

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตแอนติธรอมโบไซต์ แอนติบอดี เพื่อใช้ในการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดด้วยเทคนิค SPRCA

ปริยานาด วงศ์จันทร์*

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดสามารถทำได้หลายวิธี แต่มีข้อจำกัดแตกต่างกันไป วิธี Solid phase red cell adherence assay (SPRCA) เป็นวิธีหนึ่งที่ทำได้ง่าย ไม่ต้องการอุปกรณ์หรือน้ำยาพิเศษใดๆ แต่ในขั้นตอนของเทคนิคจำเป็นต้องใช้ anti-thrombocyte สำหรับตรึงเกล็ดเลือดไว้บนหลุม ผู้วิจัยจึงได้ผลิต anti-thrombocyte ขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการทั้งด้านการเรียนการสอน การบริการทางห้องปฏิบัติการ และเพื่อการจำหน่ายในราคาถูกและลดต้นทุนลดการนำเข้า โดยการฉีดกระตุ้นกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White จำนวน 2 ตัวด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้นจากผู้บริจาคสุขภาพแข็งแรงหมู่โลหิตโอ ในขนาด 1×10^8 cells/500 μ l/dose ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 เดือน เจาะเลือดปั่นแยกเก็บซีรัมก่อนการฉีดกระตุ้นทุกครั้ง ตรวจสอบแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายด้วยเทคนิค platelet suspension immunofluorescent (PSIFT) โดยใช้ FITC conjugated swine anti-rabbit Igs ที่เจือจาง 1:25 จากการศึกษาระต่ายสร้าง anti-thrombocyte ในระดับความแรงที่สูงขึ้นเมื่อฉีดกระตุ้นเป็นเวลานานขึ้นและพบว่าความแรงของแอนติบอดีเริ่มคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 จนถึงสัปดาห์ที่ 20 โดยมีไตเตอร์เท่ากับ 40 อย่างไรก็ตามแม้ว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความแรงของต่ำแต่สามารถปรับให้สูงขึ้นได้ โดยการทำให้บริสุทธิ์และทำให้เข้มข้นขึ้นตามต้องการก่อนนำไปใช้งานตรวจวิเคราะห์ต่อไป

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2548; 38: 102-110.

คำรหัส : thrombocyte, solid phase red cell adherence assay (SPRCA), platelet suspension immunofluorescent technique (PSIFT)

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Production of Anti-thrombocyte Antibodies for the Detection of Anti-platelet Antibodies by SPRCA Technique

Preeyanat Vongchan*

Many assays are used to detect anti-platelet alloantibodies in patient sera with abnormal bleeding according to platelet destruction. However, each has its own limitation. Solid phase red cell adherence assay (SPRCA) is colorimetric method and no special materials needed but anti-thrombocyte antibodies to immobilize platelet onto microtiter plate. Our aim is to produce rabbit polyclonal antibodies specific to human platelet to use as a key material in the development of SPRCA as a special laboratory service. This project is not only used as a model for teaching but the obtained product can be supplied as demand. The most important is to reduce cost of production and out sourcing. Platelet concentrate was prepared from 5 ml EDTA blood of normal healthy subject. After adequate washing, it was adjusted to at least 1×10^6 cell/500 μ L/dose and immunized subcutaneously every week for 5 months. Blood and serum was drawn and separated, respectively. Twenty immunizations were performed and antibody detection was assayed by platelet suspension immunofluorescent technique using 1:25 FITC-conjugated swine anti-rabbit IgG.

It was found that rabbit produced anti-thrombocytes in dose response curve and the titer of was up to 40 since the week 12th. The obtained anti-thrombocyte is very low titer, however it can be increased by purification and concentration before any assay in need. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38: 102-110.

Keywords: thrombocyte, solid phase red cell adherence assay (SPRCA), platelet suspension immunofluorescent technique (PSIFT)

* Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

คำนำ

Platelet alloantibodies คือแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือด (platelet alloantigens) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ common antigens ได้แก่แอนติเจนที่สามารถพบร่วมกันได้บนผิวเซลล์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากบนผิวเกล็ดเลือดเช่น แอนติเจนหมู่เลือด ได้แก่ ABH, Lewis, Ii และ P และ platelet specific antigens และแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ HLA class I และ platelet specific antigens¹⁻⁷ ซึ่งหมายถึงแอนติเจนที่พบได้เฉพาะบนผิว

