หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดลองทำการเชื่อมเซลล์ ระหว่างเซลล์ myeloma กับ immune spleen cell ของหนูไมซ์ Balb/c ทั้งหมด 8 ครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์ hybridoma ที่สามารถผลิต MAb ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ P. falciparum ที่เป็นสายพันธุ์ที่ถูกชักนำให้เกิดการดื้อต่อยา สามารถสรุปผลที่ได้เป็นดังนี้

1. จำนวนของ hybridoma ที่ได้ทั้งหมดเท่ากับ 1024 หลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์จากทั้งหมด 3518 หลุม และมีอยู่เพียง 177 หลุมที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย ซึ่งได้คัดเลือกมาทำ single cell cloning เพียง 13 หลุมได้เป็น monoclone ทั้งหมด 58 monoclone โดยมีบาง monoclone ที่หยุดการสร้างแอนติบอดีเมื่อเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ hybridoma ได้แก่ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ($NaHCO_3$ และ HEPES) และชนิดของซีรั่มที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $NaHCO_3$ และ HEPES เป็น 25 mM และ 20mM ตามลำดับ ส่วนชนิดของซีรั่มที่เหมาะสมคือ fetal calf serum นอกจากนี้พบว่าจำนวนของ fused cell ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์มีผลต่อจำนวนของ hybridoma ที่เกิดขึ้น โดยถ้ามีจำนวนของ fused cell น้อยทำให้ได้จำนวนหลุมที่มี hybridoma น้อยตามไปด้วย

3. แอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู มีผลต่อจำนวนของ hybridoma ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการ โดยจากการทดลองนี้พบว่า แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธี Percoll gradient ทำให้ได้จำนวนของ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดี มากกว่าการใช้แอนติเจนที่เตรียม โดยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย saponin

4. ปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์และ ascitic fluid ของ hybridoma ไม่เท่ากัน ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าใน ascitic fluid มีปริมาณของแอนติบอดีมากกว่าที่พบในน้ำเลี้ยงเซลล์ประมาณ 25-125 เท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนของเซลล์ hybridoma ที่เพาะ

เลี้ยงต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์และการเจริญของเซลล์ hybridoma นั้น

5. MAb ที่ผลิตได้สามารถจำแนกออกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อระยะการเจริญของเชื้อมาลาเรียและรูปแบบการติดสารเรืองแสง โดย MAb กลุ่มที่ 1-3 มีความจำเพาะต่อระยะ schizont และ merozoite เท่านั้น คือเป็น stage-specific antibody ส่วน MAb กลุ่มที่ 4-6 มีความจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อได้ทุกระยะ แต่ทั้ง 6 กลุ่มนี้มีรูปแบบการติดสารเรืองแสงต่างกัน โดย MAb กลุ่มที่ 1 ติดสารเรืองแสงที่ rhoptry organelle ภายในไซโตปลาสซึมของเชื้อในระยะ schizont และ merozoite ส่วน MAb กลุ่มที่ 2 นั้นติดสารเรืองแสงบริเวณที่เป็นผิวเซลล์ของเชื้อ สำหรับ MAb กลุ่มที่ 3 มีรูปแบบการติดสารเรืองแสง เป็นจุดเล็กๆที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ และติดสารเรืองแสงเข้มปานกลางที่ไซโตปลาสซึมของเชื้อ และ MAb กลุ่มที่ 4 ติดสารเรืองแสงที่ไซโตปลาสซึมของเชื้อ ส่วน MAb กลุ่มที่ 5 และ 6 ติดสีสารเรืองแสงที่เยื่อหุ้มของ parasitophorus vacuole และติดสารเรืองแสงที่ผิวเซลล์รวมทั้งไซโตปลาสซึมของเชื้อ ตามลำดับ

6. การศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียจำนวน 18 ไอโซเลต พบว่าเชื้อมาลาเรียที่นำมาทดสอบนั้นมีความหลากหลายของแอนติเจนระหว่างไอโซเลต โดยสามารถจำแนกได้เป็น 10 ไทพ์ (I-X)

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. MAb ที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้ ควรมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆต่อไปอีกเช่น การศึกษา isotype ของ MAb ซึ่งเป็นการทดสอบความบริสุทธิ์ของ MAb ด้วย นอกจากนั้นควรทำการศึกษาความจำเพาะต่อโปรตีนของเชื้อด้วยการทำ immunoelectrophoresis ซึ่งจะทำให้ทราบขนาดของโปรตีนที่เป็นแอนติเจนของเชื้อ เป็นต้น

2. MAb กลุ่มที่ 6 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียทุกระยะและสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่างๆทั้งหมดได้นั้น ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยได้

3. MAb ที่ผลิตได้ครั้งนี้ ถ้าได้มีการนำไปทดสอบกับไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดอื่นๆของประเทศไทย ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลหนึ่งสำหรับการศึกษา polymorphism ของแอนติเจนและการกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อได้ด้วย