

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถั่งกวน



นายชัชวาล อุดมโชคมงคล

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

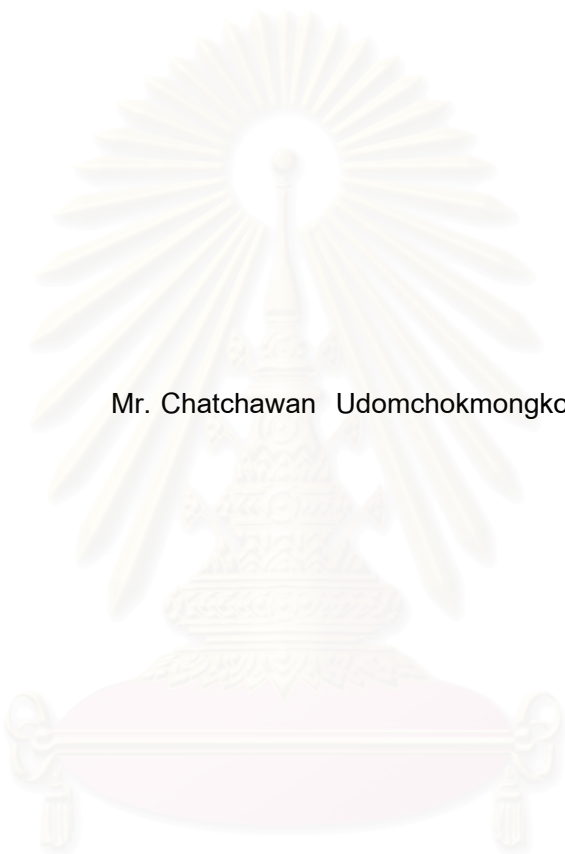
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR ENROFLOXACIN
IN STIRRED-TANK BIOREACTOR

Mr. Chatchawan Udomchokmongkol



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

ชัชวาล อุดมโชคมงคล : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซินในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR ENROFLOXACIN IN STIRRED-TANK BIOREACTOR) อ. ที่ปรึกษา: ดร.กิตติพันธ์ โกมลภิส, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, นางทรงจันทร์ ภูทอง, 130 หน้า.

เซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ซึ่งผลิตอิมมูโนโกลบินชนิด IgG, ที่จำเพาะต่อเอนโรฟลอกซาซิน ได้ถูกเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 2 ลิตร ในระบบต่างๆ จากการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยการเลี้ยงเซลล์ในระบบ batch พบว่าเมื่อควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนที่ 50 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตสูงสุด 9.21×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของแอนติบอดี 67.33 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ เซลล์ได้ถูกเลี้ยงด้วยระบบ fed-batch โดยการเติมสารอาหารจำเพาะบางชนิด แต่พบว่าไม่สามารถทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และแอนติบอดีสูงขึ้นได้ ในทางกลับกัน จะพบการเพิ่มการผลิตของเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษ ได้แก่ แอมโมเนียและแลคเตต การศึกษาเรื่องความเข้มข้นในการยับยั้งพบว่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาจะเกิดขึ้นที่แอมโมเนียและแลคเตตเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion โดยการใช้ spin filter เป็นอุปกรณ์กักกันเซลล์ที่ติดตั้งภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน สามารถเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาได้ผลดีที่สุด มีการกักกันเซลล์สูงสุดที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ด้วยการเพิ่ม perfusion rate สูงถึง 0.80 vvd สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุลสูงถึง 1.57×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 5 วัน และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน แล้วจึงลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตต่อวันและอัตราการผลิตต่อหน่วย มีค่าเท่ากับ 73.69 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และ 61.41 มิลลิกรัมต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ระบบ batch ประมาณ 6 เท่า นอกจากนี้ ได้ศึกษาผลของการลดความเข้มข้นของซีรัมลงพบว่า เมื่อลดความเข้มข้นซีรัมลงจาก 10 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นเซลล์ที่ภาวะสมดุลและอัตราการผลิตแอนติบอดีลดลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ต้นทุนการผลิตต่อผลิตภัณฑ์ก็ลดลงถึง 30 เปอร์เซ็นต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... *ชัชวาล อุดมโชคมงคล*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *กิตติพันธ์*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *ธนาภัทร*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *ทรงจันทร์*

4772267923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: HYBRIDOMA / STIRRED-TANK BIOREACTOR / PERFUSION

CHATCHAWAN UDOMCHOKMONGKOL: PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR ENROFLOXACIN IN STIRRED-TANK BIOREACTOR. THESIS ADVISOR: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., THESIS COADVISORS: ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., SONGCHAN PUTHONG, M.Sc., 130 pp.

Hybridoma ENRO 44 cell line producing an IgG1 specific for enrofloxacin was cultivated in a 2-l stirred-tank bioreactor in various modes. The effects of the dissolved oxygen concentration on hybridoma cell were investigated using batch culture. When the dissolved oxygen was controlled at 50% air saturation, maximum viable cell concentration of 9.21×10^5 cells/ml and antibody concentration of 67.33 mg/l were obtained. In addition, the hybridoma cell line was also cultivated in fed-batch cultures by addition of some specific nutrients. But, the improvement in cell concentration and MAb concentration was not observed. On the other hand, the increase in production of toxic metabolites, ammonia and lactate, was found. The inhibition concentration study shows that growth inhibition occurs at ammonia and lactate concentration of 3.0 mM and 3.0 g/l, respectively. In a perfusion culture using a spin filter as a cell retention device installed in the stirred-tank reactor, the best performance of hybridoma cultivation was achieved. The highest retention was obtained with the rotation velocity of 100 rpm. By increasing perfusion rate to 0.80 vvd, the higher steady viable cell concentration of 1.57×10^6 cells/ml was obtained within 5 days and the cell viability was above 90% for 3 days and then decreased to stabilize at around 30-40%. The overall productivity and yield were 73.69 mg/L/day and 61.41 mg/d which were significantly increased by six fold over those of the batch process. Furthermore, the effect of reducing serum concentration has been also investigated. When the serum concentration was decreased from 10% to 5%, steady viable cell concentration and MAb productivity were also reduced about 20%. However, the cost per product yield was reduced by 30 %.

Field of study Biotechnology	Student's signature..... <i>Chatchawan Udomchokmongkol</i>
Academic year 2007	Advisor's signature..... <i>K. Kittinan</i>
	Co-advisor's signature..... <i>Tanapat Palaga</i>
	Co-advisor's signature..... <i>Songchan Puthong</i>

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และคุณทรงจันทร์ ภูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ดร.นันทิกา คงเจริญพร ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำความช่วยเหลือ และช่วยแก้ปัญหาให้ได้อย่างเต็มความสามารถตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนเสร็จสิ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอนุมาศ บัวเขียว พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังกายและกำลังความคิด รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ในทุกด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุข ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณ พี่ๆ พี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้าน ด้วยดีตลอดมา

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก ความห่วงใย ทั้งให้กำลังใจอย่างมาก คอยเอาใจช่วยและปลอบโยนอยู่เสมอ รวมถึงการสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างไม่มีข้อแม้ นับตั้งแต่กำเนิดจนถึงปัจจุบัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	3
2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	5
2.1.1 เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin, ENRO).....	5
2.1.2 เทคโนโลยีการเลี้ยงเซลล์สัตว์.....	6
2.1.3 ไมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	7
2.1.4 การผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก.....	9
2.1.5 รูปแบบของกระบวนการเลี้ยงเซลล์ (Culture modes).....	12
2.1.6 การกักกันเซลล์ในการเลี้ยงระบบ perfusion.....	14
2.1.7 การใช้อุปกรณ์ spin filter สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบ perfusion.....	20
2.1.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตไมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	25
2.1.9 กลไกการสลายและการสังเคราะห์อาหาร.....	26
2.1.10 ค่าทางจลศาสตร์ (kinetic parameters).....	27

บทที่	หน้า
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและเทคโนโลยีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน stirred-tank reactor.....	28
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 เซลล์ไลน์ (cell line).....	31
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	31
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	33
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	35
3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา.....	35
3.4.2 การศึกษาการเตรียมเซลล์ตั้งต้นใน spinner flask.....	36
3.4.3 การติดตั้งระบบและการเตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน.....	37
3.4.4 การศึกษาการเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน.....	39
3.4.5 การศึกษาเรื่อง Inhibition concentration ของ แลคเทตและแอมโมเนีย.....	42
3.4.6 การศึกษาเรื่องประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (Retention capacity).....	43
3.4.7 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมา.....	44
3.4.8 การเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์และการวิเคราะห์ปริมาณสาร.....	45
3.4.9 การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA.....	47
4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	50
4.1 ผลของแอมโมเนียและแลคเทตต่อการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44.....	50
4.2 ศึกษาการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน spinner flask.....	53
4.3 ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่อการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor.....	55
4.4 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ fed-batch ใน stirred-tank bioreactor.....	66
4.5 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมา.....	75
4.6 ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter (retention capacity).....	77
4.7 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ perfusion ใน stirred-tank bioreactor.....	79
4.8 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography.....	103

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการทดลอง.....	105
6 รายการอ้างอิง.....	108
ภาคผนวก.....	119
ภาคผนวก ก.....	120
ภาคผนวก ข.....	123
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	130



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	ความเข้มข้นของแลคเทตและแอมโมเนียที่มีผลต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44.....53
4.2	ค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เมื่อเลี้ยงที่ค่า DO ต่างๆกัน.....62
4.3	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เมื่อเลี้ยงเซลล์ระบบ fed-batch.....74
4.4	ขนาดของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 มีชีวิตและเซลล์ตาย.....75
4.5	ปริมาณแอนติบอดีสะสมและมูลค่าของแอนติบอดีเมื่อใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 15 วัน.....87
4.6	สรุปค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ perfusion ด้วยอัตราต่างๆ.....100
4.7	สรุปค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบต่างๆ.....102



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ.....	11
2.2 การเลี้ยงเซลล์ในลักษณะแขวนลอยรูปแบบต่างๆ.....	12
2.3 หลักการทำงานของอุปกรณ์กักกันเซลล์แต่ละชนิด.....	15
2.4 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Hollow fiber module และ plate-and-frame module.....	16
2.5 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Vortex-flow filter.....	17
2.6 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Centrifuge.....	18
2.7 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Inclined settler.....	18
2.8 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Acoustic aggregation sedimenter.....	19
2.9 ลักษณะการติดตั้งและการทำงานของ internal spin filter.....	20
2.10 ลักษณะและทิศทางการสานของ spin filter ชนิดสแตนเลส.....	21
2.11 ภาพถ่าย SEM แสดงการเกิดคราบเซลล์อุดตันบน spin filter).....	22
2.12 แผนภาพแสดงเมแทบอลิซึมของเซลล์ไฮบริโดมา.....	26
3.1 แผนภาพแสดงระบบสำหรับการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน...	38
3.2 ลักษณะของใบพัดแบบ 3-blade segment impeller.....	38
3.3 แผนภาพแสดงการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion ใน stirred-tank bioreactor ที่ติดตั้ง spin filter ทำหน้าที่เป็นอุปกรณ์ในการกักกันเซลล์.....	42
3.4 แผนภาพแสดงระบบการเวียนน้ำเลี้ยงเซลล์แบบ recycle loop สำหรับการศึกษารื่องประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter (retention capacity).....	44
4.1 การเจริญและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ในงานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 24 หลุม เมื่อมีเซลล์เริ่มต้น ตั้งแต่ $0.25-10 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร.....	51
4.2 ความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 และความเข้มข้นของแอนติบอดี หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เมื่อมีความเข้มข้นของแลคเทตเริ่มต้นเท่ากับ 0-10 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0-10 มิลลิโมลาร์.....	52
4.3 การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน spinner flask ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นต่างๆ.....	54

รูปที่	หน้า
4.4 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44..56	56
4.5 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44.....58	58
4.6 ผลของค่า DO ต่อการผลิตแอมโมเนียและแลคเตตในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44.....59	59
4.7 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อเมแทบอลิซึมของกลูโคส.....60	60
4.8 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 20 % air saturation.....63	63
4.9 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 50 % air saturation.....64	64
4.10 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 80 % air saturation.....65	65
4.11 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติม FCS 100 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน.....67	67
4.12 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมกลูโคสให้กลับเป็น 4 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน.....69	69
4.13 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมกลูตามีน 0.4 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน.....71	71
โดยการเติมกลูโคสและกลูตามีน 2.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน.....73	73
4.15 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมาผ่านกล้องจุลทรรศน์ เทียบกับขนาดของ grid line บน hemacytometer.....76	76
4.16 ลักษณะการกระจายตัวของขนาดเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ที่มีชีวิต.....76	76
4.17 ความเร็วรอบของ spin filter ต่อการกักกันเซลล์ เมื่อควบคุมความเร็วรอบคงที่ที่ 75, 100, 125 และ 150 รอบต่อนาที และควบคุม perfusion rate เท่ากับ 0.25, 0.50 และ 1.0 vvd.....78	78
4.18 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ semi-continuous perfusion ผ่าน spin filter เปลี่ยนถ่ายอาหารวันละ 100 มิลลิลิตร.....81	81

รูปที่	หน้า
4.19 การเจริญเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.10, 0.20, 0.40 vvd ที่ใช้อาหารที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และ perfusion rate 0.40 และ 0.80 vvd ที่ใช้อาหารที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์.....	83
4.20 ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุลเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ perfusion rate ต่างๆ.....	84
4.21 ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (retention capacity) ที่ perfusion rate ต่างๆ.....	85
4.22 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในแต่ละวัน ที่ perfusion rate ต่างๆ.....	87
4.23 อัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ.....	88
4.24 ปริมาณแอนติบอดีสะสม และมูลค่าของแอนติบอดี เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ.....	88
4.25 ความเข้มข้นของแลคเทต และแอมโมเนีย เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ.....	90
4.26 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.10 vvd.....	95
4.27 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.20 vvd.....	96
4.28 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.40 vvd.....	97
4.29 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.40 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์.....	98
4.30 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.80 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์.....	99
4.31 โครมาโตแกรมแสดงการแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้คอลัมน์ Protein A sepharose ๖ ด้วยบัฟเฟอร์ซีเตรท 0.1 โมลาร์ pH 3.0 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....	103
4.32 SDS-PAGE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนโรฟลอกซาซินหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography.....	104