เกล็ดเลือดเท่านั้น เรียกว่า human platelet antigen (HPA) ปัจจุบันพบแล้ว 6 ชนิด⁸ และให้ชื่อเป็น HPA-1 ถึง HPA-6 มีลักษณะเป็น allelic ซึ่งกันและกัน กำหนดเรียกเป็น a และ b ในประชากรไทยมีผู้ศึกษาพบว่า HPA-1a ถือเป็น high incidence อย่างไรก็ตามยังไม่ถือว่าเป็นรายงานที่สมบูรณ์เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยและทำเฉพาะในเขตเมืองหลวง⁹

ในงานธนาคารเลือดพบว่าแพทย์ต้องการเกล็ดเลือดเข้มข้น (platelet concentrate) เพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำและมีอาการเลือดออกผิดปกติ ผู้ป่วย

เหล่านี้ได้รับเกล็ดเลือดเข้มข้นน้อยๆ แต่ระดับของเกล็ดเลือดยังต่ำ หรืออาจพบว่ามียะตังเกล็ดเลือดปกติแต่ไม่ทำงาน และผู้ป่วยมีอาการทางคลินิก (post transfusion purpura หรือ PPP) ซึ่งเรียกภาวะนี้ว่า platelet refractoriness¹⁰ พบได้ในผู้ป่วยที่เคยได้รับเลือดหรือเกล็ดเลือดบ่อยๆ เช่นผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด เช่น leukemia, myeloid aplasia หรือทารกแรกคลอดที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำและมีเลือดออก (neonatal autoimmune thrombocytopenia, NAITP) ซึ่งมักพบได้ในมารดาที่ตั้งครรภ์หลายครั้ง หรือภาวะเกล็ดเลือดต่ำจากการได้รับยาบางชนิด¹¹ นอกจากนี้ยังพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำใน Idiopathic- หรือ autoimmune-thrombocytopenia (ITP หรือ AITP) ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ จากการศึกษาพบว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำเหล่านี้เป็นผลจากมีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด และส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีต่อส่วนของโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด เช่น glycoprotein และ HPA มากกว่า common alloantigens¹² เพราะแม้ว่าจะให้เกล็ดเลือดที่เตรียมจากญาติหรือผู้บริจาคที่มี HLA fully matched แก่ผู้ป่วยก็ตาม ก็ยังเกิดพยาธิสภาพดังกล่าวได้อีก

ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการต่างๆ มาใช้ทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในซีรัมของผู้ป่วย เพื่อช่วยในการวินิจฉัยสาเหตุและช่วยการรักษาของแพทย์ ตลอดจนการพิจารณาหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย เช่นการทำ Solid phase red cell adherence assay (SPRCA), Platelet agglutination test, Complement fixation test, Platelet suspension immuno-fluorescent test (PSIFT), Solid phase radioimmunoassay, Western blotting¹³ ฯลฯ แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไป

Solid Phase Red Cell Adherence Assay (SPRCA) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องการอุปกรณ์และเทคนิคพิเศษใดๆ มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาปฏิบัติการของการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆ¹⁴ เพื่อนำผลการศึกษาดังกล่าวมาใช้ในการหาเกล็ดเลือดจากผู้บริจาครายเดียว (single donor platelet) ที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาดังกล่าว จึงนับได้ว่ามีประโยชน์

เป็นอย่างมากสำหรับการช่วยวินิจฉัยและให้การรักษาที่ถูกต้อง ในปัจจุบันงานธนาคารเลือด ห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่หรือแม้แต่ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์ยังไม่มีวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยวิเคราะห์หาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในซีรัมของผู้ป่วยได้ จึงไม่มีการทดสอบใดที่จะช่วยในการวินิจฉัยของแพทย์ว่าผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำและต้องการเกล็ดเลือดเข้มข้นเป็นจำนวนมากเพื่อการรักษาอาการเลือดออกผิดปกตินั้น มีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดหรือไม่ หากมีวิธีการตรวจสอบและสามารถยืนยันได้ว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำนั้นเป็นเพราะเกิดจากผู้ป่วยมีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดก็เป็นทางออกหนึ่งที่จะช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยและพิจารณาวิธีการรักษาที่ถูกต้อง หรืออาจจำเป็นต้องตรวจความเข้ากันได้ของเกล็ดเลือดก่อนให้ผู้ป่วย เพื่อลดการทำลายเกล็ดเลือดลง

