บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิต MAbs

สภาวะ (condition) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์แบบ in vitro ที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนอยู่รอดได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆที่สำคัญ ได้แก่ สภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ โดยช่วงของ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์อยู่ในช่วง 7.2-7.4 (Ceccarini and Eagle,1971) ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ทำหน้าที่รักษาสภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์นั้น ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH น้อยที่สุด เนื่องจากเมตะโบลิซึมของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีการผลิตสารที่มีความเป็นกรด (acidic product) ออกมา มีผลทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ลดลง อันจะก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ สารที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์นี้จะต้องมีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพ pH ของอาหารเลี้ยงให้คงที่ หรือ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารนั้น สารที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไป คือ $NaHCO_3$ ซึ่งมีการแตกตัวดังสมการข้างล่าง

$$NaHCO_3 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + Na^+ + H_2O \rightleftharpoons Na^+ + OH^- + H_2O + CO_2\uparrow$$

ได้เป็น hydroxyl ion (OH^-) และก๊าซ CO_2 โดย OH^- เป็นตัวปรับ pH ให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นปริมาณของ OH^- ขึ้นอยู่กับปริมาณของ $NaHCO_3$ ที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อป้องกันมิให้ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์สูงเกินไป ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ CO_2 incubator ซึ่งภายในตู้มีการหมุนเวียนของก๊าซ CO_2 ที่จะช่วยทำให้การแตกตัวของ $NaHCO_3$ อยู่ในสภาวะสมดุล ปัจจัยอีกอย่างที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์คือซีรั่มซึ่งเป็น growth supplement ที่ช่วยให้เซลล์เจริญอยู่รอดในหลอดทดลองได้ ซีรั่มที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่เป็นซีรั่มที่ได้มาจากสัตว์

จำพวก bovine,calf หรือม้า ฯลฯ โดยทั่วไปการผลิต MAb จะใช้ซีรั่มที่ผลิตได้จาก fetus ของสัตว์ ได้แก่ fetal bovine serum, fetal calf serum เนื่องจากระยะ fetus ซึ่งเป็นระยะที่ลูกยังอยู่ในท้องแม่จะมีการผลิตแอนติบอดีต่างๆในปริมาณต่ำหรือไม่มีการผลิตเลย ดังนั้นการใช้ซีรั่มชนิดนี้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงช่วยทำให้ MAb ที่ได้มีความบริสุทธิ์ไม่มีแอนติบอดีของสัตว์อื่นปะปนอยู่

ในการทดลองทำการเชื่อมเซลล์ เพื่อผลิตเซลล์ hybridoma ทั้งหมด 8 ครั้ง พบว่าการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1 ไม่พบ hybridomas เลย เนื่องจากเกิดมี contamination จากเชื้อแบคทีเรียภายหลังจากทำการเชื่อมเซลล์แล้ว 4-5 วัน ทำให้ไม่อาจนำผลมาเปรียบเทียบได้ ส่วน CU2 และ CU3 ไม่พบเซลล์ hybridoma เลยเช่นกัน อาจเป็นเพราะว่าสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไม่เหมาะสม ดังนั้นในการทำการเชื่อมเซลล์ครั้งต่อมาจึงมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่างคือ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และชนิดของซีรั่ม ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งทำให้ประสบผลสำเร็จในการผลิตเซลล์ hybridoma โดย CU2 และ CU3 ใช้ $NaHCO_3$ ที่มีความเข้มข้น 10 mM ไม่พบการเจริญของเซลล์ hybridoma ดังนั้นในการทำการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4-8 จึงได้เพิ่มความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ โดยใน CU4 เพิ่มเป็น 24 mM ส่วน CU5-CU8 เพิ่มความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ เป็น 25 mM และเติม HEPES 20 mM ร่วมไปด้วย ซึ่งการเชื่อมเซลล์ครั้งดังกล่าวพบว่ามีการเจริญของเซลล์ hybridoma ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Lopes & Alves (1984) ที่พบว่าการใช้ HEPES ร่วมกับ $NaHCO_3$ จะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยและจากผลการทดลองของ Eagle (1971) ที่ได้รายงานว่า การใช้บัฟเฟอร์อีกชนิดหนึ่งร่วมกับ $NaHCO_3$ ทำให้การรักษาสภาพ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ดีกว่าการใช้ $NaHCO_3$ เป็นบัฟเฟอร์เพียงชนิดเดียว สำหรับซีรั่มที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นซีรั่มที่ได้มาจาก fetus ของสัตว์ประเภทวัวที่ เรียกว่า bovine หรือ calf ซึ่งแต่ละ lot.ของซีรั่มมีประสิทธิภาพต่อการเจริญของเซลล์ต่างกัน เนื่องจากเป็นซีรั่มที่ได้มาจากสัตว์คนละตัว ในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 2 และ 3 ใช้ FBS ส่วนครั้งที่ 4-8 ใช้ FCS ซึ่งได้ทำการทดสอบแล้วว่าเป็น lot. ที่ทำให้เซลล์ hybridoma เจริญได้ จากผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงว่า FBS อาจมีประสิทธิภาพในการทำให้เซลล์ hybridoma เจริญได้ไม่ดีเท่ากับ FCS