รูปที่	หน้า
ก.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส ENRO 44 ต่อแอนโรฟลอกซาซิน ที่ความเข้มข้น 0-150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	120
ก.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแอมโมเนีย ด้วยวิธี Indophenol blue reaction ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์.....	120
ก.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยวิธี BCA.....	121
ก.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกลูโคสความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร กับพื้นที่ใต้พีค ด้วยวิธี HPLC.....	121
ก.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแลคเตตความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร ด้วยวิธี HPLC.....	122
ก.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (หลังจากทำให้บริสุทธิ์) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	122

สัญลักษณ์และคำย่อ

BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
DO	Dissolved oxygen
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ENRO	enrofloxacin
FCS	Fetal calf serum
HRP	horseradish peroxidase
HPLC	high performance liquid chromatography
IgG	immunoglobulin G
kDa	kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MRLs	maximum residue limits
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
R_f	relative mobility
SDS-PAGE	sodium dodesyl sulfate poolyacrylamide gel electrophoresis
vvd	fresh media volume / working volume / day

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนโรฟลอกซาซินเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) ใช้มากในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบในสัตว์ สามารถใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ โดยสารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนนี้ทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระคายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และบางโอกาสอาจเกิดอาการเศร้าซึม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก เป็นต้น (Bertino และคณะ, 2000) จากการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซินทั้งในการทำปศุสัตว์ และการเลี้ยงปลาเป็นจำนวนมากทำให้สารเหล่านี้ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์ และดื้อยา จึงได้มีการจำกัดปริมาณเอนโรฟลอกซาซินตกค้างในอาหารบริโภค (Kummerer, 2004; Phillips และคณะ, 2004; Snary และคณะ, 2004) ในปัจจุบัน ประเทศต่างๆ ในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดมาตรฐานที่เข้มงวด เกี่ยวกับปริมาณสารตกค้าง ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง นำเข้าจากประเทศต่างๆ ดังนั้นผู้ผลิตอาหารแช่แข็ง จึงต้องตรวจวัดปริมาณสารเอนโรฟลอกซาซินที่ตกค้างอยู่ก่อนการส่งออกผลิตภัณฑ์ เพื่อรักษาตลาดส่งออก และสร้างความเชื่อมั่นในความปลอดภัยของสินค้าไทย วิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในการตรวจวัดเพื่อคัดกรอง (Screening test) คือ การใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปโดยใช้หลักการ ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการตรวจวัดสาร

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณมากในระยะแรก ผลิตได้จาก ascites fluid ในช่องท้องหนู ซึ่งต้องใช้หนูเป็นจำนวนมากและมีความผันแปรในเชิงคุณภาพมาก ต่อมาเมื่อมีความก้าวหน้าทางด้านเซลล์มากขึ้น จึงได้มีการพัฒนาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา โดยมีการศึกษาทั้งด้านวิธีการและเทคโนโลยีในการเลี้ยงเซลล์กันอย่างต่อเนื่องเพื่อการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะศึกษาการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) รูปแบบต่างๆ และมีการใช้ระบบ perfusion ร่วมด้วย เช่น Spin filter bioreactor, hollow fiber bioreactor, packed-bed bioreactor หรือใช้วิธีการตรึงเซลล์ เป็นต้น โดยมีเป้าหมายหลัก คือ การผลิตแอนติบอดีให้ได้ความเข้มข้นและปริมาณสูง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน สามารถผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหนูกับเซลล์ไมอีโดมาเข้าด้วยกัน การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred-tank bioreactor) พบว่ามีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง มีข้อได้เปรียบ คือ สามารถควบคุมภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้คงที่ได้ การติดตามการเปลี่ยนแปลงภายในถัง สามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งสามารถขยายการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นได้ง่าย

การเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณของแอนติบอดีสูงนั้น ขึ้นกับการรักษาระดับของเซลล์มีชีวิต และการเพิ่มอัตราการผลิตจำเพาะ การพัฒนากระบวนการเลี้ยงเซลล์จึงมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มตัวแปรทั้ง 2 ค่านี้ ซึ่งจะส่งผลให้ได้ผลผลิตสูง ดังนั้นจึงมักใช้กระบวนการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch เนื่องจากมีการสะสมของเซลล์และผลผลิตอยู่ภายในถัง ต่อมา มีการปรับปรุงการเลี้ยงเซลล์โดยการใช้ spin filter หรือ hollow fiber membrane ร่วมด้วย อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในแบบต่างๆ ยังคงมีปริมาณจำกัด สาเหตุส่วนหนึ่งเนื่องจาก ความหนาแน่นของเซลล์มีชีวิตยังคงน้อยอยู่ และมีระยะเวลาในการผลิตแอนติบอดีในช่วงสั้นๆ ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อความคุ้มค่า จึงมุ่งเน้นด้านการออกแบบอาหารเลี้ยงเซลล์และการควบคุมกระบวนการเลี้ยงเซลล์ รวมไปถึงการควบคุมปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการของเซลล์ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิต ทั้งนี้จำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องมีความเข้าใจเป็นอย่างดี ถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อสรีรวิทยาของเซลล์ และจุลศาสตร์ของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจาก มีความต้องการใช้งานโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้เตรียมชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดสารตกค้างเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้ การศึกษากระบวนการที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณที่ต้องการและมีความคุ้มค่า จึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน เพื่อศึกษากระบวนการเลี้ยงเซลล์และการผลิตแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ที่มีตัวกรองแบบหมุน (Spin filter bioreactor) เพื่อผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินให้ได้ปริมาณสูง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่มีตัวกรองแบบหมุน (Spin filter bioreactor)

1.4 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
2. เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่มีตัวกรองแบบหมุน ด้วยภาวะต่างๆ
 - 2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ใช้อาหาร RPMI 1640 ที่เติม Sodium bicarbonate, Glucose, L-Glutamine และ Sodium pyruvate ปรับ pH เท่ากับ 7.2 แล้วกรองผ่านเครื่องกรองเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
 - 2.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาเริ่มต้น นำเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ที่ได้มาจากการหลอมรวมเซลล์ลิ้มโฟไซต์จากม้ามหนูกับเซลล์ไมอีโดมา ซึ่งหลัง IgG, ต่อสารเอนโรฟลอกซาซิน เลี้ยงใน spinner-flask ขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารที่มี fetal calf serum (FCS) 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ CO₂ incubator ซึ่งมี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสำหรับเลี้ยงใน stirred-tank reactor ได้เท่ากับ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.2 ลิตร
 - 2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน stirred-tank reactor ใช้ reactor ขนาด 2 ลิตร ควบคุม อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วย water-jacket ควบคุม pH เท่ากับ 7.2 ภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์
 - 2.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน reactor ดังนี้
 - 1) ศึกษาการให้อากาศที่เหมาะสม ในการเลี้ยงเซลล์ระบบ batch โดยแปรค่าในช่วง 20-80 % air saturation เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะ และอัตราการผลิตจำเพาะในแต่ละ การทดลอง
 - 2) ศึกษาผลของการเติมซีรัม กลูโคส กลูตามีน และกลูโคสร่วมกับกลูตามีน ในการเลี้ยงเซลล์ ระบบ fed-batch เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอนติบอดีในแต่ละการทดลองกับ ระบบ batch
 - 3) ศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ต่อประสิทธิภาพการกักกัน เซลล์ของ spin filter

- 4) ศึกษาการเลี้ยงเซลล์แบบ semi-continuous perfusion ร่วมกับการใช้ spin filter โดยศึกษาผลของการเปลี่ยนถ่ายอาหารต่อการเจริญของเซลล์ การรักษาระดับเซลล์มีชีวิตได้เป็นเวลานาน และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
 - 5) ศึกษาการเลี้ยงเซลล์ระบบ Continuous perfusion ร่วมกับการใช้ spin filter โดยศึกษาผลของอัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (perfusion rate) ความเข้มข้นของซีรัมในอาหารที่ใช้เปลี่ยนถ่าย ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ การรักษาระดับเซลล์มีชีวิตได้เป็นเวลานาน และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2.5 การเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณสาร
- เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จากท่อเก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 5 มิลลิลิตร แบ่งมานับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer โดยเจือจางเซลล์ด้วยสีย้อม Trypan blue เพื่อหาค่า viability จากนั้นปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และสารต่างๆ ดังข้อ 3.
3. วิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA และหาปริมาณสารต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์
 - 3.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเป็นแอนติบอดีมาตรฐาน
 - 3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส, แลคเตต, แอมโมเนีย โดยใช้วิธีทางเคมี
 4. การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยผ่าน protein A column chromatography ล้างคอลัมน์และแยกส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย PBS pH 7.4 แล้วจึงแยก IgG ออกด้วย glycine buffer pH 3.0 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
 5. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วย SDS-PAGE

ให้ความร้อนโปรตีนตัวอย่างใน loading buffer ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำ Electrophoresis โดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ SDS-polyacrylamide (w/v) ในส่วนของ resolving gel ที่ความต่างศักย์ 100 V ย้อมสีโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie brilliant blue หลังจากล้างสีออก จะปรากฏแถบของโปรตีน 2 แถบ ขนาดประมาณ 25 และ 50 kDa
 6. สรุปและวิเคราะห์ข้อมูล เขียนวิทยานิพนธ์

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin, ENRO)

เอนโรฟลอกซาซิน หรือ 1-cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinoline carboxylic acid (hydrochloride) เป็นยาต้านจุลชีพในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ออกฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน ออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ ใช้มากในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารในโค สุกร และสัตว์ปีก จากการที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเอนโรฟลอกซาซินทั้งในการทำปศุสัตว์ และการเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อบริโภคเป็นจำนวนมาก ทำให้สารเหล่านี้ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารบริโภค และเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร เป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ และยังเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยา เชื้อแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ในสัตว์สามารถจะถ่ายทอดมาสู่มนุษย์ได้ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ (Kummerer, 2004; Phillips และคณะ, 2004; Snary และคณะ, 2004) สารปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น อาเจียน ท้องเสีย ระบายเคืองผิวหนัง และยังมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ปวดหัว อ่อนเพลีย และอาจเกิดอาการเซ้าซี้ม นอนไม่หลับ ประสาทหลอน และชัก

จากการใช้เอนโรฟลอกซาซินอย่างแพร่หลาย ทำให้มีการพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการดื้อต่อยาในกลุ่มควิโนโลนและฟลูออโรควิโนโลนเพิ่มขึ้นในสัตว์หลายชนิดที่นำมาบริโภค รวมถึงพบในมนุษย์ด้วย ภายหลังจากที่เริ่มมีการนำยาในกลุ่มนี้มาใช้ในการรักษาสัตว์ สหรัฐอเมริกาได้ยกเลิกการใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินในสัตว์ปีก โดยระบุว่า การใช้ยานี้ทำให้เกิดการดื้อต่อยาของเชื้อ *Campylobacter spp.* (FDA, 2000) แต่ในสหภาพยุโรปและหลายประเทศในเอเชียรวมถึงประเทศไทย ยังคงมีการใช้เอนโรฟลอกซาซินอยู่ จึงได้มีการจำกัดปริมาณสารตกค้างในอาหาร โดยสหภาพยุโรปได้กำหนดค่า maximum residue limit (MRL) ในกล้ามเนื้อหรือไขมันของโค สุกร สัตว์ปีก และนมโค มีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2002)

2.1.2 เทคโนโลยีการเลี้ยงเซลล์สัตว์

2.1.2.1 ประวัติการเลี้ยงเซลล์สัตว์

ประวัติการเลี้ยงเซลล์สัตว์มีจุดเริ่มต้นมาตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 การทดลองในตอนต้นมีจุดประสงค์เพื่อยืดอายุชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในพลาสมาหรือ ascites fluids ซึ่งมีอุปสรรค คือ ความต้องการอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารอาหารเหมาะสมเพียงพอ และความไม่เหมาะสมของการปฏิบัติการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่มีอยู่ ต่อมา มีรายงานการเก็บรักษาและการเจริญของเซลล์ประสาทได้นานมากถึง 30 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเซลล์ปกติสามารถดำเนินต่อไปได้ในลักษณะ *in vitro* การค้นพบสารปฏิชีวนะ พร้อมกับพัฒนาการทางด้านเทคนิคปลอดเชื้อในเวลาต่อมา เป็นสิ่งที่สนับสนุนความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ด้านการเลี้ยงเซลล์สัตว์ครั้งสำคัญ (Spier, 2000; Kretzmer, 2002)

ในปี 1953 Mary Kubicek สามารถแยก HeLa cell ได้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีเซลล์ที่เหมาะสมแก่การทำ animal cell culture มีการเจริญที่นำเชื้อถือ ต่อมาในปี 1955 มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด defined medium ชื่อ EMEM (Eagle's minimum essential medium) ที่สามารถใช้แทน biological fluids สำหรับการเลี้ยงเซลล์ได้ (Eagle, 1955) ในช่วงปี 1940-1975 มีการพัฒนาวัคซีนต่อไวรัสที่มีประสิทธิภาพหลายชนิดจากการเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันต้านทานโรคทั้งในมนุษย์ เช่น คางทูม หัด และหัดเยอรมัน รวมไปถึงวัคซีนที่ใช้ในทางสัตวบาล เช่น foot-and-mouth diseases อีกด้วย ตั้งแต่ปี 1970 เป็นต้นมา เป็นช่วงที่มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมา และมีการเลี้ยงเซลล์ที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อผลิต biopharmaceutical หรือ growth factor (Spier, 2000)