อย่างไรก็ตามขั้นตอนหนึ่งของปฏิกิริยา คือการตรึงเกล็ดเลือดไว้บนหลุมด้วย anti-thrombocyte แต่ในปัจจุบันไม่มีแอนติบอดีดังกล่าวจำหน่ายในท้องตลาดภายในประเทศ หากต้องการใช้จำเป็นต้องสั่งให้ผลิตและในปริมาณที่มากพอเพื่อให้เกิดความคุ้มค่า

ผู้วิจัยจึงตั้งวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าเพื่อผลิต anti-thrombocyte เพื่อนำมาใช้งานทั้งด้านการเรียนการสอน การบริการทางการแพทย์ ตลอดจนคาดหวังว่าจะเป็นแหล่งผลิตเพื่อจำหน่ายให้แก่หน่วยงานที่ต้องการทั้งภาครัฐและเอกชน หากสามารถผลิตน้ำยาขึ้นใช้เองแทนการสั่งซื้อซึ่งสิ้นเปลืองงบประมาณและค่าใช้จ่าย จะทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก และหากมีการพัฒนาคุณภาพผลผลิตอย่างเป็นระบบอุตสาหกรรม และได้รับการรับรองจากสถาบันภายนอกด้วยแล้ว จะสามารถผลิตจำหน่ายให้หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชน ทำให้ไม่ต้องสั่งซื้อน้ำยาราคาแพง เป็นการลดการนำเข้า การวิจัยเพื่อการผลิตนี้สามารถทำได้เองในหน่วยงานเนื่องจากมีเทคโนโลยี ตลอดจนอุปกรณ์พร้อมและเพียงพอ ประโยชน์ที่ได้รับอีกประการหนึ่งคือการเรียนการสอน การฝึกนักศึกษาภาคินพนธ์ให้เรียนรู้การทำงานและการแก้ปัญหาในงานวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีและการทำวิจัยที่มีคุณภาพและมีผลผลิตอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

เจาะเลือดจากผู้บริจาคที่สุขภาพแข็งแรงจำนวน 5 ml. โดยใช้ 5% EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งในอัตราส่วนของเลือดต่อน้ำยา = 9:1 แบ่งส่วนหนึ่งตรวจหาปริมาณเกล็ดเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Automated Hematology Analyzer, KX-21, Sysmex) เพื่อให้ทราบปริมาณเกล็ดเลือดทั้งหมดในเลือด 5 ml ที่เจาะเก็บมาได้ จากนั้นปั่นเบาที่ 800 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ได้ platelet rich plasma จากนั้นนำ platelet rich plasma บั่นหนักที่ 2,800 g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วน pellet ซึ่งเป็นเกล็ดเลือด บั่นล้างด้วย PBS pH 7.2 จากนั้นเติม PBS ปริมาตร 500 μ L สำหรับการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

2. การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White จำนวน 2 ตัว น้ำหนักประมาณ 2.5 กิโลกรัม ก่อนการฉีดกระตุ้นครั้งแรกเจาะเลือดจากใบหูเพื่อเก็บเลือดและปั่นแยกเก็บซีรัมแช่แข็งไว้เป็น preimmunized serum นำเกล็ดเลือดที่เตรียมไว้จากข้อ 1 ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) การฉีกระตุ้นทำทุกสัปดาห์และก่อนการฉีดกระตุ้นเก็บเลือดทุกครั้ง

3. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC conjugated swine anti-rabbit Igs

เนื่องจากการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในกระต่ายใช้วิธี indirect immunofluorescent ซึ่งในการศึกษานี้เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนบนเกล็ดเลือดกับแอนติบอดี จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า platelet suspension immunofluorescent technique (PSIFT) จึงต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีตัวที่สอง วิธีการทำดังนี้คือ เตรียม platelet concentrate ด้วยวิธีในข้อ 1 ปรับความเข้มข้นเป็น 2×10^7 cells/ml จากนั้นตรึงเกล็ดเลือดด้วย 1% paraformaldehyde in PBS (PFA) โดยใช้เกล็ดเลือด 3 ส่วนต่อ 1%PFA 1 ส่วน ทำปฏิกิริยานาน 2 นาที และล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA PBS สุดท้ายปรับความเข้มข้นของ PFA-fixed platelet เป็น 200×10^6 cells/

