บทที่ 4
ผลการวิจัย

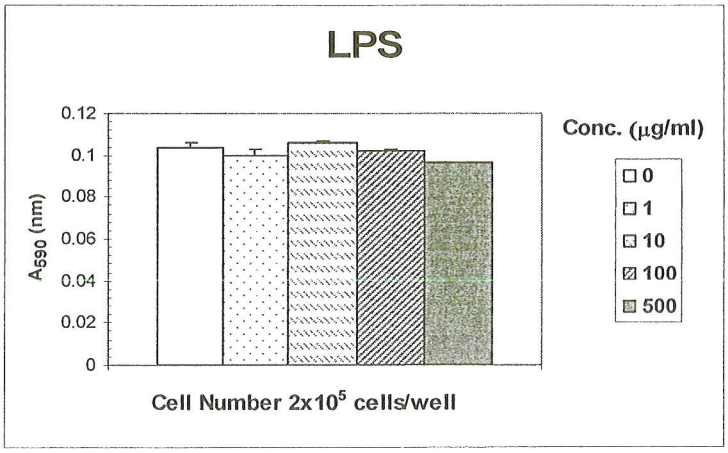
การพัฒนาวิธีการทดสอบ mitogenesis

การทดสอบ mitogenesis เป็นการวัดความสามารถของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อสาร mitogen ชนิดต่าง ๆ ในงานทดลองนี้ ใช้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน คือ T และ B เซลล์ที่อยู่ใน single cell suspension เตรียมจากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 และเลือก mitogen 2 ชนิดคือ LPS และ Con A เพื่อใช้กระตุ้น B และ T เซลล์ตามลำดับ และเลือก PWM ซึ่งเป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B เซลล์ ในการพัฒนาวิธีทดสอบ เลือกการใช้ MTT colorimetric assay วัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ mitogen แทนวิธีมาตรฐานที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี titrium thymidine ([^{3}H]-TdR) ในการวัดการตอบสนอง

1. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ LPS mitogen

1.1 การหาความเข้มข้นของ LPS ที่เหมาะสมในการทดสอบ

รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10 ,100 และ 500 μg/ml ภายหลังการบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ จำนวนเซลล์ใน culture เป็น $2x10^5$ เซลล์/ml ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ตามวิธีมาตรฐานที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการวัดการตอบสนองของเซลล์ ผลการทดลองชี้ชัดว่า LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10 ,100 และ 500 μg/ml ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte ต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี LPS ดังนั้น ในการประเมินการตอบสนองของเซลล์โดยใช้ MTT จึงไม่สามารถใช้จำนวนเซลล์ใน culture เช่นเดียวกับวิธีมาตรฐานของการใช้ [^{3}H]-TdR ปิดฉลาก DNA เพื่อประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการตอบสนองต่อ mitogen และในการทดลองนี้ ไม่สามารถตัดสินได้ว่าความเข้มข้นใดของ LPS ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ เพราะทุกความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้

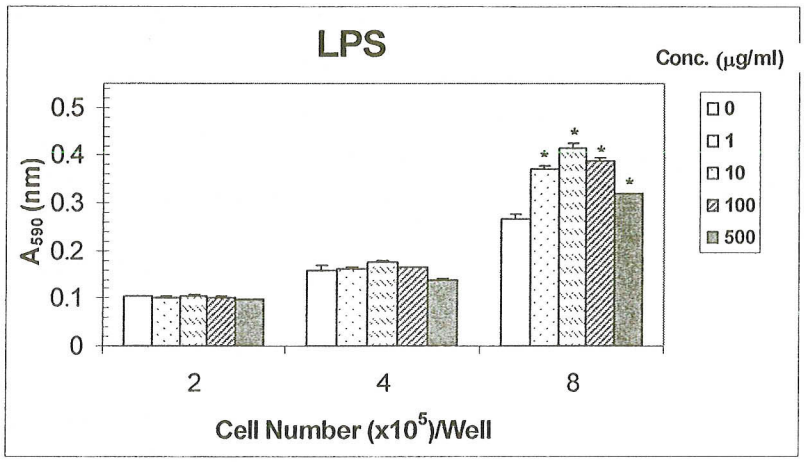


รูปที่ 2 การตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml เมื่อระยะเวลา 24 ชม.

1.2 การหาความเข้มข้นของ เซลล์ ที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ LPS

เนื่องจากการใช้ MTT ในการประเมินความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ mitogen มีความไวน้อยกว่าการใช้ [^{3}H]-TdR จึงทดลองเพิ่มจำนวนเซลล์ใน culture ให้มีปริมาณสูงขึ้นจากเดิม $2x10^5$ เซลล์/หลุม เป็น $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบ และกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 μg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 3 จากรูปชี้ชัดว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ซึ่งหมายถึงการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนตามจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นใน culture โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ใน culture จาก $2x10^5$ เป็น $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ตามลำดับ ส่วนการเพิ่มการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 μg/ml จะมีค่าที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่มี mitogen) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) ทุกความเข้มข้น พบเฉพาะใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุมเท่านั้น แต่เมื่อใช้จำนวนเซลล์เป็น $2\ x10^5$ หรือ เพิ่มจำนวนเป็น $4x10^5$ เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี LPS mitogen ดังนั้น ปริมาณเซลล์ $2\ x10^5$ และ $4\ x10^5$ เซลล์/หลุม จึงไม่เหมาะสมสำหรับการวัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen โดยวิธี MTT ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ $8\ x10^5$ เซลล์/หลุม LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, และ 500 μg/ml สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 40, 56.23, 46.79 และ 20.38 % ตามลำดับ ดังนั้น ช่วงความ

เข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS ที่สามารถกระตุ้น lymphocyte ให้ตอบสนองอยู่ที่ 1-100 μg/ml โดยความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นได้สูงสุดอยู่ที่ 10 μg/ml

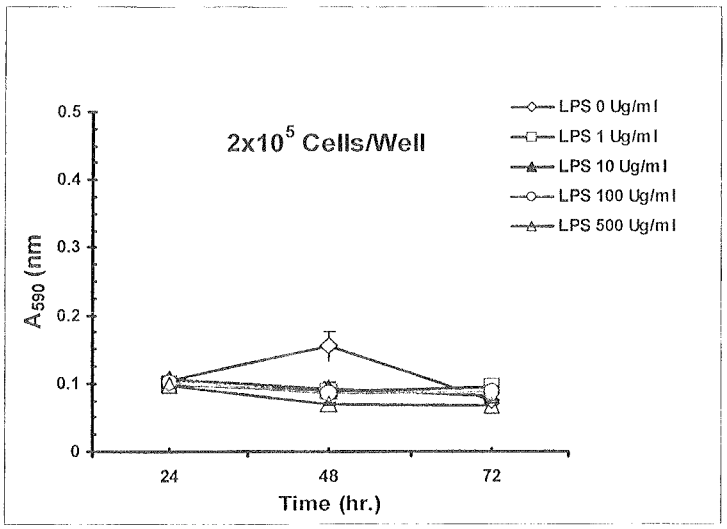


รูปที่ 3 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)