2.1.2.2 เทคโนโลยีการเลี้ยงเซลล์ในภาคอุตสาหกรรม

การนำเทคโนโลยีด้านการเลี้ยงเซลล์ ไปสู่เทคโนโลยีในภาคอุตสาหกรรมเกิดขึ้นครั้งแรกในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ (Salk polio vaccine) ในเซลล์ไตของลิงชนิดที่เป็นเซลล์ปฐมภูมิ (primary monkey kidney cell) (Griffiths, 2000) เนื่องจาก primary cell มีคุณสมบัติ anchorage-dependent ดังนั้นการผลิตจึงเป็นแบบ multiple-unit process ความก้าวหน้าหลักในภาคอุตสาหกรรมเกิดขึ้นเมื่อปี 1962 เมื่อ Capstick และคณะ ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเซลล์ BHK (baby hamster kidney) ในลักษณะแขวนลอย เช่นเดียวกับที่ใช้ในจุลินทรีย์ ผนวกกับการสร้างเซลล์ไลน์ (permanent cell line) ได้สำเร็จ เป็นแรงขับเคลื่อนการพัฒนากระบวนการระดับสเกลใหญ่ในภาคอุตสาหกรรม ต่อมา มีการใช้เซลล์ไลน์ที่มีความปลอดภัยขึ้น ทำให้มีวัคซีนที่ได้รับใบอนุญาตมีเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ โรคหัด (1963), โรคพิษสุนัขบ้า (1964), คางทูม (1969) และหัดเยอรมัน (1969)

กระบวนการผลิตทั้งหมดเป็นแบบ batch โดยเลี้ยงเซลล์จนมีความหนาแน่นสูง แล้วจึงติดเชื้อเซลล์ด้วยไวรัส หลังจากไวรัสเพิ่มจำนวน ก็จะเก็บเกี่ยวเอาแต่เพียงไวรัสเท่านั้นโดยไม่นำเซลล์กลับมาใช้อีก (Kretzmer, 2002) ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีด้าน gene manipulation และการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) ทำให้สามารถผลิตโปรตีน ด้วยวิธีการเลี้ยงแบบ *in vitro* ได้เป็นจำนวนมาก มีการนำจุลินทรีย์มาใช้สำหรับเทคโนโลยีทางด้าน gene recombination (Tokashiki และคณะ, 1997) แต่พบว่าผลิตภัณฑ์บางชนิดที่ได้ มีคุณสมบัติทางชีวภาพไม่สมบูรณ์ เนื่องจากความบกพร่องของหมู่คาร์โบไฮเดรตและความแตกต่างของโครงสร้างตติยภูมิและจตุรภูมิ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาการผลิตโปรตีนโดยใช้เซลล์สัตว์เป็นเจ้าบ้าน ด้วยการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์และการศึกษาวิธีการเลี้ยงเซลล์ ทำให้สามารถผลิตสารทางชีวภาพได้ด้วยเซลล์สัตว์ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน

การผลิตสารในแบคทีเรียมีความสะดวก เนื่องจาก มีอัตราการเจริญสูง กระบวนการผลิตไม่ยุ่งยาก และมีต้นทุนราคาต่ำ แต่พบปัญหาที่สำคัญ คือ แบคทีเรียและยีสต์ไม่สามารถให้โครงสร้างโปรตีนตติยภูมิและจตุรภูมิที่ถูกต้องได้ และยังมีความสามารถต่อกระบวนการ post-translation modification เช่น glycosylation, amidation, acetylation และ phosphorylation ที่จำกัดอีกด้วย ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จำเป็นต่อคุณสมบัติการละลาย การหลั่ง และอายุของโปรตีน ทั้งยังช่วยปกป้องโปรตีนจากระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านได้ด้วย (Blohm และคณะ, 1988; Leist และคณะ, 1990) กระบวนการ post-translation modification ที่ซับซ้อน และระบบ chaperon ที่พบในเซลล์สัตว์ ทำให้เชื่อมั่นได้ว่าโปรตีนที่ได้มีโครงสร้าง 3 มิติ ในรูปแบบที่ถูกต้อง (Hauser, 1997; Sandig และคณะ, 2005) ส่วนเซลล์สัตว์ มีความต้องการอาหารอย่างจำเพาะ และต้องการปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอ มีค่าจลนศาสตร์ของการเจริญช้าและมีความเข้มข้นเซลล์ต่ำ มีการตอบสนองไวต่อแรงกล และยังต้องระวังการติดเชื้อไวรัสได้อีกด้วย ซึ่งล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงต้องมีการติดตามกระบวนการการเลี้ยงเซลล์อย่างใกล้ชิด แต่ถึงแม้ว่าการเลี้ยงเซลล์จะมีความยุ่งยาก ซับซ้อนอยู่หลายประการ แต่เซลล์สัตว์ยังคงเป็นระบบที่ได้รับความสนใจสำหรับการผลิตไกลโคโปรตีนอย่างมาก

2.1.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดมาจาก บี ลิมโฟไซต์ เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่อเอพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดี

สามารถผลิตขึ้นในห้องทดลองด้วยวิธีต่างๆ ที่สำคัญมี 2 วิธี คือ somatic hybridization เป็นการหลอมรวมเซลล์ บี ลิมโฟไซต์ ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ เข้ากับอีกเซลล์หนึ่งซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง วิธีการนี้ทำให้ได้เซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) เป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดี และสามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่มีสิ้นสุด (Köhler and Milstein, 1975) ส่วนอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อแยกเอายีนอิมมิวโนโกลบูลินออกมาดัดแปลง แล้วนำกลับเข้าไปในเซลล์ใหม่ เป็นการดัดแปลงในระดับยีน ทำให้โมเลกุลแอนติบอดีมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปตามที่ต้องการ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยวิธีนี้เรียกว่า แอนติบอดีที่ดัดแปลงพันธุกรรม (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537) โมโนโคลนอลแอนติบอดี สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในงานหลายด้าน ดังนี้

1. งานวิจัย การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้สามารถจำแนกชนิดและหน้าที่ของโมเลกุลบนผิวเซลล์ได้ เช่น CD (cluster of differentiation) monoculture, HLA และ blood group Ag ต่างๆ
2. การแยกสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากแอนติบอดีมีคุณสมบัติเป็น monospecific จึงนำมาใช้ในการแยกสารด้วยวิธี affinity chromatography จะได้สารที่ต้องการที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี
3. การวินิจฉัยโรค โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะที่สูงมาก เพราะสามารถเลือกใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจเท่านั้น จึงนำมาใช้ในการตรวจสอบต่างๆ เช่น มะเร็ง (Lee และคณะ, 1985) การจำแนก HLA ของผู้ป่วยที่ต้องการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ การตรวจ T cell subpopulation ในผู้ป่วย AIDS เป็นต้น
4. การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการรักษาโรค ส่วนใหญ่ใช้ในการรักษามะเร็ง (Gregory และคณะ, 2005; Stern และคณะ, 2005) และการกำจัด T cell ออกจากผู้ป่วยที่ต้องการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ การกำจัดยาบางชนิดออกจากร่างกายในการรักษาโรคหัวใจ เป็นต้น
5. การตรวจติดตามสารตกค้าง โดยใช้เทคนิค ELISA สำหรับสารเคมีหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะ เช่น สารในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน สารเร่งเนื้อแดงและฮอร์โมน เช่น สารในกลุ่ม บีตา-อะโกนิสต์ โปรเจสเทอโรน เป็นต้น เพื่อให้สอดคล้องกับหลักปฏิบัติ เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค (Watanabe และคณะ, 2002; Roda และคณะ, 2000)

2.1.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก

2.1.4.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องของหนู

การฉีดเซลล์ไฮบริโดมาเข้าไปในช่องท้องของหนู เซลล์ไฮบริโดมาจะไปเจริญและหลั่งแอนติบอดีออกมาภายในช่องท้องของหนู หนูจะให้ของเหลวที่ได้ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงถึง 3-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Bruce และคณะ, 2002) วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำ ได้แอนติบอดีเข้มข้นสูงในระดับมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนข้อเสียคือ สร้างความเจ็บปวดและความทุกข์ทรมานให้แก่สัตว์ทดลอง การผลิตแอนติบอดีปริมาณมากต้องใช้หนูเป็นจำนวนมาก ต้องระวังการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียจากสัตว์ มีการปนเปื้อนอิมมูโนโกลบูลินที่มีใน peritoneal cavity จากหนูอยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ การควบคุมการผลิตซ้ำและความสม่ำเสมอของกระบวนการทำได้ยาก อีกทั้งยังมีปัญหาเรื่องจริยธรรมในการใช้สัตว์อีกด้วย (Vetterlein, 1989)

งานวิจัยที่ใช้วิธีอื่นในการผลิตแอนติบอดีได้เริ่มมีรายงานมากขึ้นตั้งแต่ปี 1990 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาและการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง เป็นสิ่งที่ทั่วโลกให้การยอมรับน้อยลงจนถึงปัจจุบัน ประเทศในยุโรปหลายประเทศมีข้อกำหนดห้ามการใช้เทคนิคนี้ ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว (Falkenberg และคณะ, 1998)

2.1.4.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

การพัฒนาของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเลี้ยงเซลล์สัตว์ มีพื้นฐานจากคุณสมบัติของเซลล์ที่ต่าง ๆ กัน เซลล์สัตว์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ขึ้นอยู่กับรูปแบบการเพิ่มจำนวนและการเจริญ ได้แก่ เซลล์ชนิด anchorage-dependent จะเกาะติดและเจริญอยู่บนผิวหน้าของแข็ง และเซลล์ชนิด anchorage-independent เช่น เซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี จะมีการเจริญในรูปแขวนลอย ไม่ต้องการพื้นผิวสำหรับเกาะ

1. Suspended cell bioreactor

การเลี้ยงเซลล์ในลักษณะแขวนลอยมักจะใช้กับเซลล์ชนิด anchorage-independent ประกอบด้วยระบบการผสมให้ออกซิเจนในลักษณะเนื้อเดียว สารอาหารและออกซิเจนจึงกระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งถัง ทำให้สามารถติดตามและควบคุมค่าตัวแปรต่างๆ ของการเลี้ยงเซลล์ได้อย่างแม่นยำ ทั้งสารอาหาร เมแทบอลิต์ และผลิตภัณฑ์ และยังให้คุณภาพของโปรตีนที่ดีกว่าเนื่องจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่ง่าย (Werner และคณะ, 1992) นอกจากนี้ ยังมีช่วงเวลาที่เหมาะสม มีความเสถียร สามารถทำซ้ำได้และสะดวกต่อการขยายขนาดการผลิต ด้วยเหตุผลเหล่านี้ การเลี้ยงเซลล์ใน

ลักษณะแขวนลอย จึงเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดระบบหนึ่ง สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในระดับใหญ่ และนิยมใช้มากในภาคอุตสาหกรรม ตัวอย่างดังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้ ได้แก่ stirred-tank, airlift หรือ bubble column และ bubble-free bioreactor

Stirred-tank bioreactor ประกอบด้วยหน่วยที่ทำหน้าที่กวนผสม หรือใบพัดที่มีการปรับปรุงจนเหมาะสม ให้การกวนทั่วถึงและต้องทำให้ความเสียหายของเซลล์อันเกิดจากแรงเฉือนระหว่างการกวนเกิดขึ้นน้อยที่สุดด้วย (Prokop และคณะ, 1989) Stirred-tank bioreactor มีข้อได้เปรียบในหลายด้าน ได้แก่ ภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็นลักษณะเดียวกันทั่วทั้งถัง ความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง มีการพัฒนาปรับปรุงระบบการควบคุมค่าตัวแปรต่างๆ มาเป็นอย่างดี เช่น pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย ซึ่งเป็นค่าที่ล้วนมีผลกระทบต่อการเจริญและคุณสมบัติของเซลล์ (Carswell และคณะ, 2000) แต่ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้ค่อนข้างต่ำ

Airlift bioreactor มีการส่งอากาศเข้าสู่ถังผ่านท่อที่ติดตั้งอยู่ภายใน สู่บริเวณศูนย์กลางของถังแล้วให้ฟองอากาศลอยขึ้นแทนลักษณะการกวน จึงไม่จำเป็นต้องใช้ใบพัด ส่งผลให้มีแรงเฉือนจากอุปกรณ์ลดลง ระบบนี้มีรูปแบบที่ไม่ยุ่งยากและขยายขนาดได้ง่าย และได้มีการนำไปใช้ในการเลี้ยงเซลล์ในรูปแขวนลอย แต่เซลล์ก็ยังคงได้รับผลกระทบจากแรงเฉือนและความปั่นป่วนอันเกิดขึ้นจากฟองอากาศ (Arathoon และคณะ, 1986; Grima และคณะ, 1997)

Lehmann และคณะ (1985) ได้พัฒนาระบบการให้อากาศแบบ bubble-free สำหรับการเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะ เพื่อเลี่ยงปัญหาอันเกิดจากฟองอากาศ เช่น แรงเฉือน และ turbulence โดยใช้เมมเบรนที่ขดม้วนอยู่บนอุปกรณ์รองรับเป็นอุปกรณ์ให้อากาศ ซึ่งจะหมุนช้าๆ อยู่ภายในถัง เกิดเป็นลักษณะคล้ายการกวน ทำให้สามารถให้อากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพและเกิดแรงเฉือนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถแก้ปัญหาการเกิดโฟม ที่มักพบใน stirred tank และ airlift bioreactor

