นิพนธ์ต้นฉบับ

Abstract : Production of anti-complement antibody for development of anti-human globulin serum for blood banking use

Preeyanat Vongchan* and Kedsarin Chantan*

The antiglobulin test is commonly used in serological laboratory, especially blood bank. Direct antiglobulin test is used to investigate the *in vivo* coating of red cells including hemolytic disease of the newborn (HDN), autoimmune hemolytic anemia and transfusion reactions. In another aspect, indirect antiglobulin test is used to detect alloantibodies in patient sera *in vitro*. Both direct and indirect antiglobulin tests are then finally observed by anti-human globulin (AHG) polyspecific reagent which contains anti-human globulin and anti-complement. Anti-complement can be used not only in antiglobulin test but a variety of immunological assays. As facilities in production of in-house antibodies are available in our laboratory, we therefore produced rabbit polyclonal antibodies specific to human complement(s) using zymozan as an inducer of complement activation pathway of AB serum from normal human. Hemagglutination of complement coated red blood cells was used to assay anti-complement in rabbit sera. We present polyclonal antibodies specific to complement C3b, C3d, C4b and C4d from our study. It was also shown that the obtained antibodies has an inhibition effect on complement induced sensitized red blood cell hemolysis. The anti-complement will be further on combine with anti human globulin to produce the working AHG reagent. Moreover, it can be used as a tool in many immunological assays. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38: 185-192.**

Key words: anti-complement, anti-human globulin polyspecific, antiglobulin test, zymozan

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

Antiglobulin test เป็นวิธีการที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาโดยเฉพาะในงานธนาคารเลือด เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จับแอนติเจนบนผิวเซลล์ในร่างกายโดยวิธี direct antiglobulin test หรือตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมที่จับแอนติเจนบนผิวเซลล์ในหลอดทดลองโดยวิธี indirect antiglobulin test เพื่อช่วยวินิจฉัยภาวะ hemolytic disease of the newborn (HDN) autoimmune hemolytic anemia และปฏิกิริยาที่เกิดจากการรับเลือด วิธีการทั้งสองต้องอาศัยน้ำยา anti human globulin (AHG) polyspecific ซึ่งประกอบด้วย anti human globulin และ anti complement ซึ่งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์งานด้านภูมิคุ้มกันวิทยาอื่นๆ ได้อีกด้วย เนื่องจากความพร้อมของห้องปฏิบัติการในการผลิตแอนติบอดีไว้ใช้งานได้เอง ผู้วิจัยจึงได้ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อคอมพลีเมนต์ในกระต่าย โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเตรียมน้ำยา AHG polyspecifc เป็นการลดการสั่งซื้อน้ำยาและยังนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นได้ การศึกษานี้ใช้ zymosan ในการกระตุ้น complement activation ในซีรัมคนปกติหมู่เลือดเอบี ระดับและความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ทดสอบโดยใช้หลักการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดที่เคลือบด้วยคอมพลีเมนต์ส่วนต่างๆ จากการศึกษาพบว่า สามารถผลิตแอนติคอมพลีเมนต์ได้ตามวัตถุประสงค์ นอกจากนี้แอนติบอดีที่ผลิตได้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เหนี่ยวนำด้วยคอมพลีเมนต์ได้อีกด้วย งานที่จะดำเนินต่อไปคือเตรียม AHG polyspecific สำหรับใช้ทดสอบด้วยวิธี antiglobulin test และเทคนิคภูมิคุ้มกันวิทยาอื่นๆ ที่อาศัยคอมพลีเมนต์ในระบบ งานวิจัยนี้จึงช่วยลดอัตราการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อแอนติคอมพลีเมนต์สำหรับใช้งานได้เป็นอย่างดี **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2548; 38: 185-192.**

คำหัส : anti-complement, anti-human globulin polyspecific, antiglobulin test, zymozan