ml แบ่ง PFA-fixed platelet ถ่ายลง microcentrifuge tubes ปริมาตร 50 μ L จำนวน 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วย preimmunized serum (negative control), immunized serum (week 9th), EDTA-PBS (conjugate control) ในปริมาตรเท่ากัน ปลอยให้ทำปฏิกิริยาที่ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA-PBS ก่อนเติม FITC conjugated swine anti-rabbit Igs ที่เจือจางเป็น 1:25, 1:50 และ 1:75 ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบความแรงของการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากเติม conjugate แล้วปลอยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA-PBS สุดท้ายกำจัด EDTA-PBS ออกให้หมด และเติม 10% glycerol-PBS ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เกล็ดเลือดกระจายตัวดีและหยดบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้ว และนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และถ่ายภาพประกอบ

4. การตรวจวัดระดับความแรงของแอนติบอดีในซีรัมกระต่าย

เตรียม platelet concentrate ด้วยวิธีในข้อ 1 ปรับความเข้มข้นเป็น 2×10^7 cells/ml จากนั้นตรึงเกล็ดเลือดด้วย 1% paraformaldehyde in PBS (PFA) โดยใช้เกล็ดเลือด 3 ส่วนต่อ 1%PFA 1 ส่วน ทำปฏิกิริยานาน 2 นาที และล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA PBS สุดท้ายปรับความเข้มข้นของ PFA-fixed platelet เป็น 200×10^6 cells/ml แบ่ง PFA-fixed platelet ถ่ายลง microcentrifuge tubes ปริมาตร 50 μ L จำนวน 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วย preimmunized serum (negative control), immunized serum ซึ่งเลือกทำในซีรัมที่เจาะในสัปดาห์ที่ 2, 4, 8, 16, และ 19 ตามลำดับ โดยในแต่ละตัวอย่าง เจือจางซีรัมแบบ serial two-fold dilution ด้วย EDTA-PBS และการทดสอบแต่ละชุดมีชุดควบคุมคือ conjugate control ซึ่งใช้ EDTA-PBS แทนซีรัม ในปริมาตรเท่ากัน ปลอยให้ทำปฏิกิริยาที่ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA-PBS ก่อนเติม FITC conjugated swine anti-rabbit Igs ที่เจือจางเป็น 1:25 หลังจากเติม conjugate แล้วปลอยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA-PBS สุดท้ายกำจัด EDTA-PBS

ออกให้หมด และเติม 10% glycerol-PBS ปริมาตร 10 μL ผสมให้เกล็ดเลือดกระจายตัวดีและหยดบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้ว และนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ และถ่ายภาพประกอบ

5. การเจาะเก็บเลือดเพื่อเตรียมซีรัมกระต่าย

หลังจากทราบผลการทดสอบว่ากระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดแล้ว เจาะเลือดกระต่ายและปั่นแยกซีรัมแช่แข็งไว้ โดยเจาะทุก 5 วัน ซีรัมทั้งหมดมีแผนกำหนดการขั้นตอนไปคือการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Protein G affinity column เพื่อจะได้นำไปพัฒนาวิธีการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยด้วยเทคนิค SPRCA ต่อไป

ผลการศึกษา

1. ผลการเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับการฉีดกระตุ้นกระต่าย

ในการเจาะเลือดผู้บริจาคหนึ่งรายเป็นเพศชาย (นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4) สุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์และมีหมู่โลหิตโอ สำหรับใช้ในการเตรียมเกล็ดเลือดเข้มข้นเพื่อใช้ฉีดกระตุ้นกระต่าย โดยการเจาะเลือดปริมาตร 5 มล. ทุกครั้ง แบ่งส่วนหนึ่งนำไปนับจำนวนเกล็ดเลือดต่อปริมาตรในหน่วยไมโครลิตร ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ (Automated Hematology Analyzer, KX-21, Sysmex) พบว่าหลังจากปั่นล้างและเตรียมเกล็ดเลือดให้อยู่ในปริมาตร 500 μL แล้ว มีจำนวนเกล็ดเลือดต่อการฉีดกระตุ้นเฉลี่ย 8×10^8 cells/500 μL ($0.57-13.0 \times 10^8$ cells/500 μL) การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยเกล็ดเลือดเข้มข้นในการศึกษา