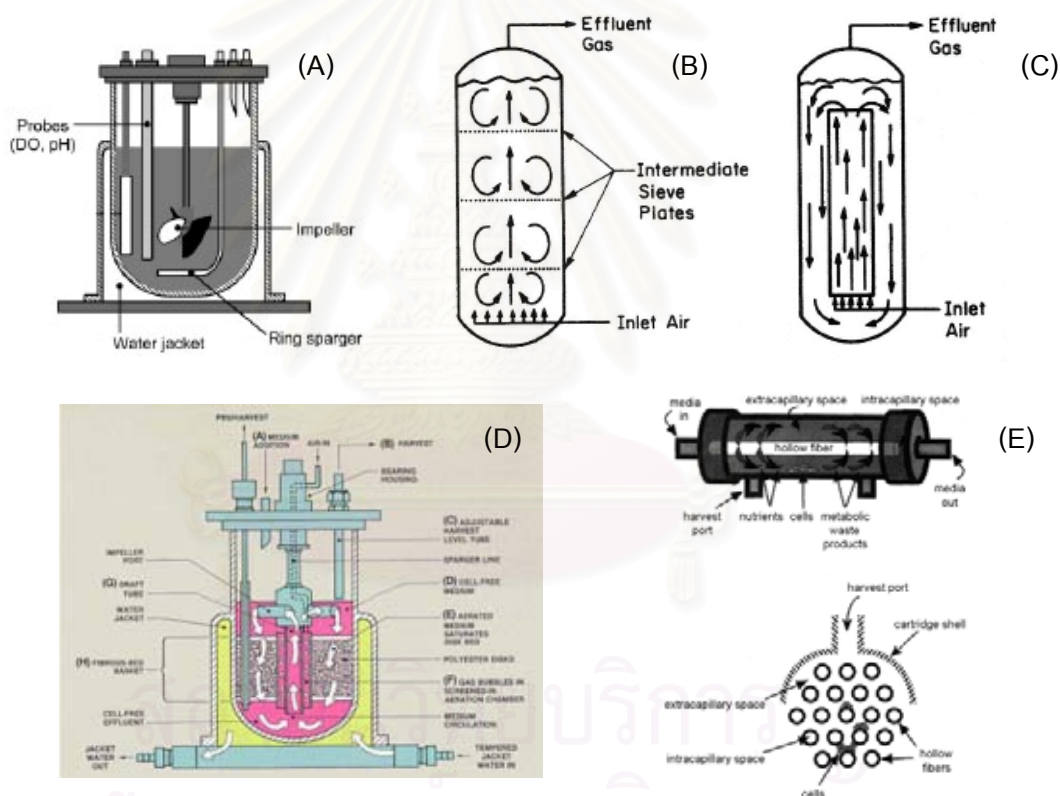
2. Microcarrier bioreactor

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มักใช้กับเซลล์ชนิด anchorage-dependent เป็นหลัก โดยอาศัย microcarrier ที่เป็นเม็ดขนาดเล็ก รูปร่างกลม เพื่อช่วยค้ำจุนในการเจริญของเซลล์ (Pringle, 1992) สามารถแบ่งออกเป็นแบบแขวนลอย และแบบ fixed bed สำหรับแบบแขวนลอย รูปแบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพประกอบด้วย stirred tank และ airlift bioreactor (Ganzeveld และคณะ, 1995) carrier ที่มีเซลล์ตรึงอยู่จะถูกกวนผสมและลอยอยู่ในน้ำเลี้ยงแทนเซลล์ อัตราการผสมและการให้อากาศที่เพียงพอ จะขึ้นอยู่กับความเร็วของการกวนหรืออัตราการให้อากาศ เนื่องจากการรักษาสภาพให้ microcarrier อยู่ในรูปแขวนลอย ทำให้มีการปะทะและการเสียดสีของ carrier เป็นการเพิ่มแรงเฉือนแก่เซลล์มากขึ้น ส่วนแบบ Fixed bed bioreactor ประกอบขึ้นด้วยถังที่บรรจุด้วย

microcarrier bead อาหารที่ผ่านการเติมอากาศ จะถูกปั๊มเข้าจากพื้นล่างของถังผ่านชั้นของ bead ขึ้นมา ประกอบด้วย 2-3 แบบขึ้นกับตัวกลางที่ใช้ เช่น packed bed bioreactor และ ceramic matrix bioreactor เป็นต้น

3. hollow fiber bioreactor

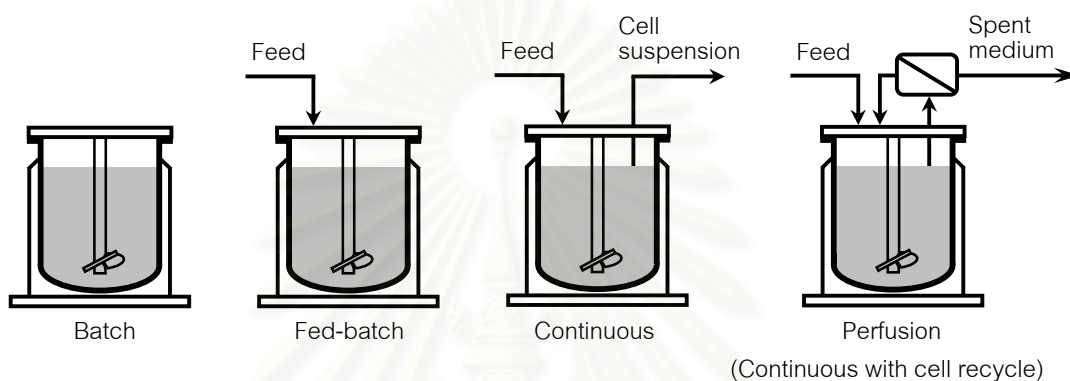
การเลี้ยงเซลล์ในฮอลโลว์ไฟเบอร์ มีไฟเบอร์เป็น semipermeable membrane สามารถเก็บแยกแอนติบอดีออกมาได้ง่าย แอนติบอดีที่ได้มีความเข้มข้นสูง ส่วนข้อเสียคือ ยากในการขยายขนาดการผลิตและการควบคุมภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่น ความเป็นกรด-เบส ปริมาณออกซิเจน และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 2.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ (A) Stirred-Tank bioreactor (B) Bubble-Column bioreactor (C) Airlift Loop bioreactor (D) Packed bed bioreactor (E) Hollow fiber bioreactor

2.1.5 รูปแบบของกระบวนการเลี้ยงเซลล์ (Culture modes)

ระบบการเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบเซลล์แขวนลอย (Suspension culture system) สามารถดำเนินการได้ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ batch, fed-batch และ continuous ทั้งแบบที่มีและไม่มีกากกันเซลล์ ความแตกต่างระหว่างแต่ละรูปแบบ คือ วิธีการป้อนสารอาหาร และการนำเอา น้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากถัง รูปแบบการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 4 รูปแบบ เป็นดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การเลี้ยงเซลล์ในลักษณะแขวนลอยรูปแบบต่างๆ

2.1.5.1 Batch cultivation

การเลี้ยงเซลล์แบบ batch คือ ระบบการเลี้ยงเซลล์แบบปิด มีการเติมอาหารในถังเพียงครั้งเดียว ในระหว่างการเพาะเลี้ยง จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆอีกทั้งการเติมอาหารเพิ่มหรือการนำออก มีเพียงการควบคุมค่าตัวแปรค่าต่างๆ (อากาศ, pH, อุณหภูมิ) ให้เหมาะแก่การเจริญเท่านั้น เป็นระบบการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้กันทั่วไป การเลี้ยงไม่ยุ่งยาก แต่เซลล์จะสัมผัสกับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในที่สุดจะจำกัดความสามารถของเซลล์ไม่ให้มีการเจริญได้อย่างเต็มที่ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็ว อันเนื่องมาจาก สารอาหารหมดลง และ/หรือการสะสมของผลผลิตที่เป็นพิษ (Dorrestein และคณะ, 1996; Eyer และคณะ, 1995; Schneider และคณะ, 1997) ส่งผลให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้มักจะต่ำ และผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็มีความเข้มข้นต่ำเช่นกัน (Pringle, 1992; Tokashiki และคณะ, 1997) ระบบนี้มีสัดส่วนของเวลาที่ไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ในระหว่าง batch และ ผลผลิตในเชิงปริมาณมักจำกัด เซลล์ไลน์หลายชนิดตอบสนองต่อตัวแปรด้วยระบบการทำลายตัวเอง หรือ apoptosis (Al-Rubeai และคณะ, 1998) ความจำกัดของสารอาหาร โดยเฉพาะกลูโคสและกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดเป็นปัจจัยหลักที่เป็นสาเหตุการตายในระหว่างการเลี้ยงแบบ batch นอกจากนี้ ยังพบว่ากรดอะมิโนไม่จำเป็นก็มีส่วนกระตุ้นให้เกิดได้เช่นกัน แต่ในระดับที่น้อยกว่า (Mercille และคณะ, 1994; Singh และคณะ, 1994)

2.1.5.2 Fed-batch cultivation

ระบบการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch เป็นระบบที่มีการเติมสารอาหารที่จำกัดจำนวนหนึ่งเพิ่มลงไปในช่วงการเลี้ยงเซลล์ อาจเติมเข้าสู่ระบบแบบต่อเนื่องหรือเป็นช่วงเวลา (Glacken และคณะ, 1986; Jang และคณะ, 2000) โดยไม่มีการนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากภายในออก ทำให้สามารถปรับสารอาหารชนิดที่จำกัด ให้กลับมาอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมได้ระหว่างช่วงเวลาของการเจริญ และสามารถหลีกเลี่ยงการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับ batch แล้ว จะให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่า และระยะเวลาดำเนินการที่นานกว่า ส่งผลให้ volumetric productivity สูงขึ้นด้วย แต่ก็ยังคงพบการยับยั้งการเจริญอยู่ สาเหตุหลักน่าจะเป็นปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ การสะสมของเมแทบอลิต์ที่เป็นของเสียมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนอาจส่งผลยับยั้งการเจริญ และเซลล์ก็จะตายเมื่อของเสียสะสมถึงระดับหนึ่งๆ (Sandig และคณะ, 2005)

2.1.5.3 Continuous cultivation

การเลี้ยงเซลล์ในระบบต่อเนื่อง (Continuous cultivation) เป็นระบบการเลี้ยงที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าสู่ bioreactor อย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เดียวกัน ก็มีการนำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์จากภายในออกมาในปริมาตรที่เท่ากัน ด้วยวิธีการนี้ ทำให้สามารถยืดระยะเวลาการดำเนินงานออกไปได้ยาวนานมากกว่า batch และ fed-batch สามารถคงสถานะสมดุลไว้ได้และให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้นด้วย แต่เนื่องจากเซลล์สัตว์มีการเจริญช้า ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์จึงต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงแบบ batch และจะคงที่อยู่ที่ค่านั้น การเลี้ยงเซลล์แบบ continuous นี้แบ่งแยกออกเป็น chemostat culture และ perfusion culture

Chemostat culture

ในระบบ continuous chemostat culture นี้ จะมีการนำเซลล์ออกมาจากระบบพร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วยอัตราที่ตั้งค่าไว้ ดังนั้นปริมาณของเซลล์ที่เจริญจะเท่ากับปริมาณที่นำออกไปจากระบบพร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ ได้เป็นภาวะสมดุลของความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการไหล (flow rate) จะเท่ากับ specific growth rate ดังนั้นเมื่ออัตราการไหลสูงกว่าอัตราการเจริญสูงสุดแล้ว จะมีผลให้เซลล์ถูกชะออกจากถังมากเกินไป ระบบนี้สามารถควบคุมเรื่องความจำกัดของอาหารได้ และมีการนำเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษออกไปอย่างต่อเนื่อง แต่การสูญเสียเซลล์ออกไปพร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ก็เป็นอุปสรรคที่ทำให้ระบบนี้ไม่สามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์รวมทั้งความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้อย่างเต็มที่

Perfusion culture

การเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion เป็นรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตโปรตีนโดยเซลล์สัตว์ ในระบบนี้ อาหารเลี้ยงเซลล์จะไหลอย่างต่อเนื่องผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ในขณะที่เซลล์ถูกกักไว้ให้คงอยู่ภายในถัง (Zhang และคณะ, 1998; Sandig และคณะ, 2005) มีการแลกเปลี่ยนอาหารเกิดขึ้นอยู่ภายในถัง และสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงได้อย่างดี นอกจากนี้ ยังมีการนำเมแทบอลไลต์ที่เป็นพิษต่อเซลล์ออกไปอย่างต่อเนื่อง และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาพร้อมกันด้วย ซึ่งเป็นการลดปัญหาเรื่องการสะสมของผลิตภัณฑ์ และความเสถียรของโปรตีน ระบบนี้สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธีการตรึงเซลล์หรือใช้เครื่องมือกักกันเซลล์ร่วมด้วย

(Banik และคณะ, 1995; Griffiths และคณะ, 1992; Jäger และคณะ, 1996) เมื่อสามารถปฏิบัติการได้นานขึ้น จึงทำให้ได้ผลผลิตในเชิงปริมาตรต่อถัง (volumetric productivity) สูงขึ้นกว่า batch และ fed-batch ด้วย (Reuveny และคณะ, 1986; Tramler และคณะ, 1994) โดยไม่จำเป็นต้องเพิ่มขนาดถัง นอกจากนี้ ในระหว่างการดำเนินงาน สามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์ให้คงไว้ได้ เพราะฉะนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีคุณภาพคงที่ สม่าเสมอ (Su, 2000; Castilho และคณะ, 2002; Voisard และคณะ, 2003) สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยการสะสมของ substrate ที่ความเข้มข้นสูงได้ด้วยการจำกัดปริมาณให้เพียงพอแค่สำหรับการเจริญและการรักษาสภาพอยู่ ระบบ perfusion มีข้อได้เปรียบในเรื่องการนำเอาผลิตภัณฑ์และเมแทบอลไลต์ที่เป็นพิษออกจากถัง ทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงต่อการเสียหายของโปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพดีเนื่องจากสภาวะภายในถังมีความเสถียร ลดค่าใช้จ่ายจากการที่สามารถดำเนินการได้นานขึ้น และลดปริมาตรของ working volume ลง (Prior และคณะ, 1989) รูปแบบการเลี้ยงเซลล์นี้ ยังคงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการผลิตโปรตีนให้ได้ความเข้มข้นสูง ในระยะเวลาอันยาวนาน แม้ว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ จะต้องใช้แรงงานมาก เนื่องจากความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นอาจต่ำกว่าในบางระบบ

วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ perfusion ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม ขึ้นอยู่กับอุปกรณ์กักกันเซลล์ที่มีความเหมาะสม มีประสิทธิภาพและสะดวกต่อการใช้งาน มีอุปกรณ์แยกกันเซลล์หลายชนิดที่ใช้สำหรับกักเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในระหว่างการเลี้ยงแบบ perfusion

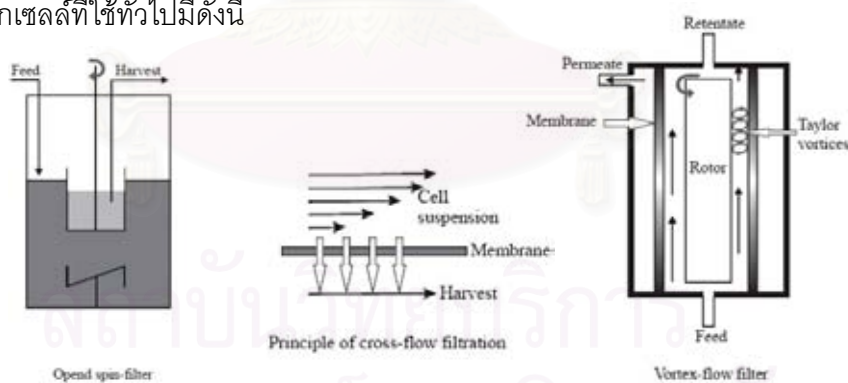
2.1.6 การกักกันเซลล์ในการเลี้ยงระบบ perfusion

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับแยกหรือกักกันเซลล์สำหรับระบบ perfusion มีหลากหลายชนิด อุปกรณ์เหล่านี้มีทั้งที่ติดตั้งอยู่ภายในหรือภายนอกถังเลี้ยงเซลล์ อุปกรณ์ที่ติดตั้งภายในนั้น การใช้งานไม่ยุ่งยากและมีความปลอดภัย ส่วนอุปกรณ์ที่ติดตั้งภายนอกก็สามารถดัดแปลงหรือปรับแต่งสำหรับการขยายสเกลได้ดี และง่ายต่อการบำรุงรักษา แต่ระบบภายนอกนั้นก็มีข้อจำกัดในเรื่อง ความเสียหาย

ของเซลล์อันเกิดจากแรงเฉือนจากการใช้ pump และระยะเวลาที่เซลล์ต้องอยู่ภายนอกถังค่อนข้างนานภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสมแก่เซลล์ วิธีที่ใช้ในการแยกเซลล์ จะอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมีของเซลล์สัตว์ ได้แก่ ขนาด ความหนาแน่น มวล ประจุไฟฟ้า และ คุณสมบัติความชอบน้ำ โดยที่เรื่องขนาดและความหนาแน่น เป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเซลล์สัตว์ระดับใหญ่ในภาคอุตสาหกรรม (Pretlow และคณะ, 1982) เป้าหมายหลักของอุปกรณ์แยกเซลล์ต่างๆนี้ คือ ให้ประสิทธิภาพของการกักกันเซลล์ได้ดี ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ มีความเสถียรตลอดระยะเวลาของการทำงาน สามารถทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้ และสามารถปฏิบัติการในระดับใหญ่ที่มีอัตราของ perfusion rate สูงได้ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นข้อจำกัดหลักต่อการพัฒนาอุปกรณ์แยกกันเซลล์ชนิดใหม่ๆขึ้นมา สำหรับเทคนิคการแยกเซลล์สัตว์ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน จะอาศัยคุณสมบัติของขนาดและความหนาแน่นเป็นหลัก มีดังนี้

2.1.6.1 การแยกโดยอาศัยขนาด

การแยกเซลล์จากน้ำเลี้ยงโดยใช้ระบบการกรอง เป็นวิธีที่ใช้กันมาตั้งแต่แรกเริ่ม มีหลักการโดยทั่วไป คือ การแยกเซลล์โดยตาข่ายกรองซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกีดขวาง ปัญหาหลักของการแยกเซลล์ด้วยวิธีนี้ คือ เรื่องความสกปรกของตัวกรอง ซึ่งจะจำกัดเสถียรภาพ อัตรา perfusion และลดระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ลง อุปกรณ์มีทั้งแบบ internal และ external filtration โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกเซลล์ที่ใช้ทั่วไปมีดังนี้



รูปที่ 2.3 หลักการทำงานของอุปกรณ์กักกันเซลล์แต่ละชนิด

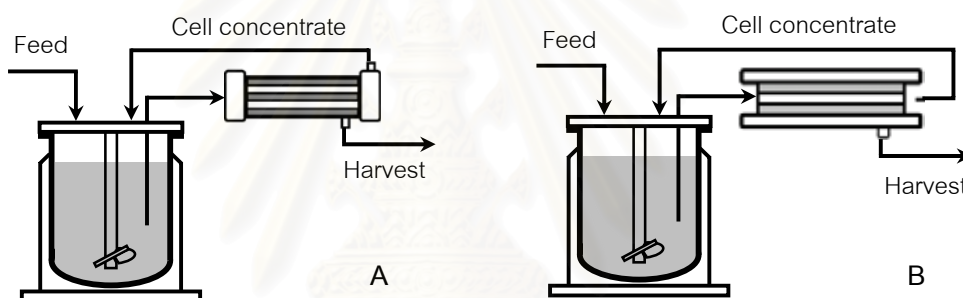
1. Spin filter

เป็นวิธีที่อาศัยวัสดุกรองโลหะในการกักกันเซลล์ อนุภาคจะถูกแยกออกเนื่องจาก steric effect ของวัสดุกรองซึ่งหมุนอยู่ การใช้ spin filter มีทั้งแบบติดตั้งภายในและภายนอก (Voisard และคณะ, 2003) ตัวแปรที่มีผลต่อกระบวนการแยกเซลล์ และ ประสิทธิภาพการ retention ของ spin filter ได้แก่ ความเร็วรอบ, perfusion rate, วัสดุที่ใช้ทำ filter, ขนาดรูพรุน และความเข้มข้น

ของเซลล์ การดำเนินงานที่ให้การกักเซลล์ที่ดีพอที่ perfusion rate สูงและการเกิดคราบเซลล์เกาะน้อยที่สุด เป็นเรื่องที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของระบบนี้ และเนื่องจากการที่ไม่สามารถเปลี่ยนอุปกรณ์ที่ติดตั้งอยู่ภายในได้ จึงต้องออกแบบ spin filter และกระบวนการอย่างดี เพื่อหลีกเลี่ยงการอุดตันอันจะทำให้การเลี้ยงเซลล์สิ้นสุดเร็วเกินไป

2. Cross-flow filtration

Cross-flow filtration เป็นระบบการแยกเซลล์ภายนอกแบบหนึ่ง อาศัยการไหลที่ผิวสัมผัสบนผิวหน้าตัวกรอง เพื่อลดการเกิด คราบเซลล์อุดตัน จากการสะสมของเซลล์, โปรตีน, DNA และเศษเซลล์ ที่รูของตัวกรอง อัตราการไหลต้องศึกษาให้เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายของเซลล์อันเกิดจากแรงเฉือนในขณะที่เกิดการกรองที่ผิวสัมผัส มีหลักการของระบบอยู่ 2 ระบบ ได้แก่ hollow fiber module และ plate-and-frame module



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย (A) Hollow fiber module และ (B) plate-and-frame module

Hollow fiber module

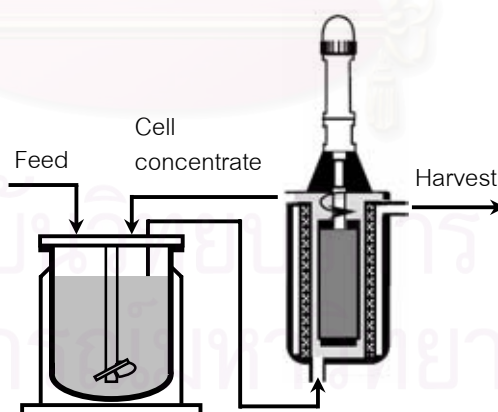
เครื่องมือแยกเซลล์ชนิดนี้ประกอบด้วย hollow fiber membrane อยู่ภายใน อาจรวมเข้าด้วยกันกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น hollow fiber module (Blasey และคณะ, 1991) หรือเป็นไฟเบอร์โพลีเมอรัลหวนๆภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Banik และคณะ, 1994) แต่ส่วนใหญ่จะใช้เป็นอุปกรณ์ภายนอก น้ำเลี้ยงเซลล์จะไหลผ่านไฟเบอร์เมมเบรน และส่วนใสจะไหลผ่านรูของเมมเบรน ในขณะที่เซลล์เข้มข้นจะหมุนเวียนกลับสู่ถัง สามารถเก็บเกี่ยวส่วนที่ซึมผ่านซึ่งประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ได้ ระบบนี้ไม่เหมาะกับการดำเนินการในขนาดสเกลใหญ่ด้วย perfusion rate สูงๆ และเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากขนาดรูพรุนที่มีขนาดเล็กและการอุดตันอย่างรวดเร็วของเมมเบรนเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงต้นของการเลี้ยง การเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นสูงให้ลักษณะที่ไม่เป็นเนื้อเดียว เซลล์ต้องสัมผัสกับแรงเฉือนจากการบีบด้วยอัตราสูง อันเป็นการสร้างความเสียหายแก่เซลล์

Plate and frame module

อุปกรณ์นี้พัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันเซลล์จากผลกระทบของแรงเฉือน ด้วยการเพิ่มความเร็วในเชิงเส้นต่ำที่ผิวหน้าเมมเบรน (de la Broise และคณะ, 1991; Velez และคณะ, 1989) ประกอบด้วย เมมเบรนสังเคราะห์ ประกบอยู่ระหว่าง channel plate และ filtrate plate (Kawahara และคณะ, 1994) น้ำเลี้ยงเซลล์จะถูกบีบผ่านทาง channel plate และอยู่บนผิวหน้าเมมเบรน เกิดแรงดันเพิ่มขึ้นพอที่จะดันน้ำเลี้ยงเซลล์ผ่านเมมเบรนไปได้ การไหลของของเหลวบนผิวหน้าช่วยให้เมมเบรนสะอาดขึ้น และหน่วงการเกิดการอุดตันที่รูของตัวกรอง ระบบนี้เชื่อมต่อกับ perfusion rate ต่ำๆ สำหรับการเลี้ยงในขนาดเล็ก เกิดภาวะการกรองแบบไม่เป็นเนื้อเดียวตลอดบนพื้นผิว ทำให้ระบบไม่เสถียร การบีบเซลล์ด้วยความเร็วสูง ทำให้เกิดแรงกดดันเชิงกลต่อเซลล์ เกิดคราบเซลล์อุดตันอย่างรวดเร็ว และระยะเวลาที่เซลล์ต้องอยู่ในอุปกรณ์ภายนอกนี้นานยิ่งกว่าระบบ hollow fiber อย่างมาก

3. Dynamic filtration

อุปกรณ์ vortex-flow filter เป็น อุปกรณ์ที่ติดตั้งภายนอก อาศัยแรงเฉือนสูงที่ผิวหน้าตัวกรอง ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่ของ rotor ที่อยู่ภายใน chamber โดยที่ rotor อาจมีรูปร่างลักษณะที่หลากหลาย ได้แก่ รูปทรงกระบอก (Kroner และคณะ, 1988), จานรูปกรวย (Vogel และคณะ, 2002) สามารถป้องกันคราบเซลล์อุดตันได้โดยการเคลื่อนที่ของ rotor ก่อให้เกิด Taylor-Couette flow ในช่องว่างภายในระหว่าง rotor กับผิวหน้าตัวกรอง ทำให้เกิดการหมุนวนซึ่งจะทำความสะอาดผิวหน้าตัวกรอง ดังนั้นจึงลดการเกิดคราบเซลล์อุดตันลงได้ แต่การขยายสเกลยังคงยุ่งยากอยู่



รูปที่ 2.5 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Vortex-flow filter

2.1.6.2 การแยกโดยอาศัยความหนาแน่น

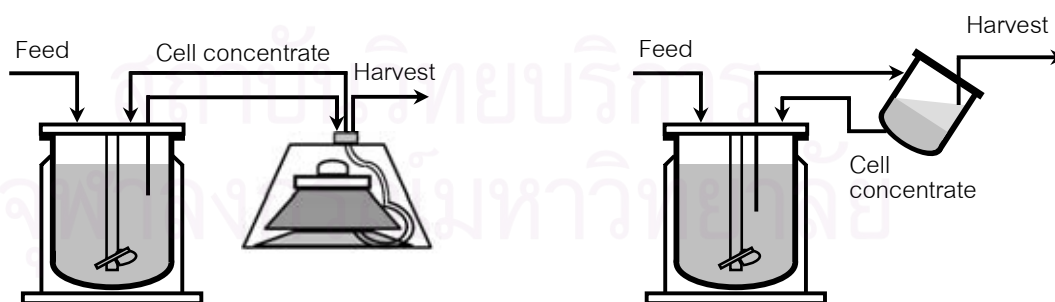
การพัฒนาเทคนิคการแยกเซลล์นั้น หลายวิธีอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ แรงที่กระทำต่อเซลล์จะแตกต่างกันไปในแต่ละเทคนิค อย่างไรก็ตามหลักการพื้นฐานของการแยกนั้นยังคงเหมือนกัน

