บทที่ 5
วิจารณ์ผลผลการทดลอง

ขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดคือ Globular protein, Bovine serum albumin (BSA) รวมถึงโปรตีนที่เป็นแอนติบอดีจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้ (Male Specific Antibody, MSA) ซึ่งผลิตมาจากเซลล์ลูกผสม (Hybridoma) ดังนั้นเมื่อต้องการแยกเฉพาะโปรตีนที่เป็นแอนติบอดี isotype ชนิด IgG จึงต้องนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (supernatant) มาผ่าน column ทางการค้า เพื่อแยกโปรตีนเพียงชนิดเดียวออกเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody) ในงานของ Yucel and Cirakoglu (1999) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ได้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ช่วยตกตะกอนโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายก่อนนำมาแยกโปรตีนที่ต้องการ สารละลาย Elute buffer มี pH = 2.7 ซึ่งมีสภาวะเป็นกรด (H^+) จะเป็นตัวจับแอนติบอดีด้านปลาย Fc ที่มีหมู่ของ COO^- โดยใช้คุณสมบัติการมีประจุดึงแอนติบอดีออกมาพร้อมกัน (Edelman, 1972) และในขณะที่หยดสารละลายเพื่อแยกเก็บต้องหยดสารละลายให้ช้าสม่ำเสมอ (1 ml/min) เพราะแอนติบอดีที่เกาะติดอยู่ใน column จะไม่ออกหมดหากหยดสารละลายผ่านเร็วเกินไป และเมื่อนำสารละลายไปวัดค่าโปรตีนด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 nm ควรใช้ cuvette แก้ว เนื่องจากจะได้ค่าที่สูงกว่าที่เป็นพลาสติกเพราะแก้วมีความใสกว่าค่าที่วัดได้จึงใกล้เคียงกับค่าโปรตีนนั้นอย่างแท้จริง

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ โดยวิธี Immunofluorescence microscopy โดยใช้เม็ดเลือดขาวโคพันธุ์ชาโลเลย์ (Peripheral white blood cells) พบว่ามีความแม่นยำในการในการจำแนกเพศผู้ได้ถึง 92.77 ± 0.69% และพบว่าในเม็ดเลือดขาวของเพศเมียมีการตอบสนองต่อความจำเพาะเพศผู้อยู่ 2.12 ± 0.07 % ($p < 0.05$) ทั้งนี้การที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศเมียตอบสนองต่อแอนติบอดีอาจเนื่องจากในเพศเมียอาจมีรูปแบบโครโมโซมเป็น XXY โดยความแตกต่างของการตอบสนองต่อแอนติบอดีเนื่องมาจากแอนติเจนที่เป็นโปรตีนอยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดถูกกำหนดจากโครมโซมวาย ในขณะที่โครโมโซมเอ็กซ์ไม่มีการแสดงออกของ Histocompatibility – Y antigen (Goodfellow and Andrews ,1982; Stephen *et al*., 1974) ซึ่งจากการทดสอบสามารถยืนยันได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาได้มีความจำเพาะเจาะจงและให้ความแม่นยำในการตรวจวัดสูง จากการตรวจวัดด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายเพื่อนำมาทดลองเป็นวิธีการสำคัญต่ออัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม เพราะมีผลต่อจำนวนประชากรในการเข้าทดลอง เมื่อนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลวแล้วต้องนำมาอุ่นในน้ำอุณหภูมิ 40 ^{O}C ทันที เป็นเวลา 10 วินาที อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอยู่ในหลอดจะละลายทันที ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สเปิร์มมากกว่าจึงทำให้เกิดการ osmosis ของน้ำเข้าสู่เซลล์ ทำให้สเปิร์มฟื้นตัวและมีการเคลื่อนไหวอีกครั้ง โดยมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 40 % แต่หากนำมาอุ่นที่น้ำอุณหภูมิ 43 ^{O}C เป็นเวลา 10 วินาที เมื่อตรวจสอบคุณภาพการเคลื่อนไหวหมู่จะอยู่ในระดับดีมากแต่ในระหว่างการทดลองอัตราการมีชีวิตรอดลดลงเหลือเพียงประมาณ 10 % และเมื่อเปรียบเทียบกับการนำมาละลายน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที พบว่าอัตราการฟื้นตัวกลับมาเคลื่อนไหวอยู่ในระดับต่ำและในระหว่างการทดลองอัตราการมีชีวิตรอดลดลงเหลือเพียงประมาณ 10 % เช่นกัน ในงานทดลองของ สราวุธ ฉายประสาท และคณะ (2549) ศึกษาอิทธิพลของการละลายน้ำเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 4 กลุ่มคือ ละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 ^{O}C นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 1) อุณหภูมิ 30 ^{O}C นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 2) อุณหภูมิ 25 ^{O}C นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 3) และการละลายโดยใช้การสัมผัสกับมือ นาน 30 วินาที (กลุ่มที่ 4) พบว่าวิธีการละลายน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยน้ำเชื้อกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่า 51.04 ±12.33 %, 40.41±7.50 %, 39.79 ±10.26 % และ 10.00±8.20 % ตามลำดับ ในงานทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อของพ่อโค 3 ตัว ที่รีดได้ในครั้งที่ 2 เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อในแต่ละครั้ง

