บทคัดย่อ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่มีบทบาทในการรักษาสมดุลของร่างกายโดยทำหน้าที่ในการป้องกันร่างกายจากเชื้อโรค เซลล์ที่ผิดปกติและเซลล์มะเร็ง โดยมีเม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวและก่อให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวมากมายและได้ถูกตั้งชื่อให้เป็นระบบที่เรียกว่า cluster of differetiation (CD) ในปัจจุบันมีการค้นพบโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้วถึง 339 โมเลกุลคือ CD1-CD339 อย่างไรก็ตามเชื่อกันว่ายังมีโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีการค้นพบ ดังนั้นบทบาทที่สำคัญของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ยังไม่มีการค้นพบจะต้องมีการศึกษาต่อไป โดยความร่วมมือกับ รศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์ ได้ผลิต โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชื่อ CA-1H4 ขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 ย้อมกับเซลล์ Molt4 ให้ผลเป็น heterogeneous pattern และที่น่าสนใจคือ โมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Molt4 มีการตายแบบอะพอบโทซิส เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการศึกษามาก่อน ผู้วิจัยคิดว่าโมเลกุล CA-1H4 น่าจะเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนจนถึงปัจจุบัน จึงได้วางแผนที่จะศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ของโมเลกุล CA-1H4 โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 แต่เป็นที่น่าเสียดายไฮบริโดมาที่ผลิต โมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 เป็นโคลนที่ไม่คงตัวและหยุดการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตไฮบริโดมา โคลนใหม่ที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีเหมือนกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 โดยผู้วิจัยทำการแยกเซลล์ Molt4 ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CA-1H4 เรียก Molt4-CA-1H4^{+} ออกจากเซลล์ Molt4 โดยเทคนิค magnetic bead cell sorting และ limiting dilution ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเซลล์ Molt4-CA-1H4^{+} ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CA-1H4 ประมาณ 80-98% นานถึง 3 เดือน เซลล์ดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจนในการฉีดกระตุ้นหนู Balb/c ต่อมาทำการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีโดยวิธีมาตรฐาน จากโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งหมดพบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 3 โคลนชื่อ MOS-2G10, FE-1H10 และ MOS-2B3 สร้างแอนติบอดีที่ให้รูปแบบการย้อมเหมือนกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 ต่อมาโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งสามชนิดนี้จึงถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและหน้าที่ได้แก่ การแบ่งตัวของเซลล์ การเกาะกลุ่มของเซลล์และอะพอบโทซิส เปรียบเทียบกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี CA-1H4 ผลการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี MOS-2G10, FE-1H10 และ MOS-2B3 ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์และการเกาะกลุ่มของเซลล์ อย่างไรก็ตามพบว่า มีเพียงโมโนโคลนอล แอนติบอดี MOS-2G10 เท่านั้นที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ Jurkat มีการตายแบบอะพอบโทซิส จากการศึกษานี้ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี MOS-2G10 ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับ CA-1H4 โดยวิธี magnetic bead cell sorting ได้และน่าจะนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีดังกล่าวไปใช้แทน CA-1H4 เพื่อศึกษากลไกการตายแบบอะพอบโทซิสต่อไป

The immune system plays a role in maintaining the homeostasis of health by protecting the body from pathogens, mutated cells and oncogenic cells. Leukocytes are cells, which play a major role in the immune system. In recent years, several studies have demonstrated that leukocyte surface molecules are responsible for leukocyte communications leading to immune response. To date, leukocyte surface molecules are named systematically by assigning them as cluster of differentiation (CD) antigen number and more than 339 molecules (CD1-CD339) were discovered. However, various molecules were believed to be un-discovered. Therefore, functional roles of un-discovered leukocyte surface molecules are going to be studied by various researchers. By the co-operation with Assoc. Prof. Watchara Kasinrerk, we generated a monoclonal antibody (mAb) against leukocyte surface molecule named CA-1H4 in our laboratory. From the previous study, we found that mAb CA-1H4 stained with heterogeneous pattern on Molt4 T cell line. Moreover, CA-1H4 mAb induced apoptosis of Molt4 cell line. Comparison with previous reports, CA-1H4 may be a new molecule that has not been reported so far. We planed to study biochemical property and function of CA-1H4 molecule using CA-1H4 mAb. Unfortunately, hybridoma producing CA-1H4 mAb are un-stable clone and stop to produce mAb CA-1H4. To solve this obstacle, we have an idea to generated new hybridoma clone that secrete mAb as same as CA-1H4 mAb. To reach objective, we therefore isolate Molt4 expressing CA-1H4 line (Molt4-CA-1H4^{+}) from Molt4 T cell line by magnetic bead cell sorting technology and limiting dilution. The isolated Molt4-CA-1H4^{+} line expressed CA-1H4 molecule approximately 80-98% for more than 3 months. This line was used as an immunogen to immunize Balb/c mice. Then, mAb production was performed by standard hybridoma technique. Among the produced mAbs, 3 hybrid clones (named MOS-2G10, FE-1H10 and MOS-2B3) secret mAb that have staining pattern with leukemic cell lines and peripheral blood cells as same as CA-1H4 mAb. Then, these three mAbs were used in biochemical and functional study including cell proliferation, cell aggregation and apoptosis compared with mAb CA-1H4. Functional study indicated that mAb MOS-2G10, FE-1H10 and MOS-2B3 did not involve in cell proliferation and cell aggregation. Interestingly, mAb MOS-2G10 could induce apoptosis of Jurkat cell line as was observed by mAb CA-1H4. From this study, we could produce MOS-2G10 mAb that had property as same as CA-1H4 mAb, by magnetic bead cell sorting. This mAb will be used instead of CA-1H4 mAb to further study the mechanism of induction of cell apoptosis.