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

Antiglobulin test แบ่งเป็น 2 แบบ คือ Direct antiglobulin test มีประโยชน์สำหรับการตรวจพิสูจน์สภาวะที่แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงถูกจับด้วยแอนติบอดีจำเพาะ แต่ยังไม่เกิดการแตกสลายหรือเกิดการเกาะกลุ่ม[1] สามารถช่วยวินิจฉัยพยาธิสภาพต่างๆ[2] ได้แก่ Hemolytic disease of the new born (HDN), Drug-induced hemolytic anemia, Autoimmune hemolytic anemia และ Transfusion reaction hemolytic anemia และ Indirect antiglobulin test ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีจับเพาะต่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในซีรัมผู้ป่วย เพื่อตรวจหาและพิสูจน์ชนิดของแอนติบอดี (antibodies identification) Cross-match หรือ compatibility test การตรวจชนิดของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง (red cell typing) การตรวจหาสาเหตุของ delayed transfusion hemolytic reaction และใช้ในการศึกษาพิเศษอื่นๆ เช่น Antiglobulin consumption test, Mixed agglutination reactions, Leukocyte and platelet antibody tests เป็นต้น

Antiglobulin serum ที่ใช้ในงานธนาคารเลือดทั่วไปส่วนใหญ่เป็นชนิด polyspecific antiglobulin reagent ซึ่งประกอบไปด้วย Anti-human globulins ซึ่งแอนติบอดีหมู่เลือดส่วนใหญ่จะเป็นชนิด IgG ได้แก่ IgG1 และ IgG3 แต่มีบางกรณีที่พบเป็น IgG2 และ IgG4 อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะพบว่าเป็น immunoglobulin ชนิดอื่นก็มีได้แม้ว่าจะพบน้อยราย เช่นเป็นแอนติบอดีชนิด IgM และ IgA ดังนั้นความจำเป็นมากสุดคือน้ำยาจะต้องประกอบด้วย Anti-human IgG เป็นหลักแต่อาจจะมี Anti-human IgM และ/หรือ Anti-human IgA และ

หากแอนติบอดีชนิดนั้นเป็นชนิดที่มี Anti-light chain activity อยู่ด้วยแล้วก็สามารถตรวจพบ human immunoglobulins ได้ทุกชนิด ส่วนประกอบชนิดที่สองคือ Anti-human complement[3] ซึ่งจะเป็นแอนติบอดีต่อ C3b, C3d, C4b และ C4d ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น Anti-C3d[4] เนื่องจากในซีรัมคนปกติจะมี complement เพื่อใช้ในการ inactive และกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย การกระตุ้น complement ถือว่าเป็น tertiary reaction ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดงสุดท้ายทำให้เกิดการทำลายของเม็ดเลือดแดงขึ้น หากการกระตุ้น complement นั้นดำเนินไปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย แต่หาก complement ที่เข้ามาทำปฏิกิริยาได้รับการกระตุ้นแต่ในระยะแรกๆ แต่ไม่เสร็จสิ้นสมบูรณ์จะทำให้ complement ที่เข้ามาทำปฏิกิริยาเกาะติดบนเม็ดเลือดแดงเท่านั้น โดยยังไม่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง complement เหล่านี้จะสามารถตรวจพบโดยใช้ Antiglobulin reagent ที่เป็นแบบ polyspecific คือมี Anti - human complement รวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังมีแอนติบอดีของหมู่เลือดบางระบบเช่น Lewis, Kidd, Duffy และ P จะตรวจพบปฏิกิริยาได้ชัดเจนขึ้นหากมี Anti-complement ในน้ำยาอีกด้วย[5]

ดังนั้นหากสามารถผลิตน้ำยาขึ้นใช้เองแทนการสั่งซื้อซึ่งสิ้นเปลืองงบประมาณและค่าใช้จ่าย จะทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก และหากมีการพัฒนาคุณภาพและได้รับการรับรองจากสถาบันภายนอกด้วยแล้วจะสามารถผลิตจำหน่ายให้หน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนทำให้ไม่ต้องสั่งซื้อน้ำยาราคาแพง เป็นการลดการนำเข้า การวิจัยเพื่อการผลิตนี้สามารถทำได้เองในหน่วยงานเนื่องจากมีเทคโนโลยี ตลอดจนอุปกรณ์พร้อมและเพียงพอ ประโยชน์ที่ได้รับอีกประการหนึ่งคือการเรียนการสอน การฝึกนักศึกษาภาคนิพนธ์ให้เรียนรู้การทำงานและการแก้ปัญหาในงานวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีและการทำวิจัยที่มีคุณภาพและมีผลผลิตอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นกระต่าย (complement coated Zymosan)

