บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในน้ำช่องท้องหนูก่อนและหลังตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50 โดยใช้ปริมาณที่เท่ากัน ด้วยวิธี ELISA พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีในน้ำในช่องท้องหนูหลังตกตะกอนทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่าก่อนตกตะกอน ซึ่งน่าจะเนื่องมาจากโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอนติบอดีซึ่งมีมากในน้ำช่องท้องหนูก่อนตกตะกอนอาจไปบังแอนติเจนบางส่วนทำให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีไม่สามารถเข้าไปจับได้ จึงทำให้การทำปฏิกิริยาต่ำลง

การติดฉลากโมโนโคลนัลแอนติบอดี ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography เพราะทำปฏิกิริยากับเซลล์ได้สูงกว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากไอโอดีน-125สามารถติดฉลากโปรตีนทุกชนิดที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine), ฮีสติดีน (histidine)และ ทริปโตเฟน (trytophan) (Alan and Robin,1987) ถ้าสารติดฉลากมีโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ต้องการปนอยู่มาก จะทำให้จำนวนสารติดฉลากที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับจริงๆมีค่าน้อย

เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลากโดยใช้ปริมาณที่เท่ากัน ด้วยวิธี ELISA พบว่าให้ผลการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับใกล้เคียงกัน แสดงว่าการติดฉลากโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยไอโอดีน-125 โดยวิธีคลอรามีนทีไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ

การทดสอบการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ 2 ชนิดได้แก่ เซลล์ S102และเซลล์ HepG-2 พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 สามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับทั้งสองชนิดได้ดีกว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดี 43 และ 54 แสดงว่าเซลล์มะเร็งตับทั้งสองชนิดมีจำนวนเอพิโทปสำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดี 3 ชนิดเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ 27 ,43 และ 54 และผลการทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102 ของโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ,43 ให้ค่าสูงกว่าการทำปฏิกิริยากับเซลล์ HepG-2 อย่างเห็นได้ชัด นั่นแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งคนละสายพันธุ์ แม้ว่าจะเป็นมะเร็งชนิดเดียวกันอาจมีความหนาแน่นของแอนติเจนแตกต่างกันได้ ซึ่งแสดงถึงการมีคุณสมบัติ heterogeneity ของเซลล์มะเร็งตับ

จากการทำ inhibition binding assayและcompetitive binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ 14 โคลน พบว่าแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,20,16,57,58และ 74กลุ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดี 36,43,40,44,51,52 และ 75 และกลุ่มที่มีโคลนเดียวคือโมโนโคลนัลแอนติบอดี 54 เมื่อนำโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27,43 และ 54 มาผสมทีละสองและสามโคลน โดยให้ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่นำมาผสมกันเป็นสองแบบ คือปริมาณสูงสุดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ และลดปริมาณลงครึ่งหนึ่ง พบว่าสามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับทั้งสองชนิด คือเซลล์ S102 และ HepG-2 นั่นคือ โมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งสามโคลนมีการเสริมฤทธิ์กัน ดังนั้นเมื่อจะนำไปใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับต่อไป ควรใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมทั้งสามโคลน และยิ่งมีโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับที่ไม่มีการรบกวนการทำปฏิกิริยาซึ่งกันและกันมากโคลนขึ้นมาผสมกัน ยิ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีไปใช้ในการวินิจฉัยโรค หรือเพิ่มความไวในการตรวจพบเซลล์มะเร็งตับต่อไป

จากการจัดกลุ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดีของคณะผู้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดังกล่าวในบทนำ ได้จัดโมโนโคลนัลแอนติบอดี 43,75 ไว้คนละกลุ่มกับโมโนโคลนัลแอนติบอดี 36,40,51,52 แต่จากการทำวิจัยนี้ได้จัดโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มไว้ด้วยกัน เนื่องจากการทำ inhibition binding assay และ competitive binding assay พบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มมีการรบกวนการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับซึ่งกันและกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าที่จริงโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มจับคนละเอพิโทปแต่จับเอพิโทปที่อยู่ใกล้กันมาก ทำให้เกิดแรงผลักซึ่งกันและกัน (steric hindrance) (Dorothee et al.,1985) จึงได้ผลการทดลองดังกล่าว การทำงานวิจัยนี้จึงไม่นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มมาผสมกัน

นอกจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่นำมาผสมต้องไม่มีการรบกวนการทำปฏิกิริยาซึ่งกันและกันแล้ว ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ผสมก็เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง โดย Zdenko และคณะ(1985) พบว่าการใช้ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ำกว่าปริมาณที่ทำปฏิกิริยาสูงสุด สามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อมะเร็ง melanomaได้ แต่ Siegfriedและคณะ (1989) พบว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีปริมาณสูงสุดเท่านั้นที่สามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยากับมะเร็ง melanoma และพบเฉพาะการทดลองภายนอกกาย(in vivo)เท่านั้น ส่วนการทดลองภายในกาย (in vitro) พบว่าไม่สามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยาได้ จากการทำงานวิจัยนี้ พบว่าทั้งปริมาณที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดและปริมาณลดลงครึ่งหนึ่ง สามารถเพิ่มการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้ โดยมีการเสริมฤทธิ์กัน(synergism)

การหาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่อิ่มตัวต่อการทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งตับหรือปริมาณที่จุดสมดุลย์ที่แท้จริง สำหรับการทดลองภายนอกร่างกายไม่สามารถทำได้ แต่การทดลองภายในร่างกายสามารถหาปริมาณที่จุดสมดุลย์แท้จริงได้ (Sarah et al.,1990) ดังนั้นปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่นำมาผสมในการทำ

งานวิจัยนี้จึงเป็นปริมาณที่หาได้จากจุดสมดุลย์จุดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งต้องควบคุมระบบต่างๆ ให้คงที่ เช่น ปริมาณเซลล์ 2-2.5x10^4 เซลล์,การเกิดปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.4 ,เวลาในการทำปฏิกิริยาตลอดคืนที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีการเปลี่ยนระบบดังกล่าวอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับหนึ่งเซลล์จึงเป็นปริมาณที่หาได้อย่างคร่าวๆเท่านั้น แต่ถ้าจะนำไปใช้ทดลองในร่างกายต้องมีการหาปริมาณที่แท้จริงอีกครั้ง เนื่องจากมีปัจจัยที่แตกต่างกันหลายอย่าง โดยเฉพาะสภาพของเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในร่างกายกับเซลล์สายพันธุ์

การนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจหาตำแหน่งเซลล์มะเร็งในร่างกายหรือนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งยังมีปัจจัยสำคัญอีกหลายอย่าง (Sarah et al.,1990) ได้แก่ อัฟฟินิตีของโมโนโคลนัลแอนติบอดี ถ้าต่ำประสิทธิภาพในการเข้าไปถึงเซลล์มะเร็งจะต่ำ , ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จะฉีดเข้าร่างกาย , ตำแหน่งของเซลล์มะเร็ง, การไหลเวียนของเลือดที่จะนำไปสู่มะเร็ง และขนาดของก้อนมะเร็ง นอกจากนี้การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เป็นชนิด IgG_{2a} ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งแบบ ADCC (ดูในบทนำเรื่องภูมิคุ้มกันโรคมะเร็ง) ได้ โดยที่โมโนโคลนัลแอนติบอดีชนิด IgG_{2b} , IgG_3, IgM และIgA ไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งด้วยวิธีนี้ได้ (Herlyn et al.,1982; Dorothee et al., 1985) ก็จะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพขึ้น ซึ่งโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อมะเร็งตับที่นำมาทำงานวิจัยนี้เป็นชนิด IgG_{2a}ทั้งหมด ดังนั้นจากการทำงานวิจัยนี้คาดว่าสามารถเป็นแนวทางนำไปพัฒนาการวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็งตับต่อไป