เมื่อละลายน้ำเชื้อออกมาแล้วทำการคัดเลือกตัวสเปิร์มที่แข็งแรงมาทดลอง โดยทำการ swim up ซึ่งใช้หลักการปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 13,000 rpm 3 วินาที เพื่อให้สเปิร์มตกตะกอนด้านล่างหลอดจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 45 นาที เพื่อคัดเลือกให้สเปิร์มที่แข็งแรงว่ายขึ้นมาด้านบน แล้วจึงเก็บส่วนใสด้านบนมาทดลองต่อ ได้เปรียบเทียบการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 900 rpm 2 นาที เนื่องจากที่ความเร็วต่ำๆ จะไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวสเปิร์ม แต่เมื่อบ่มเพื่อรอให้สเปิร์ม swim up แล้วพบว่าส่วนใสด้านบนมีสเปิร์มตัวตายปนอยู่เป็นจำนวนมากจึงไม่สามารถนำไปทดลองได้ เนื่องจากสเปิร์มที่ทดลองต้องเป็นตัวที่มีชีวิตเท่านั้นเพื่อที่จะได้ทราบว่าสเปิร์มที่ตายไปนั้นเกิดจากการทดลองอย่างแท้จริง

อัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค คือ 1:50 พบอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 93.54 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (p > 0.05) ในส่วนของสเปิร์มที่ตายไปนั้นคิดเป็น 6.46 % เกิดจากการทำงานของคอมพลีเมนต์เพียงอย่างเดียวใน Alternative pathway โดยการตายของสเปิร์มในขั้นตอนนี้จะเริ่มจากโปรตีน C3 ซึ่งเป็นหนึ่งใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีนที่ทำงานในกระบวนการไซโตทอกซิคจะถูกไฮโดรไลซีส (hydrolysis) แบ่งย่อยออกเป็น C3a และ C3b โดยที่ C3a จะไปกระตุ้นให้โปรตีน C5 แบ่งย่อยออกเป็น C5a และ C5b ซึ่ง C5b นี้จะเข้าทำงานในขั้นตอนสุดท้ายของการเกิด Membrane Attack Complex (MAC) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคผ่าน Classical pathway โดยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคผ่านทางนี้จะเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันระหว่างแอนติบอดี (antibody) และโปรตีนคอมพลีเมนต์ (complement protein) มีการจับกันในรูปแบบของ antigen-antibody complex (Fujita, 2004) ซึ่งเป็นวิถีทางที่งานทดลองนี้ต้องการในการทำลายสเปิร์มที่จำเพาะต่อเพศผู้ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังนั้นการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของคอมพลีเมนต์จึงเป็นเพียงการตรวจสอบว่าโปรตีนคอมพลีเมนต์จากซีรั่มหนูตะเภานั้นยังทำงานได้อยู่