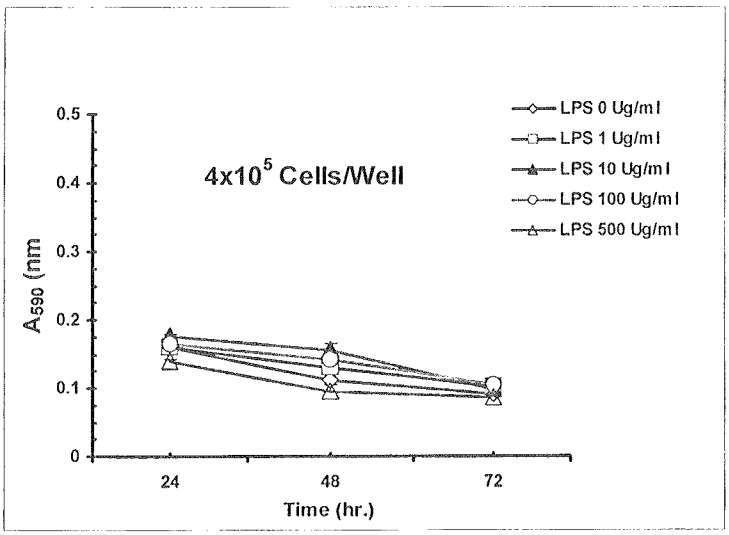
1.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ LPS

นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเซลล์ใน culture และความเข้มข้นของ mitogen ระยะเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการตอบสนองในการทดสอบ mitogenesis จึงได้ทำการทดลองแปรผันระยะเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen โดยใช้เซลล์ที่มีปริมาณ 2 x10^5 4 x10^5 และ 8 x10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ LPS 1, 10, 100 และ 500 μg/ml เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม เพื่อหาระยะเวลาของการบ่มเซลล์ที่เหมาะสม ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4-6 ผลการทดลองชี้ชัดว่า ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 2x10^5 (รูปที่ 4) และ 4x10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 5) การเพิ่มระยะเวลาการบ่มเซลล์กับ LPS mitogen เป็น 48 และ 72 ชม. ไม่ได้ช่วยให้เซลล์ตอบสนองต่อ LPS ได้ทุกความเข้มข้น ส่วน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 8x10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 6) ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS หรือกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1, 100 และ 500 μg/ml จะมีปริมาณเซลล์ (ในกรณีของกลุ่มควบคุม) หรือการตอบสนองต่อ mitogen (กลุ่มที่ได้รับ mitogen) สูงสุดที่ 24 ชม. หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์หรือการตอบสนองจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ($p \leq 0.05$) ส่วน culture ที่กระตุ้นด้วย LPS 10 μg/ml ยังคงให้การตอบสนองสูงสุดไม่ว่าจะเป็นที่ 24, 48 และ 72 ชม. และการตอบสนองไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมากนักที่ช่วงระยะเวลา 24-72 ชม. จากรูปที่ 6 ถึงแม้การตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ที่ 1 และ 100

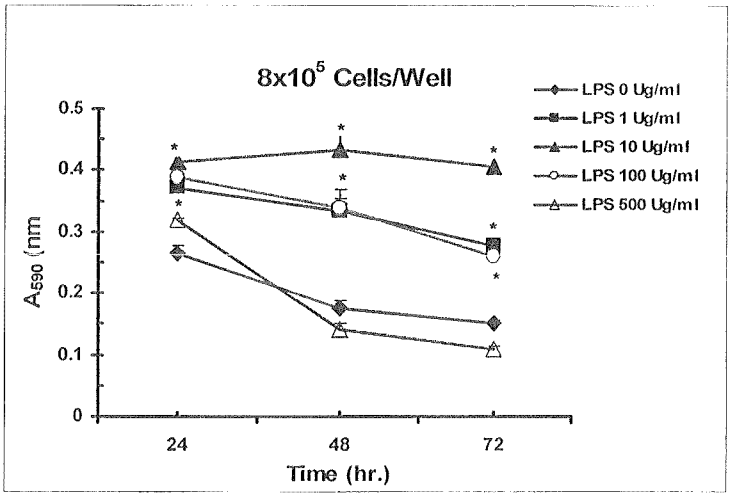
μg/ml จะลดลงภายหลัง 24 ชม แต่ LPS ที่ความเข้มข้น 1 และ100 μg/ml ก็ยังสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น การทดลองชี้แนะว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม lymphocyte กับ LPS ที่เหมาะสมที่สุดคือระยะเวลา 24 ชม. ที่ความเข้มข้น LPS 1-100 μg/ml ส่วน LPS ที่ความเข้มข้นสูงมาก ๆ คือ 500 μg/ml ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบ เพราะนอกจากสิ้นเปลืองสารแล้ว ยังไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองได้ภายหลัง 24 ชม. (รูปที่ 6)



รูปที่ 4 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $2x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม



รูปที่ 5 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.

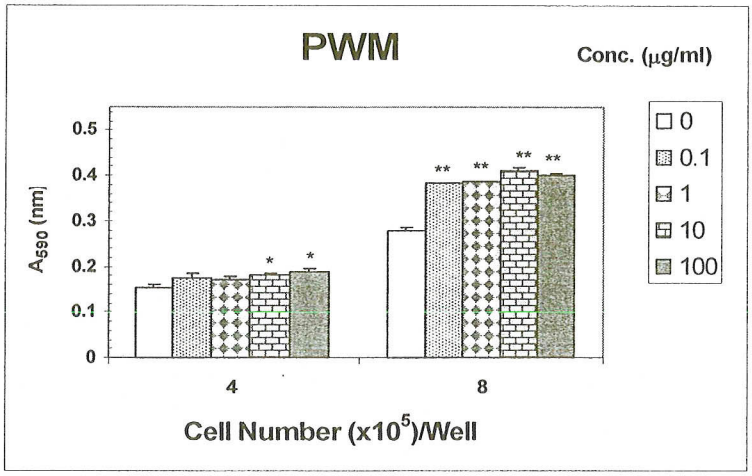


รูปที่ 6 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ LPS ที่ 1-500 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)

2. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ PWM mitogen

2.1 การหาความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมในการทดสอบ

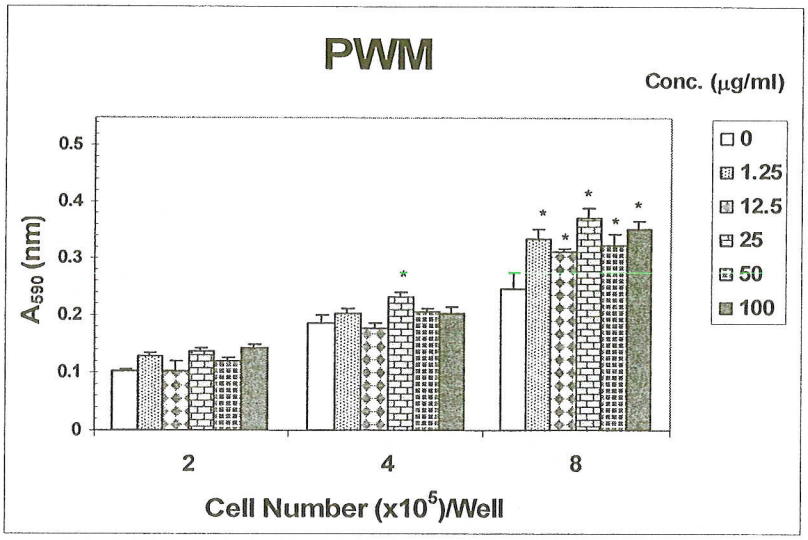
รูปที่ 7 แสดงผลการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 μg/ml ภายหลังการบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ จำนวนเซลล์ใน culture เป็น $4x10^5$ เซลล์/หลุม และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ผลการทดลองชี้แนะว่า PWM ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 , และ 100 μg/ml สามารถกระตุ้นให้ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม เกิดการตอบสนองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) จากกลุ่มควบคุม ประมาณ 36.4, 37.5, 46.4 และ 42.9 % ตามลำดับ แต่ใน culture ที่มีปริมาณเซลล์ $4x10^5$ เซลล์/หลุม การตอบสนองจะเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเพียง 17.6 และ 22.2% ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้ PWM ที่มีความเข้มข้นสูงคือ 10 และ 100 μg/ml เท่านั้น



รูปที่ 7 แสดงการตอบสนองของ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่มีความเข้มข้น 0.1-100 μg/ml (* และ ** หมายถึง ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.001$ ตาม ลำดับ)

2.2 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม ในการตอบสนองต่อ PWM

ในการทดลองหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม ทดลองใช้ความเข้มข้นของเซลล์ $2x10^5$, $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ PWM ที่ 1.25, 12.5, 25 , 50 และ 100 μg/ml และบ่มร่วมกับเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง (รูปที่ 8) ชี้แนะว่า จำนวนเซลล์ใน culture ต้องมีปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม จึงสามารถตอบสนองต่อ PWM ได้ ถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำเหมือนวิธีมาตรฐานคือ $2x10^5$ เซลล์/หลุม จะไม่เกิดการตอบสนองต่อ PWM ปริมาณเซลล์เพิ่มเป็น $4x10^5$ เซลล์/หลุม การตอบสนองต่อ PWM จะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen เฉพาะ culture ที่กระตุ้นด้วย 25 μg/ml เท่านั้น โดยมีการตอบสนองเพิ่มขึ้น 25% ($P \leq 0.05$) culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม การตอบสนองจะต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen ทุกความเข้มข้นของ PWM โดยการตอบสนองเพิ่มขึ้นประมาณ 34.1, 27.8, 51.8, 32.7 และ 44.1% ที่ความเข้มข้นของ PWM 1.25, 12.5, 25, 50 และ 100 μg/ml ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ดังนั้น การทดลองชี้แนะว่า ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบคือ $8x10^5$ เซลล์/หลุม และ PWM 25 μg/ml สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงสุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ 2.1 ที่ชี้แนะว่า ความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 10-100 μg/ml

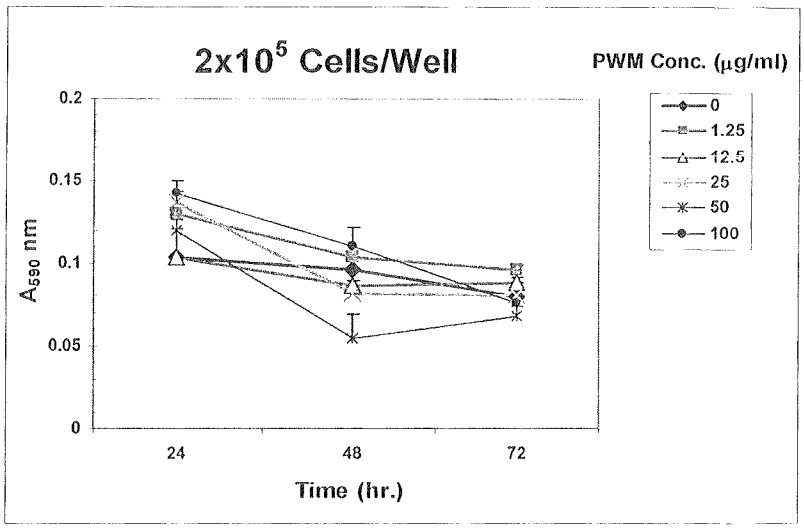


รูปที่ 8 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)

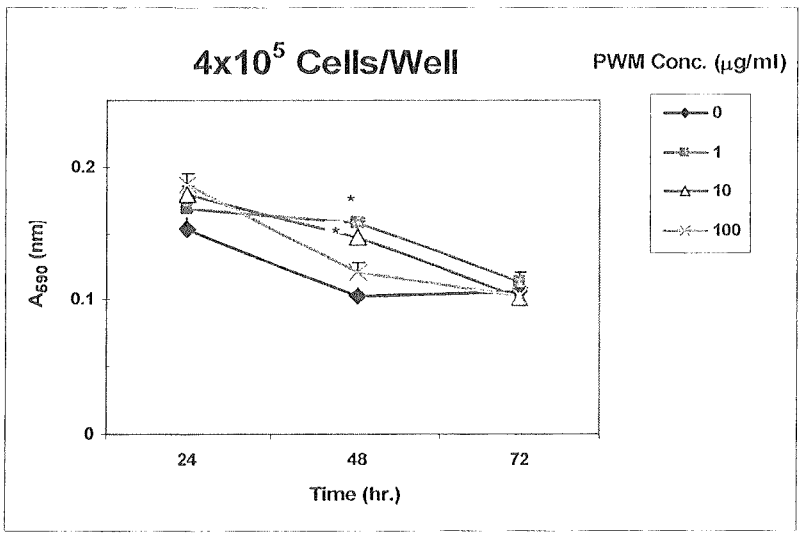
2.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ PWM