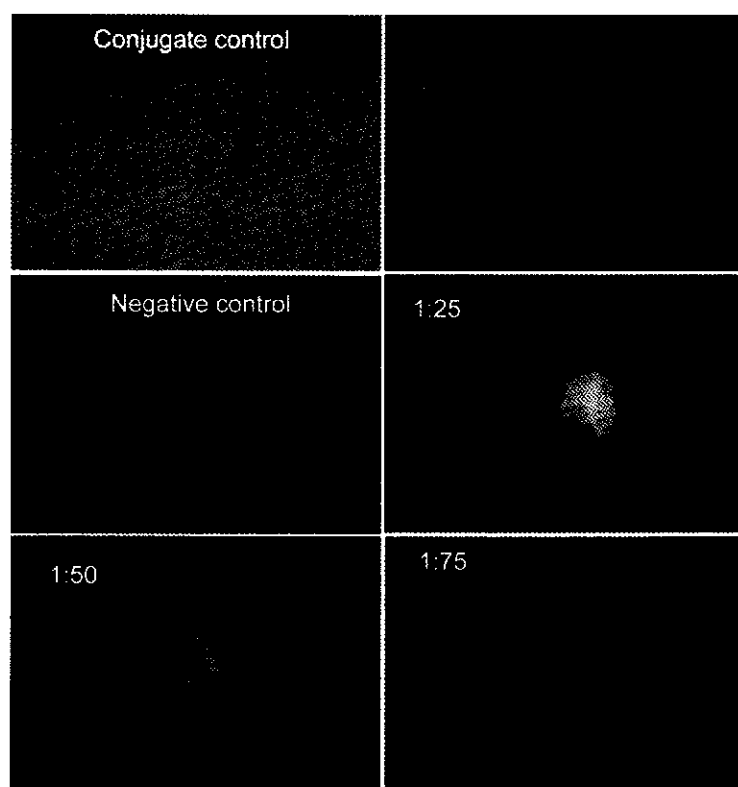
ครั้งนี้ไม่ได้ใช้สารช่วย (adjuvant) ใดๆ เนื่องจากเกล็ดเลือดมีความเป็นแอนติเจนสูงอยู่แล้ว และเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการอักเสบในสัตว์ทดลอง

2. ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ FITC-conjugated swine anti-rabbit Igs

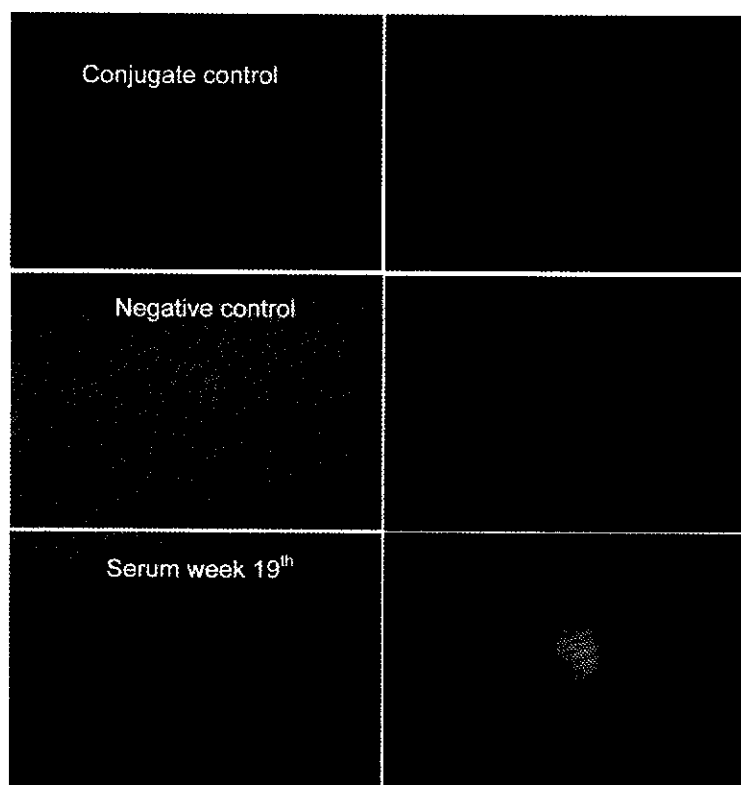
ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ FITC-conjugated swine anti-rabbit Igs พบว่าที่ความเข้มข้น 1:25 ให้ความแรงของการมองเห็นผ่านกล้องสูงที่สุด ความเข้มข้นที่ 1:50 และ 1:75 แม้ว่าความเข้มข้นจะลดลง แต่ก็สามารถมองเห็นได้ ดังแสดงในภาพที่ 1 อย่างไรก็ตามเนื่องจากการเรืองแสงของ FITC ลดความแรงลงได้อย่างรวดเร็ว หากต้องใช้เวลานานในการตรวจผล จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 1:25 ซึ่งนอกจากจะให้ความแรงของสีที่ชัดเจน การลดความแรงของสีในเวลาที่ผ่านไปมีน้อยแล้ว ที่สำคัญคือยังคงให้ผลลบกับชุดควบคุมคือ conjugate control ซึ่งทำให้มั่นใจว่าจะไม่เกิดผลบวกปลอมเมื่อใช้ FITC-conjugated swine anti-rabbit Igs ที่ความแรงมากเกินไป

3. ผลการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในกระต่าย

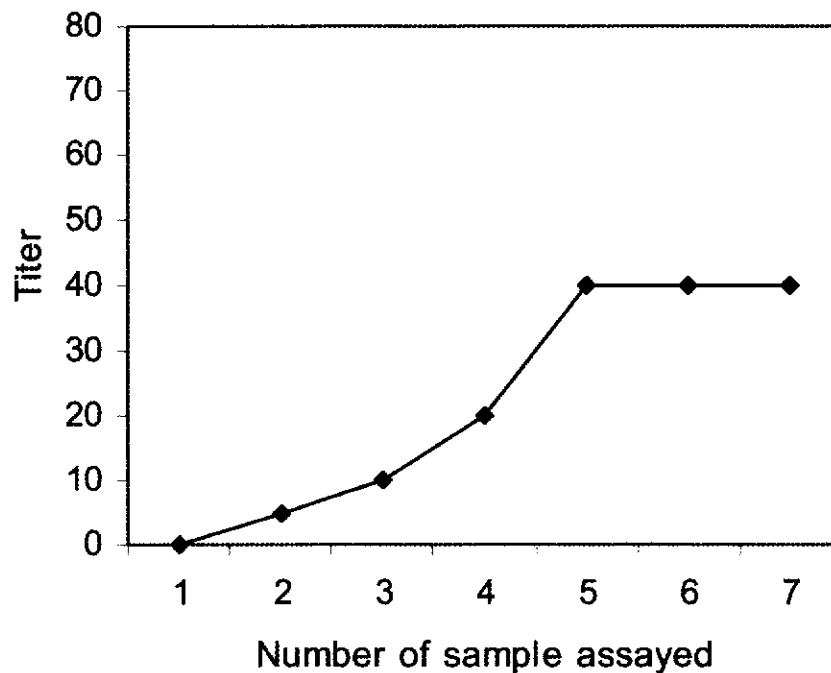
จากการศึกษาพบว่าการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในกระต่ายในลักษณะของ dose response curve กล่าวคือมีระดับความแรงเพิ่มขึ้นเมื่อนัดในจำนวนที่มากขึ้น เมื่อเทียบกับซีรัมกระต่ายก่อนการฉีดกระตุ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นนี้มีขีดจำกัด เมื่อฉีดกระตุ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป ระดับความแรงของแอนติบอดีไม่เปลี่ยนแปลง กล่าวคืออยู่ที่ไคเตอร์ 40 จนถึงสัปดาห์ที่ 19 ดังแสดงในภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบความแรงของ FITC-conjugated swine anti-rabbit Igs ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในตัวอย่างซีรัมสัปดาห์ที่ 19



ภาพที่ 3 แสดงการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในซีรัมกระต่าย (1: week 0, 2: week 2, 3: week 6, 4: week 8, 5: week 12, 6: week 16 และ 7: week 19)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเกล็ดเลือดจากนักศึกษา ชั้นปีที่ 4 ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ซึ่งมีหมู่เลือดโอ เพื่อ ป้องกันและหลีกเลี่ยงแอนติบอดีที่จะเกิดขึ้นต่อหมู่เลือดระบบ เอบีโอ นักศึกษาเป็นเพศชาย สุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ดี อย่างไรก็ตามในการเจาะเลือดครั้งละ 5 มล. เพื่อปั่นเบา และปั่นหนักในการเตรียมเกล็ดเลือดเข้มข้นยังมีจำนวน เกล็ดเลือดในการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้งไม่เท่ากัน (ค่าเฉลี่ย ประมาณ 8×10^8 cells/dose) คืออยู่ในช่วงกว้างมากตั้งแต่ $0.57-13.0 \times 10^8$ cells อย่างไรก็ตามจากแผนเดิมที่วางไว้ คือการฉีดกระตุ้นครั้งละประมาณ 1×10^8 cells/dose 500 μ L ดังนั้นจึงไม่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด การที่มีค่า เกล็ดเลือดเข้มข้นแตกต่างกันมากทั้งที่เจาะเลือดจำนวน เท่ากันทุกครั้ง อธิบายได้ว่าเป็นจากขั้นตอนในการเตรียม และการปั่นล้างเกล็ดเลือด และในการฉีดกระตุ้น ผู้วิจัย ไม่ได้ใช้สารช่วยเร่งระบบภูมิคุ้มกันแต่อย่างใด (เช่นการใช้ Freund's adjuvant) เพราะเกล็ดเลือดมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสูงอยู่แล้วเนื่องจากความหลากหลายของ