1.1 การเตรียม Zymosan A (*S. cerevisiae* cell wall) สำหรับกระต่าย 6 ตัว

ชั่ง Zymosan A 900 mg ละลายใน 30 ml dilute barbital buffer (dbb) นานประมาณ 30 นาที จากนั้นปั่นและดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง เติมน้ำเกลือ 30 ml นำไปต้ม ให้เดือดนาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและปั่นดูดน้ำเกลือทิ้ง และเติม dbb ปริมาตร 30 ml แทน ผสมให้เข้ากันแบ่ง เก็บเป็นปริมาตรเล็กๆ ในตู้เย็น

1.2 การเตรียม fresh AB serum

เจาะเลือดคนปกติสมบูรณ์แข็งแรงที่มีหมู่โลหิต AB จำนวน 3 ราย รายละ 10 ml ทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นปั่นแยกเก็บซีรัมรวมกันและแบ่งเป็นปริมาตรเล็กๆ แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C

1.3 การเตรียม Zymosan A coated with complement

นำ Zymosan A จากข้อ 1.1 แบ่งใส่หลอดทดลองปริมาตร 1.2 ml และ 0.4 ml อย่างละ 1 หลอด ปั่นล้าง 3 ครั้งที่ 1,000 g นาน 10 นาที ด้วย dbb จากนั้นดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง เจือจาง AB serum ด้วย dbb ในอัตราส่วน 1:20 จากนั้นเติม diluted AB serum ปริมาตร 12 ml (10 เท่าของปริมาตร zymozan) ลงในหลอดที่มี zymozan 1.2 ml ส่วนหลอดที่เหลือเติม dbb 4 ml (10 เท่าของปริมาตร zymozan) อุ่นหลอดทั้งสองในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาปั่นและดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นปั่นล้างอีก 6 ครั้งด้วย dbb สุดท้ายดูดบัฟเฟอร์ทิ้งให้หมดเติมน้ำเกลือปริมาตร 12 ml ลงในหลอดที่มี zymozan 1.2 ml ซึ่งเป็น complement coated zymozan A สำหรับแบ่งฉีดกระต่ายจำนวน 5 ตัว ส่วนหลอดที่เหลือหลังปั่นล้างเติมน้ำเกลือ 4 ml ซึ่งเป็น zymozan A control สำหรับฉีดกระต่ายชุดควบคุม

1.4 การฉีดกระตุ้นกระต่าย

แบ่งกระต่ายเป็น 2 ชุด ชุดแรกจำนวน 5 ตัว ฉีดด้วย complement coated zymozan A ตัวละ 2 ml ชุดที่สองจำนวน 1 ตัวฉีดด้วย zymozan A โดยมีขั้นตอนและวิธีการฉีดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขั้นตอนและวิธีการฉีดกระตุ้นกระต่าย

Day	Information	Number of booster and bleed
0	bleed i.v &immunize	1st
4, 8, 12, 16, 20	Booster i.v	2nd – 6th
30	Bleed	2nd
Rest for 6 weeks for antibody screening		
72	Booster i.m	7th
76, 80	Booster i.v	8th – 9th
	Rest for 10 days	
90	Bleed	3rd

2. การทดสอบแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในซีรัม กระต่ายด้วยวิธี Hemagglutination

2.1 การเตรียม C3b coated red blood cells

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง ปั่นแยกพลาสมาและเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ดูดน้ำเกลือทิ้ง เจือจางพลาสมาด้วยน้ำเกลือ 1:50 และนำพลาสมาที่เจือจางแล้วนี้ปริมาตร 2 ml เติมลงใน washed packed red cells จากนั้นเติม sensitizing diluent for C3b coating cells (เย็นและกวนอยู่ตลอดเวลา) ปริมาตร 39.6 ml และเติม 0.4M MgCl2 ปริมาตร 0.2 ml ลงไปทันที ผสมกันบน magnetic plate ที่อุณหภูมิ 0 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาปั่นล้างเซลล์ 4 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.2 การเตรียม C3d coated red blood cells

เตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1 ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed C3b coated RBC (ข้อ 2.1) ปริมาตร 0.4 ml กับ working trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.3 การเตรียม C4b coated red blood cells

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดปริมาตร 2 ml ผสมกับ 10% sucrose ปริมาตร 20 ml ผสมให้เข้ากันและอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.4 การเตรียม C4d coated red blood cells

เตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1 ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed C3b coated RBC (ข้อ 2.3) ปริมาตร 0.4 ml กับworking trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.5 วิธีเตรียม uncoated red blood cell