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสม ใช้เซลล์ $4x10^5$ และ $8\ x10^5$ เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย PWM, 1, 10 และ 100 μg/ml หรือใช้เซลล์ $2x10^5$ เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย PWM, 1.25, 12.5, 25, 50 และ 100 μg/ml และบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ผลการทดลองแสดงว่า การตอบสนองต่อ PWM สูงสุดที่ 24 ชม. หลังจากนั้น การตอบสนองลดลงเมื่อระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ (รูปที่ 9-11) ใน culture ที่ใช้ $2x10^5$ เซลล์/หลุม ไม่เกิดการตอบสนองต่อ PWM ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ไม่ว่าจะบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (รูปที่ 9) ที่ปริมาณเซลล์ $4x10^5$ เซลล์/หลุม เมื่อบ่มร่วมกับ PWM ที่ 1 และ 10 μg/ml เป็นระยะเวลา 48 ชม.จะเกิดการตอบสนองสูงกว่ากลุ่มควบคุม 53.4 และ 42.7% ($p \leq 0.05$) ตามลำดับ (รูปที่ 10) แต่ค่าการตอบสนองยังคงอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับ culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม (รูปที่ 10-11) การตอบสนองของ culture ที่ใช้ $4x10^5$ เซลล์/หลุม ต่อความเข้มข้นอื่นของ PWM และที่ระยะเวลาอื่น ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10) ส่วน culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม มีการตอบสนองต่อ PWM ทุกความเข้มข้นที่ใช้ และต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) ที่ 24 ชม. (รูปที่ 11) หลังจากนั้น การตอบสนองลดลงที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลา 48 ชม. ยังคงมีการตอบสนองต่อ PWM 1 μg/ml สูงกว่ากลุ่มควบคุมอยู่ประมาณ 44% ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 11)

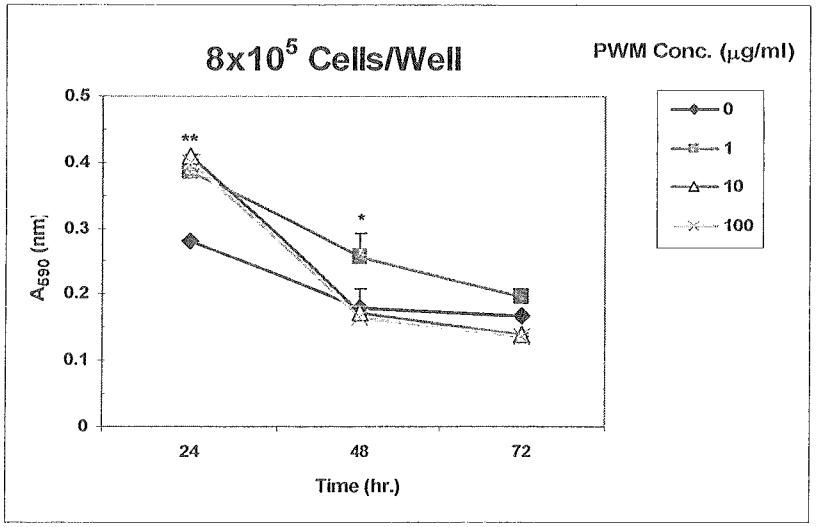
ดังนั้น การทดลองชี้ชัดว่า การตอบสนองต่อ PWM เกิดสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชม. ใน culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม



รูปที่ 9 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $2x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\,nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.



รูปที่ 10 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\,nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)

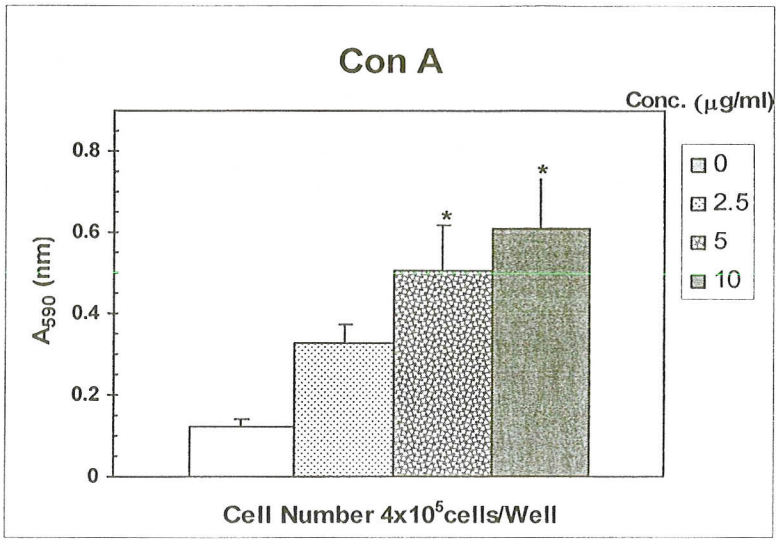


รูปที่ 11 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (**, * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.001$ และ 0.05 ตามลำดับ)

3. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ Con A mitogen

3.1 การหาความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมในการทดสอบ

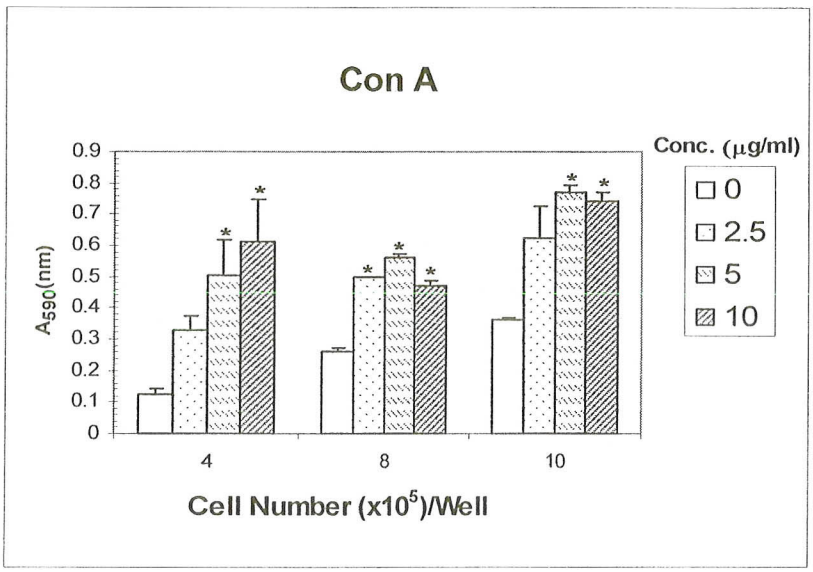
ในการหาความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมในการทดสอบ ใช้แซลล์ $4x10^5$ เซลล์/หลุม ซึ่งสูงกว่าวิธีมาตรฐานคือ $2x10^5$ เซลล์/หลุม เนื่องจากผลจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าจำเป็นต้องใช้เซลล์สูงกว่าวิธีมาตรฐาน จึงสามารถวัดการตอบสนองทั้งต่อ LPS และ PWM การทดลองใช้ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 μg/ml และวัดการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง (รูปที่ 12) แสดงว่า Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 μg/ml สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen 2.66, 4.11 และ 4.95 เท่าตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 5 และ 10 μg/ml ($p \leq 0.01$) ดังนั้น ความเข้มข้นของ Con A ในช่วง 2.5 - 10 μg/ml จึงเหมาะสมต่อการทดสอบ เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ $4x10^5$ เซลล์/หลุม Con A 5 และ 10 μg/ml สามารถกระตุ้นการตอบสนองสูงกว่าที่ 2.5 μg/ml