โมเลกุลบนผิวเซลล์³⁻⁶ เหตุผลที่สำคัญยิ่งอีกข้อหนึ่งคือ กระตุ้นชุดแรกที่ทำให้การฉีดกระตุ้นนั้นเกิดการอักเสบที่ บริเวณฉีด ทำให้เกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด สาเหตุ เหล่านี้อาจเกิดจากข้อบกพร่องของผู้วิจัยเอง และอีก กรณีหนึ่งคือกระต่ายที่สั่งซื้อในชุดแรกนั้นมีคุณภาพไม่ดีพอ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด ระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Platelet suspension immuno-fluorescent technique (PSIFT) พบว่าความเข้มข้นที่ เหมาะสมของ FITC-conjugated swine anti-mouse Igs คือ 1:25 เพราะให้ความแรงของสีที่มองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ได้สูง สำหรับความเข้มข้นที่ 1:50 และ 1:75 ให้ความแรงลดลงตามลำดับ ซึ่งสามารถมองเห็นได้ แต่เนื่องจากการเรืองแสงของ FITC นั้นมีการลดลงอย่างรวดเร็ว และบางครั้งพบผลลบปลอม หรือ อ่านผลได้ยากมาก หากทำการย้อมและศึกษาตัวอย่าง คราวละมากๆ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยเองที่ทำ ตัวอย่างคราวละมากๆ จะพบว่าหากใช้ความเข้มข้น 1:50 หรือ 1:75 จะเห็นสีสว่างน้อยมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้

ความเข้มข้นที่ 1:25 ซึ่งให้ความแรงและความสว่างสูงแม้เมื่อต้องใช้เวลาในการตรวจกรองนานๆ นอกจากนี้แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงแต่ก็ไม่เกิดผลบวกปลอมใน conjugate control

สำหรับการตรวจวัดระดับแอนติบอดีพบว่าให้ไตเตอร์สูงที่สุดเพียง 40 และความแรงน้อยอยู่คงที่ไป ตั้งแต่การฉีดกระตุ้นสัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป แสดงให้เห็นว่าการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลองถึงจุดสูงสุดแล้ว เพราะไม่ว่าจะฉีดกระตุ้นไปอีกเกือบสองเดือนก็ไม่เพิ่มความแรงขึ้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่าหากตรวจวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีด้วยเทคนิค flow cytometry น่าจะได้ไตเตอร์สูงกว่านี้เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ platelet markers (CD42b) และ isotype control ควบคุมกันไปด้วยทุกครั้งของการทดสอบสารเคมีทั้งสองชนิดมีราคาแพง และแม้ว่าจะใช้ในปริมาณไม่มาก แต่หากนำมาใช้ทดสอบกับตัวอย่างซีรัมซึ่งมีจำนวนมากถึง 20 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างต้องเจอจากความเข้มข้นเพื่อหากไตเตอร์ จึงยังเป็นการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเป็นทวีคูณ ผู้วิจัยจึงตัดสินใจตรวจวัดด้วยวิธี PSIFT ซึ่งแม้ว่าจะมีความไวต่ำกว่ามากก็ตาม แต่ด้วยเหตุผลที่ว่าในการนำแอนติบอดีนี้ไปใช้งานต่อไปนั้น จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์และปรับความเข้มข้นให้สูงขึ้นได้ตามต้องการ ดังนั้นแม้ว่าไตเตอร์ที่วัดได้เพียง 40 แต่สามารถทำให้บริสุทธิ์และปรับความเข้มข้นขึ้นได้ โดยเทคนิคการตกตะกอนด้วยวิธี salting out และตามด้วย DEAE-matrix ตามลำดับ จากนั้นปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ตามต้องการก่อนนำไปใช้พัฒนาเทคนิค Solid phase red cell adherence assay (SPRCA) และใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในซีรัมผู้ป่วยต่อไป ผู้วิจัยได้ทำการเจาะเลือดกระต่ายทุก 3-5 วันเพื่อปั่นแยกเก็บซีรัมแช่แข็งไว้สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ในการทำวิจัยนี้มีข้อบกพร่องและข้อคิดเห็นคือการคัดเลือกสายพันธุ์และแหล่งผลิตสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้สัตว์ทดลองที่สมบูรณ์และมีสุขภาพแข็งแรง มีความต้านทานโรค ตลอดจนความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาครั้งนี้ต้องทำการวิจัยใหม่สองครั้งเนื่องจากกระต่ายทดลองตายไปในระหว่างการฉีดกระตุ้น จากการติดเชื้อในบริเวณที่ฉีด ซึ่งผู้วิจัย

เข้าใจว่าน่าจะเกิดจากสุขภาพของกระต่ายเอง และ/หรือการฉีดสารเร่งภูมิคุ้มกัน (adjuvant) เพราะในการฉีดกระตุ้น มีการทำความสะอาดบริเวณฉีดก่อนเสมอ ปริมาตรที่ฉีดก็ไม่ได้มากจนเกินกว่าที่กระต่ายจะรับได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ด้วยงบประมาณประจำปี 2548

เอกสารอ้างอิง

1. Borne, AEGKR von dem, Ouwehand, W.H. Immunology of platelet disorders. In J.P. Caen (Ed.). Bailliere's Clinical Haematology Volume 2, London; Bailliere's Tindall, 1989: 749-781.
2. Dunstan, R.A., Simpson, M.B. Rosse, W.F. Le^a blood group antigen on human platelets. *Am. J. Clin Pathol*, 1985; 82: 90-94.
3. Muller-Eckhardt, C., Keifel, V., Santoso, S. Review and update of platelet alloantigen systems. *Trans Med Rev*, 1990; 4: 98-109.
4. Dunstan, R.A., Simpson, M.B., Knowles, R.W. Rosse, W.F. The origin of ABH antigens on human platelets. *Blood*, 1985; 65: 615-619.
5. Kunicki, T.J. Biochemistry of platelet-associated isoantigens and alloantigens. in T.J. Kunicki, J.N. George (Eds.). *Platelet Immunology*, Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989: 99-120.
6. Oriol, R., Le Pendu, J., Mollicone, R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang*, 1986; 51: 161-171.
7. Mollicone, R., Callillard, T., Le Pendu, J., Francois, A., Sansonetti, N., Villarroja, H. Expression of ABH and X(Le^x) antigens on platelets and lymphocytes. *Blood*, 1988; 71: 1113-1119.
8. Kunicki, T.J., Nurden, A.T., Pidard Russel, N.R., Canen, J.P. Characterization of human platelet glycoprotein antigens giving rise to individual immunoprecipitation in croosed immunoelectro-

- phoresis. *Blood*, 1981; 58: 1190-1197.
9. Christian Mueller-Eckhardt. Platelet allo- and autoantigens and their clinical implication. in T.N. Sandra (Ed.) Transfusion Medicine in the 1990's, Virginia: AABB Arlington, 1990: 66.
10. O'Charoen, R., Kupatawintu, P., Jitjak, N. Human platelet-specific alloantigens: Phenotype frequency in Thai blood donors: Preliminary report. *Thai J hematom Transf Med*, 1993; 3(1): 27-35.
11. Schiffer, C.A. management of patients refractory to platelet transfusion. *Prog Hematom*, 1987;15: 91-113.
12. Berndt, M.C., Chong, B.H., Andrews, R.K. Biochemistry of drug-dependent platelet autoantigens. in Kunicki, T.J., George, J.N. (Eds.) Platelet immunobiology: Molecular and clinical aspects. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989: 132-147.
13. Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V. Laboratory methods for the detection of platelet antibodies and identification of antigens. in Kunicki, T.J., George, J.N. (Eds.) Platelet immunobiology: Molecular and clinical aspects. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989: 436-453.
14. Kupatawintu P., Jitjak N., Saelee S., O-Charoen R. and Nathalang O. The Incidence of Platelet Antibody in Thrombocytopenic patients. *Thai J Hematom Transf Med*, 2000;10(2):123-7.