ขั้นตอนคัดเพศหรือการทำลายสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายโดยการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากอัตราส่วนของคอมพลีเมนต์ 1:50 นำไปทดสอบร่วมกับแอนติบอดี 1:100, 1:300, 1:500, 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000 และ 1:10,000 เพื่อยืนยันผลว่า เมื่อสเปิร์มได้บ่มในแอนติบอดีร่วมกับโปรตีนคอมพลีเมนต์แล้ว อัตราการมีชีวิตรอดต้องน้อยที่สุดและเป็นจุดที่เหมาะสมในการทำลายสเปิร์ม (optimal) คือที่อัตราเจือจาง 1:1,000 และ1:2,500 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ทำให้สเปิร์มตายไป 44.92 และ 45.28 % ตามลำดับ โดยถือว่าเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคขึ้น แต่ในงานของ Bennett and Boyse (1973) ใช้ความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ 1 : 20 และเอชวายแอนติซีรัม 1 : 1 ได้สัดส่วนเพศผู้ 45.4 % ในกลุ่มทดลองที่อัตราเจือจาง 1:100, 1:300 และ 1:500 พบว่าสเปิร์มมีอัตราการรอดชีวิตสูง โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) สาเหตุมาจากการที่แอนติบอดีมีความเข้มข้นมากไปเป็นผลให้เกิดการจับกันเองของแอนติบอดี (interaction) ทำให้จำนวนของแอนติบอดีที่จะเข้าไปจับกับเซลล์เป้าหมายหรือสเปิร์มลดลงและเมื่อเติมคอมพลีเมนต์ตามลงไปจึงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคต่ำ เช่นเดียวกับกลุ่มทดลองที่อัตราเจือจาง 1:5,000 และ 1:10,000 อัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มสูงเช่นกัน เนื่องจากความเข้มข้นของแอนติบอดีเจือจางมากอยู่แล้ว ทำให้จำนวนของแอนติบอดีที่ไปจับกับสเปิร์มมีน้อยทำให้อัตราการตายจากปฏิกิริยาไซโตทอกซิคเกิดขึ้นน้อย (Crowther, 2006) โดยงานทดลองนี้เลือกใช้แอนติบอดีอัตราเจือจางที่ 1:2,500 เนื่องจากที่อัตราเจือจางนี้ทำให้สเปิร์มมีอัตราการรอดชีวิตน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพื่อความประหยัดของการใช้แอนติบอดี

การคัดเพศด้วยด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ในน้ำเชื้อโคเนื้อ ตรวจผลจากการเรืองแสงของสีฟลูออเรสเซนต์ด้วย Immunofluorescence microscopy โดยตัวอย่างสเปิร์มนั้นบ่มด้วยแอนติบอดี 1:500 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม goat anti-mouse ติดฉลากด้วย FITC (secondary antibody) บ่ม 1 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้ใช้หลักการทำงานของระบบ ELISA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการจับกันของแอนติบอดี โดยพบว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้แอนติบอดี 1:2,500 บ่มร่วมกับคอมพลีเมนต์ 1:50 ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิค โดยเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างโปรตีนคอมพลีเมนต์จากหนูตะเภาและแอนติบอดี ผ่านวิถีแบบ Classical pathway ทำให้สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเป็น 63 : 37 และ 2 : 98 ตามลำดับ เมื่อตรวจความแตกต่างระหว่างกลุ่มคัดเพศและกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Real time PCR พบว่ามีจำนวนท่อนของดีเอ็นเอ (DNA) ที่จำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้ โดยในกลุ่มคัดเพศ (1:2,500) ต้องการจำนวนรอบในการผลิตท่อน DNA ในยีน BOVM97 มากกว่ากลุ่มควบคุม 4 รอบ (31 รอบ และ 27 รอบ) ซึ่งใกล้เคียงกับงานทดลองของวิวัฒน์ (2547) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสเปิร์มวาย (ค่า BOVM97) ที่ปรากฏในรูปค่า CT ใน กลุ่มแอนติบอดี 1:10 บ่มร่วมกับคอมพลีเมนต์ 1:50 มีการลดลงมากกว่าทุกกลุ่มควบคุม (26 รอบ และ 31 รอบ) และมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกับการตรวจวัดด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy สำหรับยีน β-actin ค่า CT ในกลุ่มการทดลองและกลุ่มควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน

จากการถ่ายภาพตัวอย่างสเปิร์มด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM) ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ผ่านกระบวนการไซโตทอกซิคพบว่ามีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยเฉพาะการเกิดวิการที่ผิวเซลล์ คือในกลุ่มทดลองมีลักษณะเป็นจุดสีขาวบนผิวบริเวณหัวของสเปิร์ม ซึ่งคาดว่าจะเป็นการทำให้เกิดแผลจากการม้วนตัวของโปรตีนคอมพลีเมนต์แทรกชั้นผิวสเปิร์มทำให้เกิดรู (MAC) ซึ่งจะมองเห็นเป็นจุดสีขาวกระจายทั่วบริเวณหัวสเปิร์ม ในขณะที่กลุ่มควบคุมยังมีสภาพสมบูรณ์ปกติ ผิวเรียบ ขอบส่วนหัวเรียบคม ซึ่งการแสดงถ่ายภาพออกมานี้เป็นการยืนยันเบื้องต้นได้ว่าเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคขึ้นจริง