รูปที่ 12 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)

3.2 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการตอบสนอง Con A

ในการทดลองใช้ความเข้มข้นของเซลล์ $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ Con A mitogen 2.5, 5, และ 10 μg/ml บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งชี้แนะว่าเมื่อใช้เซลล์ในปริมาณสูง คือ $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม สามารถตอบสนองต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg.ml ได้ดี ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ใน culture ที่มี Con A 5 และ 10 μg/ml มีค่าสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen ทุกความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ โดยเฉพาะใน culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม การตอบสนองสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทุกความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้

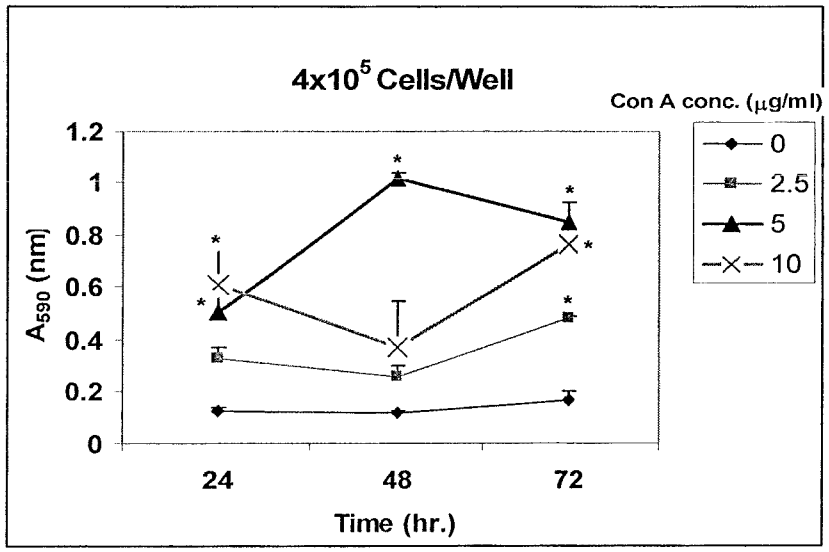


รูปที่ 13 การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A 2.5-10 μg/ml ของ culture ที่มีปริมาณเซลล์ $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. หลังจากกระตุ้นด้วย Con A (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)

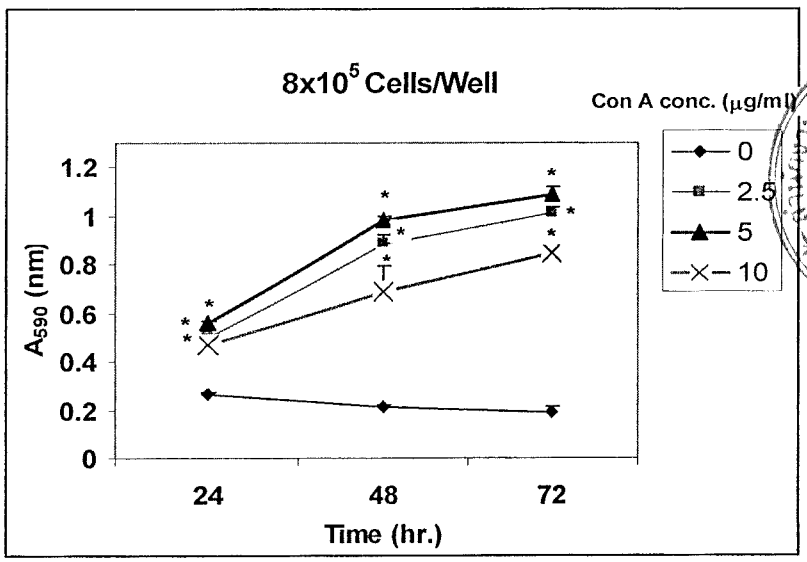
3.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ Con A

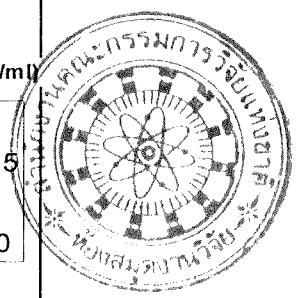
ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสม ใช้เซลล์ $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 μg/ml และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ผลการทดลองแสดงว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทดสอบ ขึ้นกับความเข้มข้นของเซลล์ใน culture ที่ใช้ และความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้กระตุ้น (รูปที่ 14-16) ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ $4x10^5$ เซลล์/หลุม (รูปที่ 14) ค่าการตอบสนองสูงสุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Con A 5 μg/mlที่ 48 ชม.และการตอบสนองลดลงประมาณ 16.6% ที่ 72 ชม. ส่วน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม (รูปที่ 15 และ รูปที่ 16 ตามลำดับ) พบว่าการตอบสนองต่อ Con A เพิ่มขึ้นที่ 48 และ 72 ชม. เมื่อเทียบกับที่ 24 ชม. แทบทุกความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้ โดยเฉพาะที่ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองต่อ Con A 2.5 และ 5 μg/ml ที่ 72 ชม. (ตารางที่ 3) มีค่าสูงกว่าที่ 24 และ 48 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น $10x10^5$ เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองต่อ Con A ที่ 5 μg/ml กลับมีค่าลดลงประมาณ 13.2% ที่ระยะเวลา 72 ชม. เมื่อเทียบกับที่ 48 ชม. ส่วนการตอบสนอง ต่อ Con A ที่ความเข้มข้นอื่นของ culture ที่ใช้ $10x10^5$ เซลล์/หลุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลา 48 และ 72 ชม. (รูปที่ 16 และตารางที่ 3) ดังนั้น สำหรับการทดสอบ

การตอบสนองต่อ Con A การใช้ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ความเข้มข้นของ Con A ที่ 2.5 หรือ 5 μg/ml และวัดการตอบสนองที่ 48 หรือที่ 72 ชม. น่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด

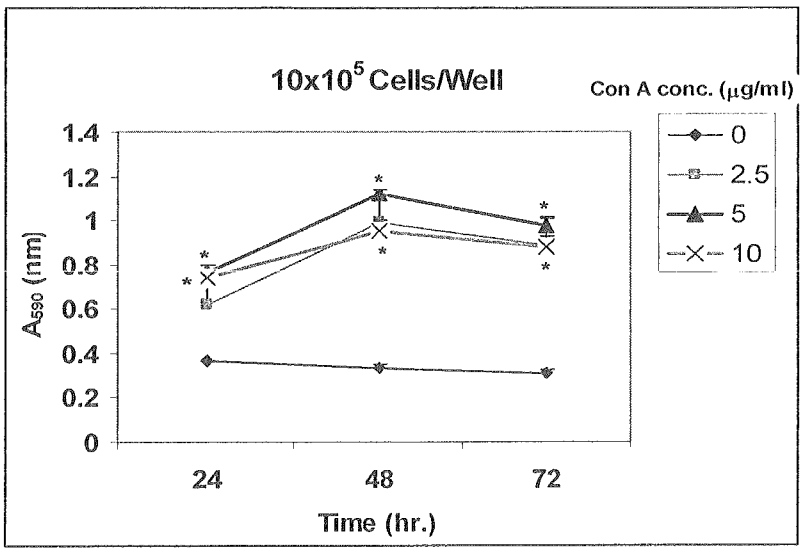


รูปที่ 14 การตอบสนองของ lymphocyte $4x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)





รูปที่ 15 การตอบสนองของ lymphocyte $8x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 μg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)



รูปที่ 16 การตอบสนองของ lymphocyte 4x10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของ lymphocyte ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของCon A (µg/ml)	**การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $OD_{590\ nm}$ ± S.D.)**		
8x10^5 เซลล์/หลุม	**24 ชม.**	**48 ชม.**	**72 ชม.**
0	0.263^{a}±0.013	0.212^{b}±0.011	0.192^{b}±0.037
2.5	0.496^{a}±0.007	0.883^{b}±0.063	1.015^{c}±0.038
5	0.563^{a}±0.010	0.980^{b}±0.028	1.087^{c}±0.049
10	0.472^{a}±0.023	0.685^{a,b}±0.183	0.844^{b}±0.033
10x10^5 เซลล์/หลุม	**24 ชม.**	**48 ชม.**	**72 ชม.**
0	0.363^{a}±0.007	0.333^{a}±0.025	0.313^{a}±0.026
2.5	0.621^{a}±0.181	0.990^{a}±0.257	0.891^{a}±0.223
5	0.767^{a} ±0.046	1.122^{b}±0.039	0.974^{c} ±0.061
10	0. 742^{a} ±0.043	0.949^{b}±0.093	0.883^{a,b}±0.083

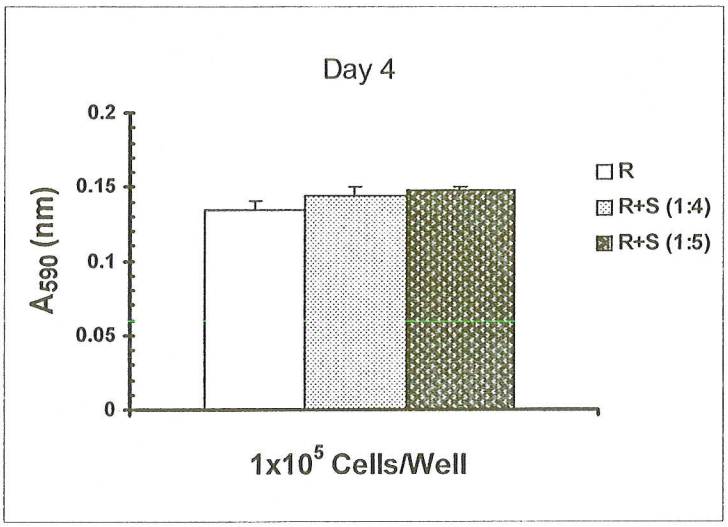
Superscript ในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4. การพัฒนาวิธีทดสอบ mixed lymphocyte response

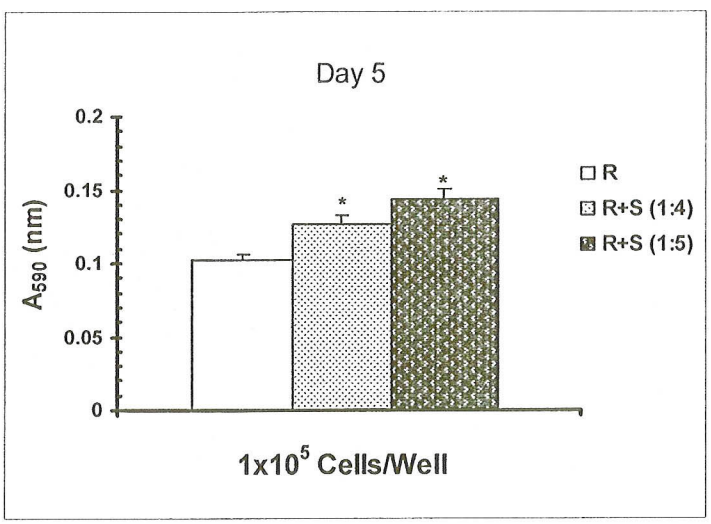
MLR เป็นการทดสอบความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ allogeneic cell ซึ่งหมายถึงเซลล์จากบุคคลต่างกันใน species เดียวกัน ในการทดลองนี้ ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนอง เรียกว่า responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่กระตุ้น เรียกว่า stimulator และจัดให้การทดสอบวัดเฉพาะการตอบสนองของ responder เพียงฝ่ายเดียว เรียกว่า one-way mixed lymphocyte reaction โดย stimulator ถูกยับยั้งการตอบสนองต่อ responder โดยการใช้ mitomycin C

4.1 การทดลอง mixed lymphocyte response โดยใช้สภาวะการทดลองตามวิธีมาตรฐาน

การทดลองเริ่มแรกใช้สภาวะต่าง ๆ ของการทดลองตามที่กำหนดในวิธีมาตรฐานทั่วไปของ MLR (Smialowicz, 1995) ที่ประเมินการตอบสนองโดยใช้สารกัมมันตภาพรังสี [^{3}H]-TdR คือใช้จำนวนเซลล์ของ responder เป็น $1x10^5$ เซลล์/หลุม และใช้ปริมาณเซลล์ของ stimulator เป็น $8x10^5$ เซลล์ หรือ $10x10^5$ เซลล์ เพื่อให้อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 หรือ 1:5 ตามลำดับ และวัดการตอบสนองโดยการใช้ MTT ภายหลังการบ่ม responder ร่วมกับ stimulator เป็นระยะเวลา 4 วัน หรือ 5 วัน ผลการทดลองชี้แนะว่า ในวันที่ 4 ถ้าใช้ปริมาณเซลล์ของ responder ตามวิธีมาตรฐาน $1x10^5$ เซลล์/หลุม ไม่ว่าอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator จะเป็น 1:4 หรือ 1:5 ก็ไม่เกิดการตอบสนองต่อเซลล์ stimulator (รูปที่ 17) ส่วนในวันที่ 5 มีการเพิ่มการตอบสนองต่อ stimulator ที่อัตราส่วน 1:4 และ 1:5 ประมาณ 24 และ 40% ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับ culture ที่มี responder เพียงอย่างเดียว แต่การตอบสนองจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เพราะค่า stimulation index (อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี responder บ่มร่วมกับ stimulator หารด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มีเพียง responder; $\frac{A_{590}[R+S]}{A_{590}[R]}$) อยู่ที่ประมาณ 1.2 และ 1.4 เท่านั้น (รูปที่ 18)



รูปที่ 17 การตอบสนองของ lymphocyte $1x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ stimulator เซลล์ใน mixed lymphocyte reaction เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 R= responder, S = stimulator

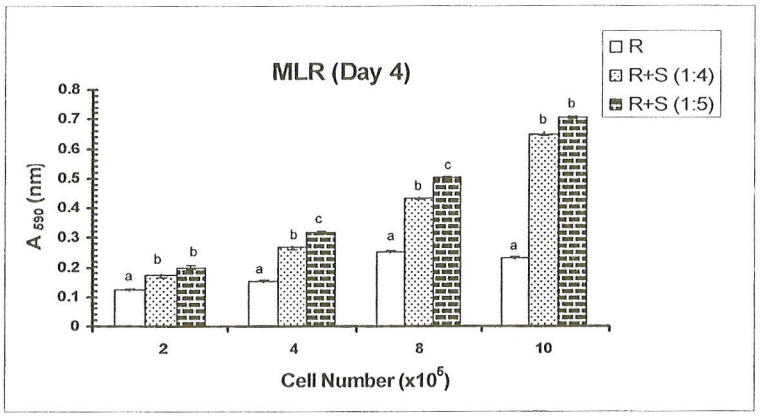


รูปที่ 18 การตอบสนองของ lymphocyte $1x10^5$ เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ stimulator เซลล์ใน MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 5 ภายหลังการกระตุ้น R= responder, stimulator (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)

4.2 การหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วน responder ต่อ stimulator ที่เหมาะสม ใน MLR

ในการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม ได้เพิ่มปริมาณเซลล์จากวิธีมาตรฐาน $1x10^5$ เซลล์/หลุมเป็น $2x10^5$, $4x10^5$, $8x10^5$ และ $10x10^5$ เซลล์/หลุม และใช้อัตราส่วน responder : stimulator

เป็น 1:4 และ 1:5 วัดการตอบสนองในวันที่ 4 ภายหลังกระตุ้นด้วย stimulator ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 19 การทดลองแสดงว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของ responder ใน culture สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองต่อ stimulator ได้ โดยค่า OD ใน culture ที่ถูกกระตุ้นด้วย stimulator จะสูงกว่า culture ที่มีเพียง responder อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทุกความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ และการตอบสนองต่อ stimulator ที่เป็น allogeneic เซลล์จะสูงขึ้นเมื่อปริมาณเซลล์ของ responderใน culture เพิ่มขึ้น ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมจึงควรเริ่มตั้งแต่ 4-8x10^5 เซลล์/หลุม ส่วนที่ 10x10^5 เซลล์/หลุม ถึงแม้จะให้ค่าการตอบสนองสูงสุด แต่ต้องใช้ปริมาณเซลล์สูงมาก ไม่ค่อยเหมาะสมในการปฏิบัติงานจริง เพราะต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากในการเตรียมปริมาณเซลล์ให้เพียงพอต่อการทดสอบ นอกจากปริมาณเซลล์ อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองใน mixed lymphocyte reaction ผลการทดลองชี้แนะว่า อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator ในวิธีมาตรฐานที่ใช้ 1:4 ค่อนข้างเหมาะสม เพราะถึงแม้จะเพิ่มอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator จาก 1:4 เป็น 1:5 การตอบสนองของ responder จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ปริมาณเซลล์ 4 และ 8x10^5 เซลล์/หลุมเท่านั้น และการตอบสนองเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อยคือประมาณ 19.1 และ 15.4% ตามลำดับ (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 การตอบสนองของ responder (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ stimulator ที่ความเข้มข้นของ responder เซลล์ต่างกันในอัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ใน one-way MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 (R =responder, S = stimulator กราฟที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test)

4.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ MLR

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับ MLR ได้ทำการวัดการตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ที่ระยะเวลา 4 และ 5 วันหลังจากกระตุ้นด้วย stimulator โดยใช้ปริมาณของ responder ที่ $4x10^5$ และ $8x10^5$ เซลล์/หลุม อัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ผลการทดลองชี้แนะว่า (ตารางที่ 4) ไม่ว่าจะวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ วันที่ 5 สามารถวัดการตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ในการทดสอบ MLR ได้ทั้งสิ้น โดย culture ที่ถูกกระตุ้นด้วย stimulator มีค่า A_{590} nm สูงกว่า responder อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ยกเว้น ในสภาวะที่ใช้ $4x10^5$ เซลล์/หลุม อัตราส่วนของ responder : stimulator เป็น 1:5 ของวันที่ 5 ซึ่ง ค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก culture ที่มีเพียง responder อย่างเดียว สำหรับการเปรียบเทียบค่า A_{590} nm ของ culture ที่มี responder, responder บ่มร่วมกับ stimulator ทั้งที่อัตราส่วน 1:4 และ 1:5 เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 และ วันที่ 5 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบอาจเป็นได้ทั้งวันที่ 4 หรือ วันที่ 5

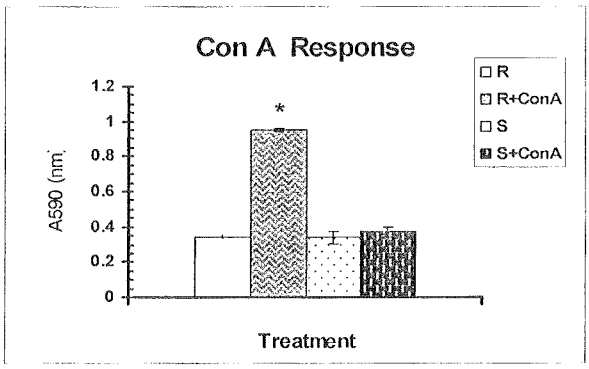
ตารางที่ 4 การตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ใน mixed lymphocyte reaction ในวันที่ 4 และ 5

Mixed Lymphocyte Reactions	**ค่าเฉลี่ย $OD_{590\ nm}$ ± S.D.**	
	Day 4	**Day 5**
$4x10^5$ Cells/well		
Responder	$0.119^{a,1}$±0.004	$0.249^{a,1}$±0.061
Responder + Stimulator (1:4)	$0.321^{b,1}$±0..039	$0.800^{b,1}$±0.496
Responder + Stimulator (1:5)	$0.492^{b,1}$±0.116	$0.648^{ab,1}$.±0.070
$8x10^5$ Cells/well		
Responder	$0.130^{a,1}$±.015	$0.147^{a,1}$±0..007
Responder + Stimulator (1:4)	$0.804^{b,1}$±0.093	$0.956^{b,1}$±0.211
Responder + Stimulator (1:5)	$0.781^{b,1}$±0.122	$0.914^{b,1}$±0.039

ในแต่ละความเข้มข้นของเซลล์ superscript ที่เป็นตัวอักษร (เปรียบเทียบตามแนวตั้ง) และที่เป็นตัวเลข (เปรียบเทียบตามแนวนอน) ที่ตามด้วยอักษรหรือตัวเลขที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test และ independent T test ตามลำดับ