1. Centrifugation

การแยกเซลล์วิธีนี้ อาศัย centrifugal force ในการปั่นเหวี่ยงอย่างต่อเนื่อง เพื่อจะตกตะกอนอนุภาคที่อยู่ในของเหลว เป็นระบบที่สามารถใช้ได้ในระดับสเกลใหญ่ แม้ว่าหลักการทำงานจะไม่ยุ่งยาก แต่ centrifuge ก็เป็นอุปกรณ์ชนิดหนึ่งที่ค่อนข้างซับซ้อน ต้องสามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงได้ โดยไม่มีความเสียหายของเซลล์ และต้องให้เซลล์กลับเข้าสู่ถึงเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะปลอดภัยได้โดยที่ไม่สูญเสียความสามารถในการเจริญ ซึ่งเป็นข้อจำกัดหลักของเทคนิคนี้ (Chatzisavido และคณะ, 1994; Tokashiki และคณะ, 1990)

2. Gravitational settler

ด้วยการใช้อุปกรณ์นี้ เซลล์จะแยกออกจากน้ำเลี้ยงในส่วน of settling zone โดยอาศัยแรงโน้มถ่วง ในขณะที่ส่วนใสรวมทั้งสององค์ประกอบบางอย่างที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเกิดจากเซลล์ตาย จะแยกออกมาผ่านส่วนบนของ settling zone แรงที่ผลักดันการตกลงมาโดยแรงโน้มถ่วงนี้ คือความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีค่าประมาณ 50 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร เซลล์สัตว์มีการตกลงมาด้วยอัตราที่ต่ำมากประมาณ 1-3 เซนติเมตรต่อชั่วโมงในสนามแรงโน้มถ่วง ส่งผลให้ประสิทธิภาพการแยกเซลล์ต่ำที่ perfusion rate สูงขึ้น (Tokashiki และคณะ, 1993)

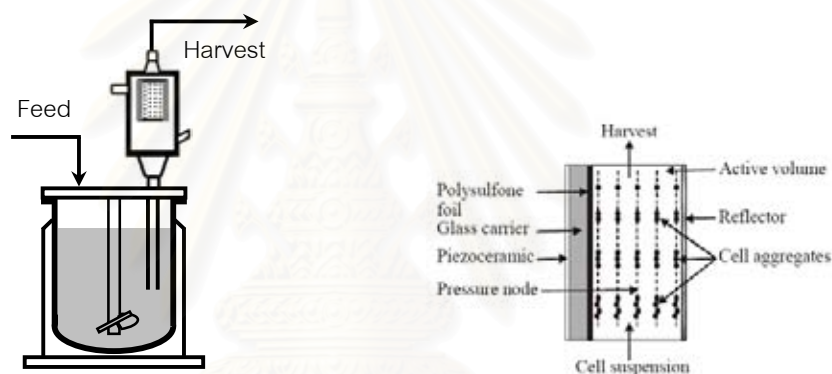


รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Centrifuge

รูปที่ 2.7 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Inclined settler

3. Acoustic aggregation sedimenter

อุปกรณ์นี้ อาศัยคุณสมบัติความเฉื่อยของเซลล์โดยใช้คลื่นเหนือเสียงความถี่สูงในการแยกแทนการใช้เครื่องกีดขวางทางกายภาพ ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ในสนามคลื่นเสียง และกระตุ้นให้กลุ่มเซลล์เกิดการตกตะกอน (Bierau และคณะ, 1998; Ryll และคณะ, 2000) จากนั้นกลุ่มเซลล์จะตกลงมาจากสนามคลื่นเสียง ในเวลาที่เครื่อง resonator หยุดทำงานชั่วคราว และเวียนกลับลงสู่ถังมาอยู่ในลักษณะแขวนลอยอีกครั้ง ส่วนอาหารที่เป็นส่วนใสนั้นออกจากระบบโดยผ่านปั๊มข้อเสียหลัก คือ เมื่อดำเนินงานเป็นระยะเวลาานาน อุณหภูมิภายใน resonator จะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจมีผลทำให้เซลล์หรือผลิตภัณฑ์เสียหาย และรบกวนต่อสนามคลื่นเสียง ทำให้ประสิทธิภาพลดลง (Dobhoff-Dier และคณะ, 1994) นอกจากนี้ ประสิทธิภาพของการแยกจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมี perfusion rate สูงขึ้น

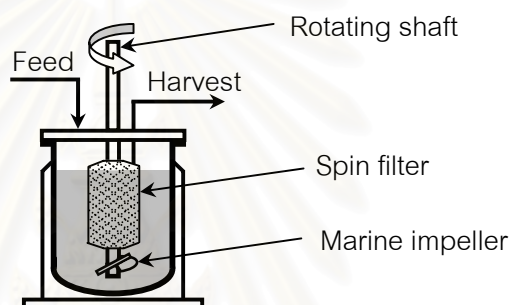


รูปที่ 2.8 แผนภาพแสดงระบบการแยกเซลล์ด้วย Acoustic aggregation sedimenter

โดยสรุปแล้ว อุปกรณ์แยกกันเซลล์ชนิดติดตั้งภายนอกหลายชนิดข้างต้นนั้น มักมีข้อเสียที่สำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับอุปกรณ์ที่ติดตั้งภายใน คือ เซลล์จะต้องออกมาอยู่ภายนอกถึงระยะเวลาหนึ่งภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสมแก่เซลล์ และการใช้ปั๊มดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ อาจจะทำความเสียหายแก่เซลล์ได้ ดังนั้น การใช้อุปกรณ์ที่ติดตั้งภายในจึงได้รับความสนใจมากกว่า โดยเฉพาะการใช้อุปกรณ์ spin filter ชนิดติดตั้งภายใน จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดวิธีหนึ่งสำหรับการเลี้ยงเซลล์สัตว์และการผลิตสารทางชีวภาพ ทั้งในเรื่องของ perfusion capacity ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ และการที่เซลล์ไม่ต้องออกไปอยู่ภายนอกถังอย่างอุปกรณ์ที่ติดตั้งภายนอก ด้วยเหตุนี้ การใช้อุปกรณ์ spin filter จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการเลี้ยงและแยกเซลล์อย่างต่อเนื่องในระดับสเกลใหญ่ (Emery และคณะ, 1995)

2.1.7 การใช้อุปกรณ์ spin filter สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบ perfusion

spin filter เป็น อุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นโครงของเส้นโลหะรูปทรงกระบอก มีพื้นผิวเป็นรูพรุนขนาดสม่ำเสมอ อาจติดตั้งอยู่บนด้ามกวนหรือหมุนอิสระโดยมอเตอร์อีกตัวหนึ่ง การเลี้ยงเซลล์เป็นแบบต่อเนื่อง มีการเติมอาหารใหม่ที่ด้านนอกของ spin filter และในขณะเดียวกันมีการนำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากภายใน spin filter ด้วยอัตราเดียวกัน ความหนาแน่นเซลล์สูงที่สุดที่ได้จากกระบวนการนี้ ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของ spin filter ที่จะทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์น้อยที่สุดที่ค่า perfusion rate ค่าหนึ่ง สามารถใช้งานในการแยกเซลล์ได้หลายรูปแบบ ได้แก่ เซลล์แขวนลอย, anchorage-dependent หรือ immobilized cells และ aggregate-forming cells



รูปที่ 2.9 ลักษณะการติดตั้งและการทำงานของ internal spin filter

การใช้ spin filter สำหรับเทคนิคการแยกเซลล์ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก ในการเลี้ยงเซลล์สัตว์แบบ perfusion โดย Himmelfarb และคณะ (1969) โดยใช้ตาข่ายสแตนเลส ปิดทับด้วยเมมเบรนโพลีเมอร์ขนาดรูพรุน 3 ไมครอน หมุนด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความหนาแน่นสูงถึง 6.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รายงานนี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอุปกรณ์ที่สามารถเลี้ยงให้เซลล์เจริญได้ความหนาแน่นสูง การศึกษาต่อมาเกี่ยวกับการใช้ spin filter ในระบบ perfusion เป็นการศึกษาเพื่อความเข้าใจถึงกลไกของการแยกเซลล์ การปรับปรุงลักษณะของ filter และสภาวะในการดำเนินงานให้ดีขึ้น ที่จะทำให้สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ที่ perfusion rate สูงๆได้ และลดการเกิดคราบเซลล์อุดตัน ส่งผลให้อายุการเลี้ยงนานขึ้น ความหนาแน่นเซลล์และ productivity สูงขึ้น

สิ่งที่สำคัญสำหรับการดำเนินงาน เป็นระยะเวลาของ spin filter คือ ประสิทธิภาพในการกักกันเซลล์ได้ดี แม้ที่ perfusion rate สูง และต้องลดการเกิดคราบเซลล์อุดตันลงด้วย ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกลไกเหล่านี้ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ คือ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะของ spin filter ได้แก่ วัสดุ, การออกแบบ, ผิวหน้าตัวกรอง และขนาดรูพรุน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรในการดำเนินงาน เช่น perfusion rate และ ความเร็วรอบของ spin filter และ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะของ culture ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลล์ภายในถัง

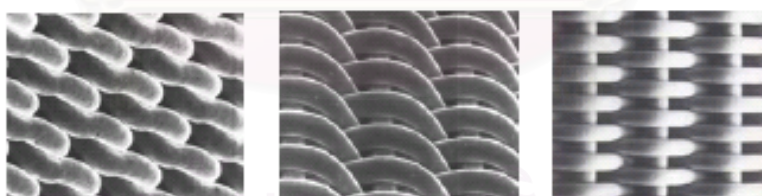
1. คุณลักษณะของ spin filter

วัสดุของ filter

วัสดุที่ใช้ในการสร้าง spin filter มี 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทโลหะทำจากสแตนเลสซึ่งมีประจุไฟฟ้าเป็นบวก และประเภทโพลีเมอร์สังเคราะห์ซึ่งมีความเป็นกลางมากกว่า การเกิดคราบเซลล์อุดตันระหว่างการเลี้ยงเซลล์ เกิดจากเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย เศษเซลล์ โปรตีน และ DNA ซึ่งมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ การใช้วัสดุสังเคราะห์ที่เป็นกลางทางไฟฟ้าแทนตัวกรองชนิดสแตนเลส สามารถลดการเกิดคราบเซลล์อุดตันได้ (Esclade และคณะ, 1991; Maiorella และคณะ, 1991; Mercille และคณะ, 1994) แต่กลับพบว่ารายงานส่วนใหญ่นิยมใช้แบบสแตนเลสมากกว่า เนื่องจากมีขนาดรูพรุนให้เลือกหลากหลาย อายุการใช้งานนานกว่า แข็งแรง ไม่เสียรูปง่าย ใช้งานง่าย ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้

การออกแบบ filter

รูปแบบการสานและทิศทางการสานที่ปรากฏแตกต่างกันของตัวกรอง อาจจะทำให้ขนาดรูพรุนที่ใกล้เคียงกัน มีประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ต่างกัน รายงานการใช้ spin filter รูปทรงระบอบก 2 ชั้น แต่ละอันมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 25 ไมครอน แต่มีทิศทางการสานที่แตกต่างกัน ที่ความเร็ว 0.21 เมตรต่อวินาที (Jan และคณะ, 1992) ชั้นหนึ่งให้การกักกันเซลล์สูงถึง 95 % สำหรับ perfusion flow ระหว่าง 1.6 and 4.8 cm/h ในขณะที่อีกอันหนึ่งกักกันได้เพียง 50 และ 80 % ที่ช่วง perfusion flow เดียวกัน นั้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของทิศทางการสานของตัวกรองต่อประสิทธิภาพการกักกันเซลล์



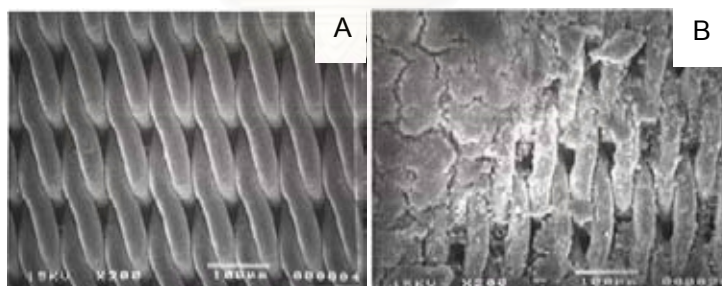
รูปที่ 2.10 ลักษณะและทิศทางการสานของ spin filter ชนิดสแตนเลส ซึ่งมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกัน

ขนาดรูพรุน

การใช้งาน spin filter ในระยะแรก จะใช้ขนาดเล็ก 1-10 ไมครอน เล็กกว่าขนาดของเซลล์สัตว์ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 12-20 ไมครอน เป็นผลทำให้ตัวกรอง สามารถกั้นเซลล์ไว้ได้อย่างสมบูรณ์ แต่รูพรุนที่มีขนาดเล็กมากอย่างนี้ มีแนวโน้มการเกิดการอุดตันด้วยเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย เศษเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอได้สูง มีรายงานการใช้ spin filter ขนาดรูพรุน 1, 3, 5 และ 10 ไมครอน พบว่ารูพรุนที่มีขนาดเล็กส่งผลให้การกักกันเซลล์เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ และให้ความ

เข้มข้นเซลล์สูงถึงระดับ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ตัวกรองก็เกิดคราบเซลล์อุดตันโดยสมบูรณ์ภายในระยะเวลาอันสั้น (Himmelfarb และคณะ, 1969; Tolbert และคณะ, 1981; Reuveny และคณะ, 1986; Velez และคณะ 1987)