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง ปั่นแยกพลาสมาและเซลล์ ล้างเซลล์ 4 ครั้ง ด้วย NSS ปรับเป็น 2% cell suspension ก่อนนำไปทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.6 การเตรียม trypsin treated red blood cell

เตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1 ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed red blood cell ปริมาตร 0.4 ml กับ working trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นใน

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

2.7 การทดสอบ Anti-complement ในซีรัมกระต่าย

เจือจางซีรัมกระต่ายด้วยน้ำเกลือแบบ serial ten-fold dilution นำซีรัมที่เจือจางดังกล่าวนี้จำนวน 2 หยด ผสมกับเม็ดเลือดแดงที่มีและไม่มีคอมพลีเมนต์เคลือบอยู่ในลักษณะต่างๆ จากข้อ 2.1-2.6 จำนวน 1 หยด ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย serofuge ผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดในหลอดทดสอบใดแสดงว่ามีแอนติบอดีจำเพาะต่อคอมพลีเมนต์ชนิดนั้นๆ ในซีรัมกระต่าย

3. การทดสอบความสามารถของ แอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีรัมสำหรับทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

เจาะเลือดคนปกติหมู่เลือด A, B และ O ทิ้งไว้ให้แข็งตัวและปั่นแยกซีรัมไว้ ส่วนเม็ดเลือดแดงเตรียมเป็น 3% ด้วยน้ำเกลือ ส่วนซีรัมเจือจางเป็น serial two-fold dilution ด้วยน้ำเกลือเช่นกัน นำซีรัม 2 หยดทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีในซีรัมจำนวน 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาโดยเลือกเฉพาะชุดที่ให้ผลเป็นการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (complete hemolysis)

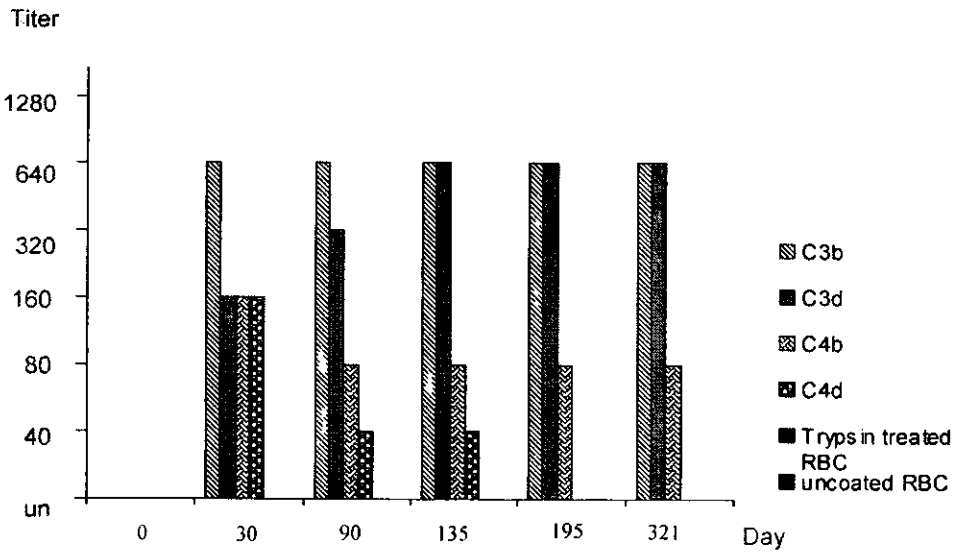
3.2 การทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงของ Anti-complement ในซีรัมกระต่าย

เจือจางซีรัมกระต่ายที่ inactivate ด้วยอุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาทีเป็น serial two- fold dilution ผสมซีรัมจำนวน 2 หยดกับซีรัมคนที่มีความเข้มข้นเหมาะสม (จากข้อ 3.1) จำนวน 2 หยด เติม 3% cell suspension ที่มีแอนติเจนที่ตรงกับแอนติบอดีในซีรัมจำนวน 1 หยด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านผลการเกิดปฏิกิริยา หากเกิดการเกาะกลุ่มแสดงว่าแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในซีรัมกระต่าย สามารถยับยั้งการทำงานของคอมพลีเมนต์ในซีรัมของคน ทำให้ไม่เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง

ผลการทดลอง

กระต่ายที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย complement coated cells ทั้ง 5 ตัว สามารถสร้างแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ทุก components ได้ โดยพบว่าสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ complement coated cells ทุกๆ ชนิดที่เตรียมได้ โดยมีระดับความแรงของแอนติบอดีต่อ component ต่างๆ แตกต่างกันไป กราฟแสดงการทดสอบของกระต่ายหนึ่งในห้าตัวแสดงในรูปที่ 1 โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ trypsinized cell control หรือ uncoated cell control แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในกระต่ายทั้ง 5 ตัว นอกจากนี้การศึกษาในซีรัม กระต่ายชุดควบคุมซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย zymozan พบว่าไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับ complement coated cells ชนิดต่างๆ ด้วย (ตารางที่ 2) แสดงว่าการเกาะกลุ่มของ complement coated cells เป็นผลจากแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์เท่านั้น ไม่ได้เกิดจากผลของแอนติบอดีต่อ zymozan อย่างไรก็ตามความแรงของแอนติบอดีต่อ component ต่างๆ ไม่เท่ากัน โดยพบว่าแอนติบอดีต่อส่วน C3b และ C3d มีความแรงมากกว่าแอนติบอดีต่อส่วน C4b และ C4d

การทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคอมพลีเมนต์ พบว่าแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายทุกตัวสามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ การทดสอบของกระต่ายหนึ่งในห้าตัวแสดงในตารางที่ 3 โดยที่กระต่ายชุดควบคุมซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย zymozan ไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว (ตารางที่ 4) การทดสอบนี้เลือกทำเฉพาะกับชุดเซลล์และซีรัมที่ทำปฏิกิริยากันแล้วให้ผลการแตกของเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาพบว่าการสร้างแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์จะเริ่มพบได้หลังจากฉีดกระตุ้นนาน 30 วัน และความแรงของแอนติบอดียังคงอยู่ได้นานถึงวันที่ 321 ในกระต่ายบางตัว



รูปที่ 1 ระดับแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในซีรัมกระต่าย A ในวันต่างๆ หลังฉีดกระตุ้น

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบซีรัมกระต่าย F ก่อนและหลังการฉีดกระตุ้น กับ complement coated cells

Dilution/condition	C3b	C3d	C4b	C4d	trypsin treated	uncoated
Preimmunized serum						
Undiluted	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1:10	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1:20	2+	2+	2+	2+	2+	2+
1:40	Neg	1+	Neg	Neg	2+	Neg
1:80	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:160	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Day 30 after immunization						
Undiluted	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1:10	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1:20	1+	2+	2+	2+	2+	1+
1:40	Neg	1+	Neg	1+	Neg	Neg
1:80	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1:160	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

ตารางที่ 3 แอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในซีรัมกระต่าย A ยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

Dilution-Day	0	30	90	135	195	321
cell B vs Serum O						
undilute	PH	4+	4+	4+	4+	4+
1:2	PH	4+	4+	4+	4+	4+
1:4	PH	PH	PH	PH	PH	PH
Cell A vs Serum O						
Undiluted	PH	4+	4+	4+	4+	4+
1:2	PH	4+	4+	4+	4+	4+
1:4	PH	PH	PH	PH	4+	PH
1:8	PH	PH	PH	PH	PH	PH

ตารางที่ 4 แอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในซีรัมกระต่าย F ไม่สามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

Dilution-Day	0	30	90	135
Cell B vs Serum O				
undilute	PH	PH	PH	PH
1:2	PH	PH	PH	PH
1:4	PH	PH	PH	PH
Cell A vs Serum O				
Undiluted	PH	PH	PH	PH
1:2	PH	PH	PH	PH
1:4	PH	PH	PH	PH