4.4 การตรวจสอบการตอบสนองต่อ mitogen ของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่าการตอบสนองใน MLR เป็นแบบ one way-mixed lymphocyte reaction ซึ่งหมายถึง responder เซลล์เท่านั้นที่สามารถตอบสนองเพียงฝ่ายเดียว แต่ stimulator เซลล์ไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ เนื่องจากการแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งโดย mitomycin C ในวันที่ทำการทดลอง MLR จึงควรตรวจสอบการตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ต่อ mitogen ควบคู่ทุกครั้ง การทดลองนี้ได้เลือกวัดการตอบสนองของ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A mitogen โดยเลือกใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม ความเข้มข้นของ Con A 5 μg/ml และวัดการตอบสนองที่ 72 ชม. ภายหลังการกระตุ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดการตอบสนองต่อ Con A mitogen และเพื่อเป็นการยืนยันว่า Con A mitogen ยังคงคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้ดี จึงวัดการตอบสนองของ responder ต่อ Con A ควบคู่กัน ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ระหว่าง culture ที่มี stimulator เพียงอย่างเดียว หรือ stimulator ที่บ่มร่วมกับ 5 μg/ml Con A แสดงว่า stimulator เซลล์ที่ได้รับ 50 μg/ml mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen อย่างที่ควรจะเป็นเมื่อวัดการตอบสนองที่ 72 ชม ในทางตรงกันข้าม responder เซลล์สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ดีมาก ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี responder บ่มร่วมกับ Con A มีค่าเท่ากับ 0.953 ± 0.025 ในขณะที่ culture ที่มีเพียง responder มีค่าเท่ากับ 0.346± 0.03 ดังนั้น stimulator เซลล์ที่ได้รับ 50 μg/ml mitomycin C ซึ่งเป็นเซลล์ชุดเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบ MLR จึงไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ในการทดสอบ MLR การตอบสนองที่วัดได้จึงเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte reaction

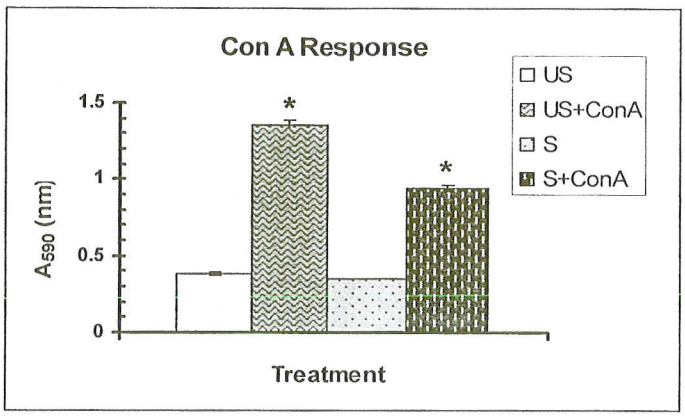


รูปที่ 20 การตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ต่อ Con A mitogen เทียบกับการตอบสนองของเซลล์ responder ในการทดสอบใช้เซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม 5 μg/ml Con A และวัดการตอบสนองในวันที่ 3 (R = responder, S = stimulator * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)

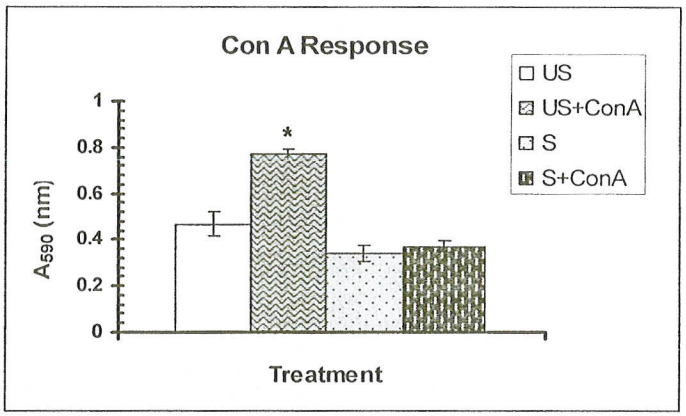
4.5 การตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A mitogen

เพื่อเป็นการยืนยันว่า การไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ของเซลล์ stimulatorเป็นผลสืบเนื่องจากการได้รับ mitomycin C ไม่ใช่เป็นเพราะหนูเม้าส์ DBA/2 เป็นสายพันธุ์ที่มีการตอบสนองต่อ Con A ต่ำ จึงทำการทดลองเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A mitogen ระหว่าง stimulator เซลล์ที่ได้รับ และไม่ได้รับ mitomycin C และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ผลการทดลอง แสดงว่า ที่ระยะเวลา 24 ชม. (รูปที่ 21 ก) ภายหลังกระตุ้นด้วย 5 μg/ml Con A เซลล์ stimulator ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มร่วมกับ mitomycin C สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ดี ดังค่าการดูดกลืนแสงใน culture ที่บ่มร่วมกับ Con A สูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A ประมาณ 3.6 เท่า ส่วนเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับ 50 μg/ml mitomycin C สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้เช่นกัน แต่การตอบสนองต่อ Con A mitogen จะต่ำกว่า คือการตอบสนองใน culture ที่มี Con A สูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A เพียง 2.7 เท่า แต่เมื่อวัดการตอบสนองต่อ Con A ที่ระยะเวลา 72 ชม. (รูปที่ 21 ข) พบว่า เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มกับ mitomycin C ยังสามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ แต่ระดับการตอบสนองจะลดลงจากที่ 24 ชม. ประมาณ 45.8 % คือการตอบสนองสูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A เพียง 1.7 เท่า แต่ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A ได้ต่อไป เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 72 ชม. ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี Con A ไม่แตกต่างจาก culture ที่ไม่มี Con A ดังนั้น stimulator เซลล์ที่ผ่านการบ่มกับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ที่ระยะเวลา 72 ชม. การวัดการตอบสนองใน MLR กระทำในวันที่ 5 หรือ 120 ชม. ภายหลังการกระตุ้น ค่าการตอบสนองของ culure ที่วัดได้ จึงน่าจะเป็นการตอบสนองของ responder เซลล์ต่อ stimulator เซลล์เพียงฝ่ายเดียว หรือเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte reaction

ก



ข



รูปที่ 21 การตอบสนองของเซลล์ stimulator (ค่าเฉลี่ย $A_{590\ nm}$ ±SEM) ที่ได้รับ และไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A การทดลองใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุม Con A 5 μg/ml และวัดการตอบสนองในวันที่ 2 (ก) และวันที่ 3 (ข) (R = responder, US = stimulator ที่ไม่ได้รับ mitomycin C, S = stimulator ที่ได้รับ mitomycin C . * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)