ผลการผลิต hybridoma ของ CU4-CU8 ซึ่งได้จำนวน hybridoma แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากการใช้ FCS ต่าง lot. กัน และ/หรือ อาจเป็นเพราะจำนวน fused cell และ feeder cell ต่อหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์เช่น CU4 และ CU6 (ตารางที่ 9) ซึ่งใช้ FCS lot.เดียวกันจำนวนของ feeder cell เท่ากัน แต่จำนวนของ fused cell ต่างกัน โดย CU4 มีจำนวน fused cell เท่ากับ $1.3x10^5$ เซลล์ต่อหลุม ส่วน CU6 มี $1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม พบว่าจำนวนของหลุมที่มีการเจริญของ hybridoma ของ CU4 เท่ากับ 21.4 เปอร์เซนต์ซึ่งมากกว่าของ CU6 ที่พบเท่ากับ 17.0 เปอร์เซนต์ ในทำนองเดียวกัน CU7 และ CU8 ซึ่งใช้ FCS ที่เป็น lot.เดียวกัน แต่มีจำนวนของ fused cell ไม่เท่ากัน โดย CU7 มีจำนวน fused cell เท่ากับ $1.1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม แต่ CU8 มีจำนวน fused cell เท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อหลุมได้ hybridoma เท่ากับ 53.7 และ 32.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Khusmith และคณะ (1984) ซึ่งใช้จำนวนของ fused cell ประมาณ $1.1x10^5$ เซลล์ต่อหลุม และพบจำนวนของหลุมที่มีการเจริญของเซลล์ hybridoma เท่ากับ 54.3 เปอร์เซนต์ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ใน CU7

สำหรับการใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือ 1,500 (CU1 และ CU2) และ 4,000 (CU3-CU8) นั้น จากผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่การใช้ PEG 4,000 นั้นสะดวกกว่า เนื่องจาก PEG ที่ใช้นี้ถูกผลิตเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นเป็น 50% เรียบร้อยแล้ว สามารถนำมาใช้ได้ทันที

Hybridoma ที่สามารถผลิตแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซนต์แล้วพบว่าแตกต่างกันในการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 10 ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติและวิธีการเตรียมแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของตัวหนูเอง โดยใน CU4 ซึ่งใช้เชื้อมาลาเรียที่เตรียมโดยการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกด้วย 0.15% saponin แล้วนำเชื้อที่ได้ที่อยู่ในลักษณะเป็น pellet มาผสมฉีดหนูซึ่งอาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของหนูเกิดการตอบสนองได้ไม่เต็มที่ เนื่องจากแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปในตัวหนูมีขนาดใหญ่ สำหรับ CU5-CU8 ใช้แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีการทำ Percoll gradient และ sonication ได้แอนติเจนที่เป็นโปรตีนของเชื้อในลักษณะ