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ตั้งวัตถุประสงค์เพื่อผลิต polyclonal antibodies ที่จำเพาะต่อคอมพลีเมนต์ของมนุษย์ จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายจำนวนทั้งหมด 6 ตัว โดยการแบ่งกระต่ายออกเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ 1 ฉีดกระตุ้นด้วย Zymosan A coated with complement ได้แก่ กระต่าย A, B, C, D และ E และชุดที่ 2 ฉีดกระตุ้นด้วย Zymosan A เพื่อเป็นชุดควบคุมได้แก่กระต่าย F ในการตรวจหา Anti-complement โดยวิธี Hemagglutination พบว่ากระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ทุกส่วนได้แก่ C3b, C3d, C4b และ C4d ทั้งนี้โดยวัตถุประสงค์ต้องการเพียง Anti-C3d อธิบายได้ว่าผู้วิจัยทำการเตรียมแอนติเจนโดยใช้ซีรัมคนปกติสมบูรณ์แข็งแรงที่มีหมู่โลหิต AB เป็นแหล่งของคอมพลีเมนต์ซึ่งมีคอมพลีเมนต์หลายชนิด

อยู่ในซีรัม อย่างไรก็ตามในการเตรียมน้ำยา AGH polyspecific แม้ว่าจะมี Anti – C3b ก็น่าจะทำให้การตรวจมีความไวมากขึ้น ดังนั้นหากต้องการเฉพาะ Anti-C3b และ Anti-C3d ก็สามารถทำได้โดยการดูดซับ Anti-C4b และ Anti-C4d ที่ไม่ต้องการออกด้วยเม็ดเลือดแดงที่เคลือบด้วยคอมพลีเมนต์ C4b และ C4d การศึกษายังพบด้วยว่าแอนติบอดีที่ได้มีระดับคงที่จากการเก็บเลือดกระต่ายในวันที่ 30 และ 90 เป็นผลจากการที่ผู้วิจัยทำการเก็บซีรัม กระต่ายหลังจากการฉีดกระตุ้น 30 วันแล้ว ซึ่งเป็นระยะเวลาที่แอนติบอดีขึ้นสูงแล้ว

อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นในการศึกษาคือกระต่ายที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นมีความสมบูรณ์น้อย ทำให้การทดลองในครั้งแรกมีการสูญเสียกระต่ายไปทั้งหมด และต้องเริ่มทำการทดลองใหม่ ทำให้เสียเวลา เสียค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนี้ในการเตรียม complement coated cell นั้น ควรต้องมีการทดสอบด้วย commercial anti-complement component ต่างๆ เพื่อพิสูจน์ว่าเตรียมเซลล์ได้ตามวัตถุประสงค์ แต่เนื่องจากแอนติบอดีดังกล่าวมีราคาแพงมาก จึงสามารถพิสูจน์ได้เพียงชนิดคือ C4d coated cell ซึ่งผู้วิจัยได้อนุมานว่าการเตรียมเซลล์ในลักษณะอื่นน่าจะได้ผลตามที่ควรจะเป็น

จากการทดสอบความสามารถของ แอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยคอมพลีเมนต์ โดยปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีของหมู่เลือดพบความสามารถของแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ขึ้นกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่บนเม็ดเลือดแดง ปริมาณแอนติบอดี และปริมาณคอมพลีเมนต์ที่มีอยู่ในแต่ละบุคคลไม่เท่ากันจึงทำให้ผลการทดสอบไม่เท่ากัน แต่พบว่านอกจากสามารถผลิตแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนต์ได้แล้ว แอนติบอดีดังกล่าวยังมีความสามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ด้วย

การศึกษาต่อไปคือการเตรียม anti-human globulin serum (polyspecific) ซึ่งได้จากการรวมกันระหว่าง anti-human globulin และ anti-human complement ในความเข้มข้นที่เหมาะสม และทดสอบกับ sensitized red blood cell เปรียบเทียบกับ commercial reagent

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Industrial and Research Project for Undergraduate Students (IRPUS), สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย (สกว) ที่สนับสนุนทุนสำหรับการทำวิจัย และขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากร ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนด้านต่างๆ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ เพื่อให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ต่อเนื่องต่อไป

References

1. Coombs RAA, Mourant AE and Race RR. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Br J Exp Pathol 1945; 26: 255-66.
2. Mollison PL, Engelfriet FP and Contrearas M. Blood transfusion in clinical medicine 10th Edition. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1983.
3. Mollison PL, Engelfriet FP and Contrearas M. Blood transfusion in clinical medicine 7th Edition. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1998.
4. Garratty G and Petz LD. The significance of red cell bound complement components in development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera. Transfusion 1976; 16: 297.
5. วารุณี คุณาชีวะ และคณะ เอกสารคำสอนกระบวนวิชา 506312 ภูมิคุ้มกันโลหิตวิทยาและธนาคารเลือด ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2546