ในเชิงเศรษฐกิจการนำเทคนิคการคัดเพศโดยผ่านกระบวนการไซโตทอกซิคไปใช้จริงในภาคสนาม และความคุ้มค่าในการลงทุนสำหรับการเพิ่มจำนวนลูกโคเพศเมียนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของ flow cytometry แล้ว มีราคาถูกกว่ากล่าวคือ ราคาอุปกรณ์ของ Flow cytometry ประมาณ 2 ล้านบาท ราคาน้ำเชื้อแช่แข็งคัดเพศโดยผ่านกระบวนการ flow cytometry ราคาหลอดละ 1,000 บาท ซึ่งเทคนิคนี้ให้ความแม่นยำในการคัดแยกสเปิร์มวาย 89 % และสเปิร์มเอ็กซ์ 91 % ที่ความเร็ว 14,000 cell / sec (Johnson and Welch, 1999) แต่ข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือทำให้สเปิร์มสูญเสียความสามารถในการเจาะไข่ (Oocytes) ระหว่างขั้นตอนการคัดแยกประมาณ 8.8 % (Seidel *et al*., 1999) ได้สเปิร์มที่อ่อนแอจากการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ และถูกแสงเลเซอร์ยิงเพื่อตรวจนับจำนวนสเปิร์ม

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเพศผู้มาทำน้ำเชื้อคัดเพศ หากสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 10 ml และมีปริมาณแอนติบอดีมากกว่า 1 – 2 mg / 50 ml สามารถนำไปเจือจางได้ที่อัตรา 1:2,500 โดยจะได้ทั้งหมด 25,000 หลอด ๆละ 1 ml นำไปใช้ ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อคัดเพศ 250 μl / dose ดังนั้นจะสามารถผลิตน้ำเชื้อโคเนื้อแช่แข็งคัดเพศได้ 100,000 dose โดยต้นทุนในการผลิต (ค่าอุปกรณ์ แรงงาน และ สารเคมี) ทั้งหมดประมาณ 4,000,000 บาท ดังนั้นจะสามารถผลิตน้ำเชื้อคัดเพศได้ในราคาต้นทุนประมาณ 40 บาท / หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณความเข้มข้นประมาณ 1-2 mg/ ml
2. ตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้มีความแม่นยำ 92.77 ± 0.69%
3. ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคชาโลเลย์ 3 ตัว จากการรีดน้ำเชื้อครั้งที่ 2 โดยมีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มหลังทำน้ำเชื้อแช่แข็ง 30 %, 40 % และ 30 % ตามลำดับ
4. อัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค คือ 1:50 มีอัตราการรอดชีวิต 93.54 %
5. อัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มหลังจากผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิค คือ 45.28 %
6. สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเป็น 63 : 37 และ 2 : 98 ตามลำดับ
7. ในกลุ่มคัดเพศ (1:2,500) ต้องการจำนวนรอบในการผลิตท่อน DNA ในยีน BOVM97 มากกว่ากลุ่มควบคุม 4 รอบ

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะเวลาและสัดส่วนของแอนติบอดีต่อการทำงานของคอมพลีเมนต์ และต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสมจึงจะให้ผลของปฏิกิริยาไซโตทอกซิคสูงที่สุด
2. อุณหภูมิที่ต้องคงที่ 37 ^{O}C ซึ่งเป็นช่วงที่คอมพลีเมนต์ทำงานได้ดีที่สุด
3. ต้องระวังเรื่องแสง เนื่องจากสเปิร์มมีความไวในการถูกทำลายด้วยแสง จะทำให้สเปิร์มตายและส่งผลที่ผิดพลาดในการทดลอง
4. เพื่อตรวจสอบความแม่นยำการคัดเพศควรนำสเปิร์มที่ผ่านการคัดเพศไปทดสอบต่อด้วยการผสมเทียมในหลอดทดลอง (IVF) ก่อนนำไปใช้จริงภาคสนาม
5. การตกตะกอนโปรตีนจี ควรเก็บ fraction ที่มีค่า O.D. ใกล้เคียงกันไว้เมื่อได้ปริมาณที่มากจึงนำมารวมกันและแบ่งใช้เพื่อให้ค่าความเข้มข้นเท่ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved