการกำจัดเชื้อภายในเต้านมด้วยโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวเอง นอกจากนี้ Kawai et al. (2015) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของแลคโตเฟอรินกับค่าโซมาติกเซลล์ เมื่อได้รับการรักษาเต้านมอักเสบด้วยการสอดเต้านมชนิด cefazolin ขนาด 150 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าเมื่อค่าโซมาติกเซลล์ลดลงจะส่งผลให้เห็นความแตกต่างของระดับแลคโตเฟอรินในน้ำนมที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รักษาแสดงให้เห็นภาพของการลดความรุนแรงของเต้านมภายหลังการรักษามีความสอดคล้องกับระดับระดับแลคโตเฟอริน ในด้านการเก็บรักษาน้ำนม Hisaeda et al. (2016) พบว่าน้ำนมโคที่มีระดับแลคโตเฟอริน อยู่สูงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจะพบปริมาณของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* ที่ลดลง ดังนั้นอาจนับได้ว่าแลคโตเฟอรินเป็นโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่อาจมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยการเกิดเต้านมอักเสบ การพยากรณ์ผลที่เกิดจากการรักษา และมีประโยชน์ด้านการเก็บรักษา

Defensins เป็น กลุ่มของเปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่พบในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลของโคซึ่งโดยปกติจะมีการผลิตออกมาอยู่ในระดับหนึ่ง (constitutively expressed) แต่เมื่อเซลล์ถูก

กระตุ้นจะสามารถผลิตออกมาเพิ่มมากขึ้นได้ มีการศึกษาเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพื่อกำจัดเชื้อเช่น Fehlbaum et al. (2000) ศึกษาในเซลล์เยื่อบุลำไส้พบว่าการแสดงออกของ β-defensin สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยการกระตุ้นจากกรดอะมิโน Isoleucine แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานว่ากรดอะมิโนดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ β-defensin ในเต้านมได้ ในขณะที่การศึกษาทางด้านโภชนศาสตร์ในโคนมที่ได้รับเสริมวิตามินดี3 ในอาหารระดับ 60 IU/กิโลกรัมน้ำหนักตัวของโคนมระยะกำลังให้นมพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมชนิดโมโนไซต์มีตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide พบการเพิ่มการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง β-defensin แสดงให้เห็นถึงบทบาทของวิตามินดี3ในการเพิ่มการผลิตโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด β-defensin (Merriman et al., 2015)

Bac5 เป็นเปปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด cathelicidin ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาคุณสมบัติของความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นได้ โดยมีรายงานการศึกษาที่ใช้เชื้อ *E.coli* และ lipopolysaccharide กระตุ้นให้ Bac5 มีแสดงออกมากขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล โดยการแสดงออกของ Bac5 จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับการกระตุ้น

นอกจากโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรียที่สร้างขึ้นเองได้ในร่างกายสัตว์แล้ว มีการรายงานที่อาจใช้เป็นต้นแบบของการพัฒนาการเพิ่มศักยภาพของโปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดย Kerr et al. (2001) ศึกษาโปรตีนที่ได้จากการถ่ายยีนของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่หนูทำให้สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเชื้อสาเหตุที่สำคัญของเต้านมอักเสบ เช่น โปรตีนชนิด lysostaphin ซึ่งงานวิจัยของ Kerr et al. (2001) ชี้เห็นว่า หนูทดลองที่ได้รับการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง lysostaphin จะมีจำนวนเต้าที่ติดเชื้อน้อยกว่าหนูปกติ

สรุป

โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อที่บุกรุกเข้าสู่เต้านม มีแหล่งที่มาจาก 2 แหล่งสำคัญ คือ เนื้อเยื่อเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาว การทำงานของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย มีทั้งการทำลายเชื้อโดยตรงและการสนับสนุนส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้กำจัดเชื้อ ณ บริเวณที่มีการตรวจพบว่ามีเชื้ออยู่ในเต้านม ปัจจัยจากตัวเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดความแตกต่างในการตอบสนองของ โปรตีนต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากการทบทวนเอกสารดังกล่าวนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและทำความเข้าใจเพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่แนวทางในการควบคุมปัญหาเต้านมอักเสบด้วยการพึ่งพาความสามารถที่เต้านมมีอยู่เพื่อลดปัญหาและผลกระทบที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมปัญหาเต้านมอักเสบ

เอกสารอ้างอิง

Addis M.F., Tedde, V., Puggioni, G.M., Pisanu, S., Casula, A., Locatelli, C., Rota, N., Bronzo, V., Moroni, P., Uzzau, S., 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 99, 8250-8258.

Åkerstedt, M., Waller K.P., Sternesjö, A., 2009.Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk in relation to raw milk quality. J. Dairy Res. 76, 483-489.

Almeida, A.M., Bassols,A., Bendixen, E., Bhide, M.,Ceciliani, F., Cristobal, S., Eckersall, P.D., Hollung, K., Lisacek, F., Mazzucchelli, G., McLaughlin, M., Miller, I., Nally, J. E., Plowman, J., Renaut, J.,Rodrigues, P., Roncada, P., Staric J., Turk, R., 2015. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. Animal. 9, 1–17.

Boehmer, J.L., Bannerman, D.D., Shefcheck, K., Ward, J. L., 2008. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine milk during experimentally induced Escherichia coli mastitis. J. Dairy Sci. 91, 4206-4218.