ของเหลว พบว่าแอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีหลัง ทำให้ได้เปอร์เซนต์ของหลุมที่มี hybridoma และผลิตแอนติบอดีได้มากกว่าการใช้วิธีเตรียมโดยใช้ saponin โดยใน CU4 มี hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีเท่ากับ 3.3 เปอร์เซนต์ ขณะที่ CU6-CU8 ได้เท่ากับ 6.5, 11.5 และ 42.4 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Khusmith (1984) ที่ได้ใช้วิธีการเตรียมแอนติเจนโดยการใช้ Percoll พบ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีคิดเป็นเปอร์เซนต์เท่ากับ 38.3

สำหรับใน CU5 ซึ่งไม่พบการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย อาจเป็นเพราะหนูที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองต่อแอนติเจนของเชื้อน้อยไป ทำให้มีเซลล์ lymphocyte ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนนี้จำนวนน้อยโอกาสที่จะได้เซลล์ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีจึงน้อยตามไปด้วย หรืออาจจะเป็นเพราะ แอนติบอดีที่เซลล์ hybridoma ผลิตมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาด้วยวิธี IFA ที่ใช้ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้

จากการทดสอบ หาปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ และใน ascitic fluid ของ monoclone ต่างๆที่ได้ พบว่าปริมาณของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์มีช่วงความแตกต่างตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:6250 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนปริมาณของแอนติบอดีใน ascitic fluid ของหนูพบว่ามีช่วงความแตกต่างตั้งแต่ 1:250 ถึง 1:31250 ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องจากการเจริญของเซลล์ hybridoma และสภาพของหนูทดลองที่ใช้

2. <u>การจำแนกกลุ่ม MAb ที่ผลิตได้</u>

สามารถจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม โดยจัดเรียงลำดับตามปฏิกิริยาจำเพาะต่อระยะการเจริญของเชื้อ และรูปแบบการติดสีสารเรืองแสง ดังนั้น MAb: CU4.1-2 และ CU4.2-1 จึงจัดเป็นกลุ่มที่ 1 มีรูปแบบปฏิกิริยา IFA และความจำเพาะต่อระยะ schizont และ merozoite ซึ่งคล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 2 ที่ McBride และคณะ (1982) และ Khusmith และคณะ (1984) จำแนกไว้

MAb กลุ่มที่ 2 (CU6.1-1, CU6.1-4-1, CU6.1-3-1) มีลักษณะรูปแบบการติดสี

สารเรืองแสงและความจำเพาะต่อระยะการเจริญของเชื้อคล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 4 ของ McBride และคณะ (1982) ได้จำแนกไว้

ส่วน MAb ที่ผลิตได้กลุ่มที่ 4 (CU7.3-1-1, CU7.3-2-1, CU7.4, CU7.4-3) มีลักษณะคล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 1 ของ McBride และคณะ (1982) และ Khusmith และคณะ (1984)

สำหรับ MAb กลุ่มที่ 3 (CU6.2, CU6.2-1, CU6.2-2, CU6.2-3, CU8.1-5) ซึ่งทำปฏิกิริยาที่ผิวของเม็ดเลือดแดง มีลักษณะคล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 6 ที่ Khusmith และคณะ (1987a) จำแนกไว้

MAb กลุ่มที่ 6 (CU8.4-1, CU8.4-2-1, CU8.4-3-2, CU8.4-4-1) มีลักษณะคล้ายกับ MAb กลุ่มที่ 3 ของ McBride และคณะ (1982) และ Khusmith และคณะ (1984)

ส่วน MAb กลุ่มที่ 5 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อทุกระยะการเจริญและเรืองแสงที่บริเวณเยื่อหุ้มของ parasitophorus vacuole นั้น ยังไม่มีผู้ใดพบและรายงานมาก่อน เท่าที่มีผู้รายงานไว้พบแต่เพียงการติดสีสารเรืองแสงที่บริเวณเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะ schizont และ trophozoite (Khusmith et al.,1984)

การทดสอบด้วยวิธี IFA นี้ สามารถบอกความจำเพาะและตำแหน่งของแอนติเจนที่จำเพาะต่อ MAbs ปรากฏให้เห็นการเรืองแสงที่บริเวณนั้นมีรูปแบบแตกต่างกัน โดยอาศัยความหลากหลายของรูปแบบการเรืองแสงตรงบริเวณจำเพาะของเชื้อ ทำให้สามารถจำแนก MAb ที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มต่างๆได้ ถึงแม้ว่าวิธี IFA นี้จะมีความไวของปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการทดสอบแบบอื่น เช่น วิธี RIA (radioimmuno assay) หรือ วิธี ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay) เป็นต้น แต่การทดสอบด้วยวิธี IFA ก็ยังใช้กันแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดกว่าวิธี RIA และ ELISA

3. การศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยกับ MAb ที่ผลิตได้

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง MAb 18 monoclone ที่ผลิตได้ กับเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่างๆ 18 ไอโซเลต พบว่า MAb แต่ละกลุ่มทำปฏิกิริยากับไอโซเลตของเชื้อมาลาเรียให้ผลแตกต่างกัน ดังนี้คือ MAb กลุ่มที่ 2 (CU6.1-1, CU6.1-3-1, CU6.1-4-1) ทำปฏิกิริยากับเชื้อได้เพียง 3 ไอโซเลตคือ MMS3, MMS33, MMS20 ในขณะที่ MAb กลุ่มที่ 6 (CU8.4-1, CU8.4-1-2, CU8.4-3-2, CU8.4-4-1) ทำปฏิกิริยากับเชื้อมาลาเรียได้ทุกไอโซเลต ส่วน MAb กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ทำปฏิกิริยากับเชื้อได้เพียงบางไอโซเลตเท่านั้น แสดงว่า MAb กลุ่มที่ 2-5 สามารถบอกความแตกต่างของแอนติเจนของเชื้อแต่ละไอโซเลตได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ McBride และคณะ (1982) และของ Schofield และคณะ (1982) ที่ได้รายงานว่าเชื้อมาลาเรียบางไอโซเลตมีแอนติเจนแตกต่างกัน และบางไอโซเลตมีแอนติเจนคล้ายคลึงกันขึ้นกับ MAb ที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ Thaithong และคณะ (1984) ได้รายงานการทดสอบแอนติเจนของสายพันธุ์ต่างๆของ P. falciparum ที่แยกมาจากไอโซเลตเดียวกันด้วย MAb ต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อสามารถแสดงความหลากหลายของแอนติเจนเช่นเดียวกัน

จากผลของการทำปฏิกิริยากับ MAb ในกลุ่มที่ 2-5 พบว่าไอโซเลตของเชื้อมาลาเรียมีแอนติเจนแตกต่างกันดังตัวอย่างเช่น ไอโซเลต MMS10 ไม่มีแอนติเจนที่จำเพาะต่อ MAb ในกลุ่มดังกล่าวนี้เลย ส่วนไอโซเลต MMS4 และ MMS23 มีแอนติเจนที่จำเพาะต่อ MAb กลุ่มที่ 4 และ 5 เหมือนกัน สำหรับไอโซเลต BR14, MBR93, MBR94, TM335R, MMS1 และ MMS14 เป็นจำนวน 6 ไอโซเลตจากเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด 18 ไอโซเลต ให้ปฏิกิริยากับ MAb กลุ่มที่ 3 ถึง 6 เหมือนกันแสดงว่าไอโซเลตทั้ง 6 ไอโซเลตอาจมีแอนติเจนชนิดเดียวกันหรือคนละชนิดแต่มี epitope ที่เหมือนกัน

ในการทดสอบความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อจำนวน 18 ไอโซเลต สามารถแยกความหลากหลายของแอนติเจนออกเป็น 10 ไทพ์ โดยไทพ์ที่ IV มีจำนวน 6 ไอโซเลต ในขณะที่ไทพ์อื่นๆมีเพียง 1 หรือ 2 ไอโซเลตเท่านั้น แสดงว่าแอนติจีนิกไทพ์ IV เป็นไทพ์ที่มีโอกาสพบได้มาก ดังนั้นถ้าเพิ่มจำนวนไอโซเลตของเชื้อมาทดสอบมากขึ้นอาจพบความหลากหลาย

ของแอนติเจนของเชื้อได้มากกว่านี้ หรือถ้าน่าเชื้อที่เก็บมาจากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคอื่นๆของประเทศไทยมาทดสอบด้วยอาจจะสามารถบอกการกระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อได้ด้วย