Boehmer, J.L., Ward, J.L., Peters, R.R., Shefcheck, K.J., McFarland, M.A., Bannerman, D.D., 2010. Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification. J Dairy Sci. 93, 593-603.

Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptide: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nature. 3, 238-248.

Crookenden, M.A., Heiser, A., Murray, A., Dukkipati, V.S.R., Kay, J.K., Loor J.J., Meier, S., Mitchell M.D.,Moyes, K.M., Waler, C.G., Roche, J.R., 2016. Parturition in dairy cows temporarily alters the expression of genes in circulating neutrophils. J. Dairy Sci. 99, 6470–6483

Eckersall, P.D., Young, F.J., Nolan, A.M., Knight, C.H., McComb, C., Waterston, M.M., Hogarth, C.J., Scott, E.M., Fitzpatrick, J.L., 2006. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 89,1488-1501.

Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb,C. Hogarth, C.J., Safi, S. , Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L., 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. Vet. Rec. 148, 35–41.

Fehlbaum, P., Rao, M., Zasloff,M. Anderson, G. M., 2000. An essential amino acid induces epithelial β-defensin expression. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 12723-12728.

Furukawa, Y., Hayashi, T., Mizuta, M., Ebara, S., Kiku, Y., Ozawa, T., Matsubara, T., Ito, I., Kitamura, D., Mizuta, R., 2011. Increased concentration of high-mobility group box 1 protein in milk is related to the severity of bovine mastitis. Vet. Res. Commun. 35, 47-54.

Gonzalez-Chavez, S. A., Arevalo- Gallegos, S., Rascon-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. Intern. J. of Antimicrob. Agents. 33, 301.e1– 301.e8

Guimaraes, J.L.B., Brito, M. A.V.P., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonca, L. C., Mendonca, J.F.M. Souza., G.N., 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: a case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. Prev. Vet. Med. 142, 46-50.

Hancock, R. E., Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol. 9, 402-410.

Hancock, R. E., Sahl, H.G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol. 24, 1551 – 1557.

Hisaeda, K., Koshiishi, T., Watanabe, M., Miyake, H., Yoshimura, Y., Isobe, N., 2016. Change in viable bacterial count during preservation of milk derived from dairy cows with subclinical mastitis and its relationship with antimicrobial components in milk. J. Vet. Med. Sci. 78, 1245–1250.

Hogarth, C. J., Fitzpatrick, J. L., Nolan, A., Young, M., Pitt, F. J., Eckersall, P.D., 2004. Differential protein composition of bovine whey: A comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. Proteomics. 4, 2094-2100.

HyvÖnen, P., Suojala, L., Orro, T., Haaranen, J., Simola,O., Røntved, C., PyÖrälä, S., 2006. Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental Escherichia coli intramammary infection. Infect. Immun. 74, 6206–6212.

Isobe, N., 2017. Control mechanisms for producing antimicrobial factors in ruminant mammary gland. Anim. Sci. J. doi:10.1111/asj.12808.

Kawai, K., Korematsu, K., Akiyama, K., Okita, M., Yoshimura, Y., Isobe, N., 2015. Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. Anim. Sci. J. 86,153–158.

Kerr, D.E., Plaut, K., Bramley, A.J., Williamson, C.M., Lax, A.J., Moore, K., Wells, K.D., Wall, R.J., 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotechnol. 19, 66–70.

Leelahapongsathon, K., Schukken,Y. H. Suriyasathaporn, W., 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. Trop. Anim. Health Prod. 46, 1067–1078.

Levy, O., 2000. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. Blood. 96, 2664-2672.

Lin, J., Hogan, J., Aslam M., Smith K., 1998: Immunization of cows with ferric enterobatin receptor from coliform bacteria. J. Dairy Sci. 81, 2151–2158.

Merriman, K. E., Kweh, M. F., Powell, J. L., Lippolis, J. D., Nelson, C. D., 2015. Multiple β-defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 154, 120–129.

Oviedo-Boyso, J., Valdes-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa- Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., Baizabal- Aguirre, V.M., 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect. 54, 399–409.

Pongthaisong, P., Katawatin, S., Thamrongyoswittayakul, C., 2015. Cathelicidin responded to *Streptococcus agalactiae* and associated with the severity of subclinical mastitis. Thai J. Vet. Med. 45, 651-655.

Pongthaisong, P., Katawatin, S., Thamrongyoswittayakul, C., Roytrakul S., 2015. Milk protein profiles in response to *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis in dairy cows. Anim Sci J. 87, 92-98.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., Done, S.H., 2008. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th ed. Elsevier Saunders, New York.

Schroedl, W., Fuerll,B., Reinhold, P., Krueger, M., Schuett. C., 2001. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). J. Endotoxin Res. 7, 49–52.

Síma, P., Trebichavský, I., Sigler, K., 2003. Mammalian antibiotic peptides. Folia Microbiol. (Praha) 48, 123–137.

Smolenski, G., Haines, S., Kwan, F.Y., Bond, J., Farr, V., Davis, S.R., Stelwagen, K., Wheeler, T.T., 2007. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. J. Proteome Res. 6, 207-215.

Suriyasathaporn, W., 2011. Epidemiology of subclinical mastitis and their antimicrobial susceptibility in small holder dairy farm, Chiang Mai province, Thailand. J. Anim. Vet. Adv. 10, 316-321.