ด้วยวิธีการเพิ่มความเร็วยรอบของ spin filter ทำให้สามารถใช้งาน filter ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้นได้ การกักกันเซลล์แม้จะไม่สูงเท่ารูพรุนเล็ก แต่ก็สูงเพียงพอที่จะกักเซลล์ส่วนใหญ่เอาไว้ภายในถังได้ ยังคงให้ความเข้มข้นเซลล์สูง ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์รวมถึง productivity ก็สูงเช่นกัน รายงานการใช้ spin filter ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 15-20 ไมครอน พบว่าสามารถเลี้ยงได้ความเข้มข้นเซลล์สูงประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยไม่เกิดคราบเซลล์อุดตัน หลังจากการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน (Deo และคณะ, 1996; Fenge และคณะ, 1993) การใช้ spin filter ขนาด 10 และ 20 ไมครอน ให้ความเข้มข้นสูงใกล้เคียงกัน แต่ spin filter ขนาด 40 ไมครอน ให้ความเข้มข้นเซลล์ลดลง ระยะเวลาการดำเนินงานจะลดลงเมื่อขนาดของรูพรุนสูงขึ้น (Siegel และคณะ, 1991) การใช้ spin filter ที่มีรูพรุนใหญ่กว่าขนาดของเซลล์โดยเฉลี่ย ยังคงรักษาสภาพการกักเซลล์ที่ดีอยู่และยังหลีกเลี่ยงการเกิดคราบเซลล์อุดตันได้อีกด้วย (Iding และคณะ, 2000; Jan และคณะ, 1992; Siegel และคณะ, 1991) จึงเป็นข้อแนะนำโดยทั่วไปว่าขนาดของ pore size ที่เท่ากับ 1.5 เท่า ของขนาดเซลล์เป็นขนาดที่เหมาะสมในการใช้งาน ลักษณะการเกิดคราบเซลล์อุดตันบน spin filter เป็นดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ภาพถ่าย SEM แสดงการเกิดคราบเซลล์อุดตันบน spin filter (A) ถ่ายทันทีหลังจากการถ่ายเซลล์ (B) ถ่ายหลังจาก 49 วัน (Deo และคณะ, 1996)

พื้นที่ผิว filter

พื้นที่ผิวของ spin filter เป็น ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อ perfusion flow rate แต่เพราะว่าพื้นที่ผิวสัมพันธ์กับปริมาตรของน้ำเลี้ยงเซลล์ในส่วนที่ไม่มีเซลล์อยู่ ดังนั้นการเพิ่มขนาดต่อปริมาตรของ spin filter มีผลลดปริมาตรของ working volume ลง จึงจำเป็นต้องหาจุดที่เหมาะสม ประสิทธิภาพการ perfusion เพิ่มขึ้นได้ด้วยการเพิ่มสัดส่วนระหว่างพื้นที่ผิว spin filter ต่อ ปริมาตรของ culture (Deo และคณะ, 1996)

2. Operational culture characteristic

ค่าตัวแปรในการดำเนินงาน เช่น perfusion rate และการหมุนของ spin filter มีอิทธิพลต่อการกักกันเซลล์ และการเกิดคราบเซลล์อุดตัน ความเร็วรอบการหมุนของ spin filter สามารถแปรค่าได้ง่าย แต่ประสิทธิภาพของ spin filter ต่อการ perfusion ควรจะสูงมากเท่าที่จะเป็นไปได้ เพื่อที่จะให้ culture มีความเข้มข้นเซลล์สูง

Filter rotational speed

การเพิ่มความเร็วยรอบของ spin filter จะช่วยทำให้เซลล์ถูกกวาดออกจากผิวหน้าด้วยความเร็วที่ผิวสัมผัส (tangential velocity) ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการ perfusion ของระบบได้ (Yabannavar และคณะ, 1994) และทำให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ก็เป็น การเพิ่มปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคและพื้นผิวขึ้นด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดการเกาะของคราบเซลล์ที่ผิวหน้า filter ตามมา (Deo และคณะ, 1996; Yabannavar และคณะ, 1992) จะเห็นได้ว่าการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม มีความจำเป็นสำหรับการดำเนินการเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่นสูงๆ และใช้เวลาในการเลี้ยงยาวนาน การแปรค่าความเร็วรอบของ filter มีผลกระทบโดยตรงต่อการเกิดคราบเซลล์อุดตัน และมีอิทธิพลต่อการกักกันเซลล์ จากการศึกษาการใช้ spin filter ขนาด 10, 20 และ 40 ไมครอน ใช้ latex beads (11.9 ± 1.9 ไมครอน) แทนเซลล์ พบว่าการกักกันเซลล์ของ filter ทั้ง 3 ขนาดขึ้นกับความเร็ว และให้การกักกันสูงสุดที่ค่าอัตราการกวนเดียวกัน ประมาณ 0.61 เมตรต่อวินาที (Siegel และคณะ, 1991) การศึกษาโดยใช้ spin filter ขนาดรูพรุน 20 ไมครอน ใช้ agarose beads (13 ± 2 ไมครอน) แทนเซลล์ พบว่าการกักกันเพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเร็วอยู่ในช่วง 0.15 ถึง 0.43 เมตรต่อวินาที และลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเร็วสูงกว่า 0.43 เมตรต่อวินาที แต่เมื่อขยายขนาดขึ้น และมี perfusion flow สูงขึ้น ให้ผลการกักกันที่แตกต่างไป การกักกันเซลล์ลดลงตั้งแต่ความเร็ว 0.37 ถึง 0.73 เมตรต่อวินาที (Iding และคณะ, 2000) การใช้ spin filter ขนาด 25 และ 40 ไมครอน และ perfusion flow ตั้งแต่ 1.6 ถึง 6.3 cm/h พบว่า filter ทั้ง 2 ขนาด ให้การกักกันดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วยรอบสูงขึ้น (Jan และคณะ, 1992)

จากรายงานหลายฉบับ เกี่ยวกับการใช้ filter ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ โดยเฉลี่ย ทั้งในการเลี้ยงเซลล์หรือจำลองโดยใช้ bead แทนเซลล์ พบว่าได้ผลการ ศึกษาหลากหลายเปรียบเทียบกันได้ยาก เนื่องจากมีตัวแปรที่เข้าแตกต่างกัน เช่น perfusion rate, cell/particle concentration สำหรับ filter ที่มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่กว่าเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์เล็กน้อย (15–20 ไมครอน) มีรายงานว่า การกักกันเพิ่มขึ้นถึงระดับคงที่เมื่อเพิ่มความเร็วยรอบของ filter ถึงค่าหนึ่ง

ในขณะที่รายงานอื่น จะได้ค่าที่เหมาะสมเพียงค่าเดียว ส่วน filter ที่มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์มาก (25 ไมครอน) การกักกันจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเร็วของ filter ในขณะที่อีก รายงานพบว่า การหมุนไม่ได้มีผลต่อการกักกันแต่อย่างใด มักไม่พบรายงานที่สอดคล้องตรงกัน ดังนั้น จึงยังไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกักกันกับอัตราการหมุนของ filter ที่ชัดเจนนัก ทั้งนี้ อาจจะขึ้นกับตัว อุปกรณ์และลักษณะการดำเนินงานของแต่ละห้องปฏิบัติการ

Perfusion rate

จากการศึกษาการกักกันเซลล์ของ spin filter พบว่าการแปรค่าของ perfusion rate ควบคู่กับ filter rotation ให้ลักษณะการกักกันที่ต่างกัน การกักกันของ spin filter ที่มีขนาดรูพรุน 25 ถึง 40 ไมครอน ไม่ขึ้นกับ perfusion rate ตั้งแต่ 1.6 ถึง 6.4 cm/h พบว่า ที่ความเร็วรอบของ filter สูงกว่า 0.63 m/s แต่จะมีค่าลดลงเมื่อ perfusion rate สูงขึ้นที่ความเร็วต่ำกว่า 0.63 m/s (Jan และคณะ, 1992) รายงานต่อมา พบว่า perfusion rate ไม่ได้เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ที่อยู่ภายใน spin filter ขนาด 25 ไมครอน ที่ความเร็ว 0.4 m/s อย่างมีนัยสำคัญ จนกระทั่ง perfusion rate สูงถึงระดับ 4.3 cm/h ที่จะพบว่า การกักกันเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Yabannavar และคณะ, 1992) การกักกันของ spin filter ที่มีขนาดรูพรุนเล็ก ไม่ได้รับอิทธิพลจาก perfusion rate แต่จะแตกต่างกันสำหรับรูพรุนที่ ขนาดใหญ่กว่าเซลล์ และจะขึ้นกับปัจจัยเรื่อง rotational speed ควบคู่กับ perfusion flow rate

3. Culture characteristic – cell concentration

ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเซลล์ในช่วง $2.00-4.5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Yabannavar และคณะ, 1992) แต่ความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้น มีผลทำให้เกิดคราบ เซลล์อุดตันได้สูงขึ้น โดยเฉพาะที่ perfusion flow rate สูง (Favre, 1993) ความเข้มข้นของเซลล์มี ผลกระทบเล็กน้อยต่อการกักกันเซลล์ ในขณะที่การเกิดคราบเซลล์อุดตัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นพร้อมกับ ความเข้มข้นของเซลล์ นอกจากนี้ เศษเซลล์และดีเอ็นเอ ที่ปลดปล่อยออกมาระหว่างการเลี้ยงที่มี เปอร์เซ็นต์ความรอดต่ำ มีแนวโน้มเพิ่มการเกาะติดของเซลล์บนผิวหน้า filter ด้วย (Esclade และคณะ 1991)

2.1.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง มีผลกระทบอย่างมากต่อความมีชีวิต และการผลิตของ เซลล์ ปัจจัยต่างๆ ที่ได้มีการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง ระดับของออกซิเจนที่ละลาย (DO) การลดลงของสารอาหาร และการสะสมของของเสีย

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเซลล์สัตว์ ขึ้นกับว่า เซลล์นั้นๆ ได้มาจากต้นกำเนิดใด และมาจากตำแหน่งทางกายวิภาคส่วนใด อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ไลน์ที่ได้จากมนุษย์ และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกาย (Freshney, 2005)

2. ความเป็นกรด-เบส

เซลล์ไลน์ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่ pH ใกล้เคียงความเป็นกลางที่ 7.2-7.4 เซลล์สัตว์จะ ทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่อยู่ในช่วงระหว่าง pH 6.6-7.8 แต่ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม ต่อการเจริญของเซลล์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันเล็กน้อย (Freshney, 2005)

3. ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen)

ออกซิเจน เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในการเลี้ยงเซลล์ ต้องมีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอต่อความต้องการ และควบคุมความเข้มข้นให้สม่ำเสมอเหนือค่าวิกฤต เซลล์ไลน์แต่ละชนิดมีความต้องการออกซิเจนที่เหมาะสมต่างกัน เซลล์ส่วนใหญ่สามารถเจริญ ได้ค่อนข้างดีที่ระดับออกซิเจนในอาหารตั้งแต่ 5-100 เปอร์เซ็นต์ อากาศอิ่มตัว และจะถูกยับยั้งการ เจริญอย่างรุนแรงเมื่อเจริญอยู่ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำมาก

จากการศึกษาผลของค่า dissolved oxygen ต่อการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต การผลิตแอนติบอดี และเมแทบอลิซึมของกลูโคสและกลูตามีน พบว่าจากการ แปรค่าความเข้มข้นของ dissolved oxygen ในช่วง 8-100 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด และเมแทบอลิซึมของกลูโคสเพียงเล็กน้อย (Boraston และคณะ, 1984) และ รายงานการศึกษาความเข้มข้นของออกซิเจนที่เหมาะสม ต่อการเจริญ พบว่าเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Miller และคณะ, 1987) และ 50-60 เปอร์เซ็นต์ (Reuveny และคณะ, 1986; Phillips และคณะ, 1987) ซึ่งต่างไปจากค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนติบอดี ซึ่งเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (Miller และคณะ, 1987) 25 เปอร์เซ็นต์ (Reuveny และคณะ, 1986) และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (Phillips และคณะ, 1987) นอกจากนี้ ค่า dissolved oxygen สูงเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ลดอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ลง แต่ ไม่ได้มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และที่ระดับออกซิเจนต่ำ อัตราการเจริญจำเพาะไม่ได้ขึ้นกับค่า dissolved oxygen (Meilhoc และคณะ, 1990)

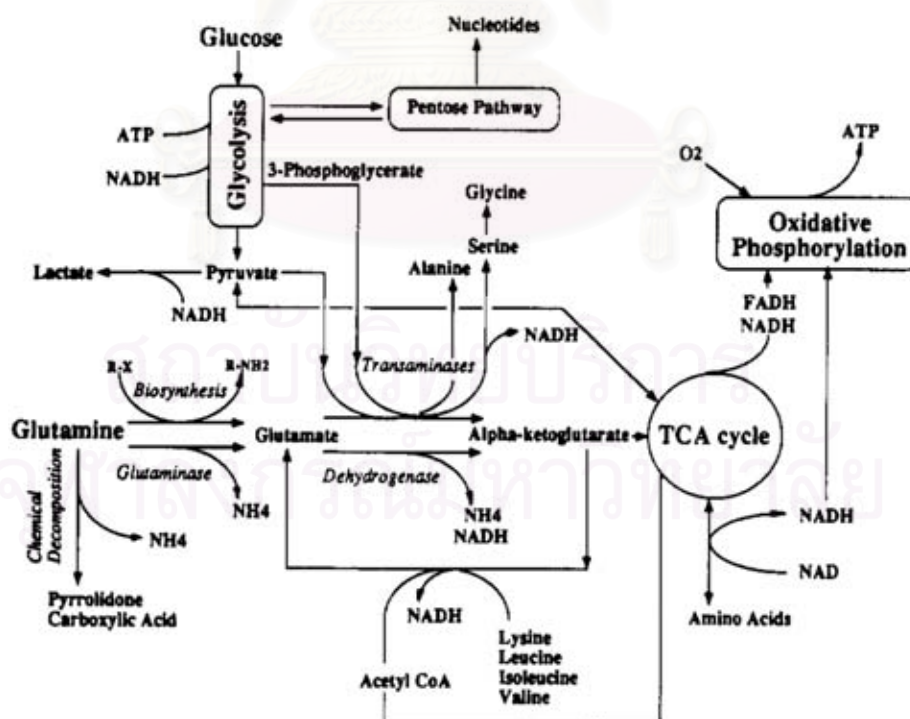
4. การลดลงของสารอาหาร

โดยทั่วไปแล้ว เซลล์จะเริ่มตายหลังจาก 3-5 วัน ในการเลี้ยงระบบ batch อันเนื่องจากการลดลงของสารอาหาร การสะสมของของเสีย หรือจากทั้ง 2 ปัจจัย กลูโคสและกลูตามีน จัดเป็นสารอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์ พบว่าเมื่อมีการเติมกลูโคสและกลูตามีน เพิ่มในระหว่างการเลี้ยง จะสามารถยืดอายุของเซลล์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตให้ยาวนานขึ้น และยังเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดีให้สูงขึ้นด้วย ดังนั้น หลังจากการเจริญ 2-3 วัน กลูโคสและกลูตามีน จะกลายมาเป็นปัจจัยที่จำกัดการเจริญและการผลิตแอนติบอดี (Reuveny และคณะ, 1986)

5. การสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์

แอมโมเนียและแลคเตต เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของกลูตามีน และกลูโคส มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หลายชนิด เมื่อสะสมจนถึงความเข้มข้นระดับหนึ่ง โดยส่งผลยับยั้งการเจริญ ลดอัตราการเจริญจำเพาะ มีผลต่อเมตาบอลิซึม และการผลิตแอนติบอดีในเซลล์ไฮบริโดมา โดยที่เซลล์แต่ละชนิด จะตอบสนองต่อความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเตตได้ต่างกัน (Ozturk และคณะ, 1992; Chen และคณะ, 1992)

2.1.9 กลไกการสลายและการสังเคราะห์อาหาร



รูปที่ 2.12 แผนภาพแสดงเมแทบอลิซึมของเซลล์ไฮบริโดมา (Ozturk และคณะ, 1991)

กลูโคสและกลูตามีน จัดเป็นสารอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์ เซลล์จะใช้สารอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ เพื่อการสร้างพลังงานในกระบวนการของเซลล์ เซลล์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานแรกผ่านทางวิถีไกลโคไลซิสเกิดเป็นไพรูเวท และผ่านทางวิถีเพนโตสจะให้ pentose building block สำหรับการสร้างกรดนิวคลีอิก ไพรูเวทที่ได้จากวิถีไกลโคไลซิส จะเข้าสู่ TCA cycle แต่พบว่าไพรูเวทส่วนใหญ่มักจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตต สาเหตุของการเกิดแลคเตตปริมาณมากจากกลูโคสภายใต้ภาวะ aerobic นี้ยังคงไม่ชัดเจน ส่วนกลูตามีนก็ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับการเจริญของเซลล์เช่นกัน (Reitzer และคณะ, 1979; Zielke และคณะ, 1984; McKeehan, 1986) เริ่มต้นจากการดึงหมู่อะมิโนด้วยเอนไซม์กลูตามีนเนส จะได้แอมโมเนียออกมาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ หรือนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ซึ่งหมู่แอมโมเนียจะถูกใช้ไปในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสร้างไพริมิดีนและพิวรีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ จากทั้ง 2 ทาง เป็นกลูตามัต ขั้นตอนที่สองของวิถีกลูตามีนโนลิซิส คือ การเปลี่ยนกลูตามัต ไปเป็น α -ketoglutarate ซึ่งในกระบวนการประกอบด้วยเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิด เอนไซม์ทรานส์อะมิเนสจะทำหน้าที่ดึงหมู่แอมโมเนียออกจากกลูตามัต และเอนไซม์อีกส่วนหนึ่งทำหน้าที่ส่งหมู่แอมโมเนียเข้ารวมกับ glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate เกิดเป็นซีรีน และจะเปลี่ยนรูปเป็น ไกลซีน ในเวลาต่อมา กลูตามัตยังสามารถเปลี่ยนรูปโดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase เกิดเป็น α -ketoglutarate ซึ่งจะปลดปล่อยหมู่แอมโมเนียตัวที่สองออกมา จากนั้น α -ketoglutarate จะถูกเมแทบอลไลต์ผ่านทาง TCA cycle ต่อไป (Ozturk และคณะ, 1991)

2.1.10 ค่าทางจลนศาสตร์ (kinetic parameters)

ค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์มีความสำคัญต่อการพัฒนาการเลี้ยงเซลล์ไฮบริดมา เพื่อทำให้มีความเข้าใจลักษณะทางสรีรวิทยาของเซลล์ได้อย่างลึกซึ้ง ได้แก่ ลักษณะการเจริญ เมแทบอลิซึม และการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ภายใต้ภาวะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์เหล่านี้ จะได้รับผลกระทบจากการตอบสนองที่ซับซ้อนของเซลล์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ การศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมและค่าตัวแปรในการควบคุมระบบ มีความจำเป็นต่อการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและการควบคุมกระบวนการเลี้ยงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพ ข้อมูลและการแปรผลของค่าตัวแปรทางจลนศาสตร์นี้ จะใช้ในการพัฒนาเป็นสมการที่เป็น model ที่จะสามารถคำนวณเป็นค่าตัวเลขที่สะท้อนถึงประสิทธิภาพของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ค่าเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยหลากหลายประการ ได้แก่ อายุของเซลล์ อาหาร แหล่งของซีรัม แหล่งพลังงาน ความจำกัดของออกซิเจน pH อุณหภูมิ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเสีย ระดับของสารอาหาร และอัตราการเจือจาง เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงของค่า

จลนศาสตร์จะศึกษาในลักษณะที่เป็นค่าที่ขึ้นกับเวลา อย่างไรก็ตาม จลนศาสตร์ของเซลล์เป็นเรื่องที่ค่อนข้างซับซ้อน การศึกษาผลกระทบของปัจจัยหนึ่งๆ จำเป็นต้องควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้คงที่ (Ozturk และคณะ, 1990, 1991)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและเทคนิคที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน stirred-tank reactor

Reuveny และคณะ (1986) ได้ศึกษาถึงปัจจัยของสภาวะแวดล้อมและปัจจัยในการเลี้ยงเซลล์ที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ไฮบริโดมา ได้แก่ อุณหภูมิ, ระดับของออกซิเจน การลดลงของอาหาร และการสะสมของเสีย พบว่า อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส 3-9 องศาสามารถเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์แต่ลดการผลิตแอนติบอดี ระดับออกซิเจนที่ 25 เปอร์เซ็นต์ สามารถยืดระยะเวลาความมีชีวิตของเซลล์และสามารถเพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับที่ระดับออกซิเจน 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการเจริญ การเติมอาหารในแต่ละวันเพื่อรักษาระดับกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและกลูตามีน 150 ไมโครกรัมต่อเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อวันสามารถรักษาระดับเซลล์มีชีวิตไว้ที่ 1.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้นาน 9 วัน และผลิตแอนติบอดีได้ 290 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเติมกลูโคส หรือกลูตามีนอย่างใดอย่างหนึ่ง แอมโมเนียมไอออนที่เติมลงไปในระดับที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ ส่งผลยับยั้งการเจริญและลดการผลิตแอนติบอดี ส่วนกรดแลคติกที่ความเข้มข้นที่พบระหว่างการเลี้ยงไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ จากผลที่ได้แสดงว่าสามารถเพิ่มการผลิตแอนติบอดีได้ด้วยการรักษาระดับความมีชีวิตของเซลล์ให้ได้ระยะเวลานาน

Reuveny และคณะ (1987) ได้ศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ murine cell line พบว่าจะมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากระยะเอ็กซ์โพเนนเชียล ในการเลี้ยงเซลล์แบบ batch ได้ผลผลิตเท่ากับ 100-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 290 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมกลูโคสและกลูตามีน กรดแลคติกที่เกิดขึ้นที่เกิดขึ้นจากกระบวนการของเซลล์ ไม่ได้ส่งผลเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่อาจมีการสะสมแอมโมเนียในระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ในระยะท้ายของการเจริญ จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในระบบต่างๆ ได้แก่ fed-batch, semi-continuous, ระบบ 2 ชั้นตอน และ perfusion เปรียบเทียบกับระบบ batch พบว่า การเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch สามารถเพิ่มการผลิตได้จาก 15 เป็น 27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน แบบ semi-continuous ได้ 34 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน และเพิ่มเป็น 62 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อเลี้ยงต่อด้วยแบบ batch หลังจาก semi-continuous สำหรับระบบ perfusion เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการผลิต สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความเข้มข้น 2.2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลิตแอนติบอดีเข้มข้น 390

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 660 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน การลดความเข้มข้นของซีรัมลงมาเท่ากับ 0.125 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ได้ specific activity ของแอนติบอดีเท่ากับ 0.4 ต่อ มิลลิกรัมโปรตีน

Omasa และคณะ (1992) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของกรดอะมิโนบางชนิด (Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Val, Phe และ Gln ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ใช้มากในระหว่างการเลี้ยงเซลล์) และกลูโคสต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอนติบอดี ในจานเลี้ยงเซลล์ พบว่า เฉพาะการเติมกลูตามีนเท่านั้นที่ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตจำเพาะ ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นๆข้างต้นไม่ได้มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะ และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูตามีนสูงกว่า 20 มิลลิโมลาร์ ส่วนอัตราการผลิตจำเพาะจะมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูตามีนเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์

Fenge และคณะ (1993) ได้ศึกษาองค์ประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเซลล์สัตว์ ในด้านการกวน การให้อากาศและการเลี้ยงแบบ perfusion ที่ใช้ระยะเวลาสั้น พบว่า ใบกวนชนิด 3-blade segment สามารถกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันได้โดยที่ shear rate ต่ำ เหมาะสมกับการใช้งานกับเซลล์สัตว์ที่มีความไวต่อแรงเฉือน การให้อากาศแบบ bubble-free ผ่าน microporous membrane สามารถให้อากาศได้อย่างเพียงพอกับเซลล์และเหมาะกับการเลี้ยงในสเกลเล็ก จากการศึกษาการเลี้ยงเซลล์แบบ perfusion พบว่า spin filter ที่มีขนาด pore size 10-20 ไมครอน เป็นอุปกรณ์ที่เหมาะสมสำหรับระบบการเลี้ยงเซลล์ชนิด suspension culture สามารถเลี้ยงได้นาน 6-12 สัปดาห์

Yang และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของการควบคุมกระบวนการโดยวิธี controlled-fed perfusion ที่มีต่ออัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ พบว่า volumetric antibody productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน) เพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าเทียบกับระบบ perfusion และสูงกว่าระบบ batch และ fed-batch ประมาณ 10 เท่า โดยการที่ productivity สูงขึ้น เนื่องจากการที่สามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความหนาแน่นสูงขึ้นและลดการเจือจางของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เป็นเพราะการควบคุมการเติมสารอาหารในจุดที่ลดการเกิดเมแทโบไลต์

Feng และคณะ (2006) ได้พัฒนาวิธีการควบคุมกระบวนการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแบบ Controlled-fed perfusion mode โดยร่วมกับวิธี oxygen uptake rate-amino acids (OUR-AA) ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมการเติมกรดอะมิโนบางชนิด โดยพิจารณาผ่านการเปลี่ยนแปลงของค่า OUR ในระหว่างการเลี้ยงแบบ perfusion พบว่า เมื่อควบคุมกระบวนการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีนี้ สามารถเลี้ยงให้เซลล์มีชีวิต มีความหนาแน่นได้สูงถึง 1.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมี antibody productivity เท่ากับ

325 mg/l/d เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับระบบ perfusion และ fed-batch โดยที่แอนติบอดีที่ได้มีคุณสมบัติทาง immunoreactivity และความบริสุทธิ์ เหมือนเดิม

Kurokawa และคณะ (1994) ได้ศึกษาควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสและกลูตามีนที่ค่าต่างๆ ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา พบว่าเมื่อควบคุมปริมาณกลูโคสที่ระดับต่ำ คือ 0.2 กรัมต่อลิตร ลดแอกทิวิตีของ lactate dehydrogenase ลงครึ่งหนึ่งและลดความเข้มข้นของแลคเตทลง 3 เท่า เทียบกับเมื่อควบคุมที่ 1 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าการผลิตแอมโมเนียกลับเพิ่มขึ้น เพื่อลดการผลิตเมแทบอลิটที่เป็นพิษลง และเพิ่มอัตราการผลิตแอนติบอดี จึงได้ควบคุมกลูโคสและกลูตามีนที่ 0.2 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถเพิ่มความเข้มข้นเซลล์และแอนติบอดีได้เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสสูงๆ

จากงานวิจัยที่ผ่านมา เกี่ยวกับการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน แสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ เช่น ปัจจัยเรื่องการควบคุมอาหารโดยใช้ปรับระบบการเลี้ยงเซลล์ให้เหมาะสม การควบคุมระดับของเสีย หรือแม้แต่ภาวะที่เหมาะสมในการใช้งานอุปกรณ์ก็กักกันเซลล์ โดยเป้าหมายหลักคือการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต และสามารถรักษาสภาพของเซลล์มีชีวิตให้อยู่รอดได้นานที่สุด อันจะส่งผลต่อความเข้มข้นของแอนติบอดีและการเก็บเกี่ยวได้เป็นระยะเวลานาน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ไลน์ (cell line)

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัย เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน โคลนหมายเลข 44 (ENRO 44) ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ได้จากการหลอมรวมเซลล์ไมอีโลมา เข้ากับเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหนูสายพันธุ์ BALB/c ที่ฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยสารเอนโรฟลอกซาซิน ซึ่งเชื่อมกับ Keyhole limpet hemocyanin (KLH) โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นอิมมิวโนโกลบูลินชนิด IgG1 (มนัสพงศ์ ชูศรี, 2005)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น TMS บริษัท Nikon Corporation, Japan
2. ขวดแก้ว บริษัท Boro, Germany
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Hot plate magnetic stirrer) รุ่น PC-101 บริษัท ทริกุล กู๊ป จำกัด, Thailand และรุ่น HS-115 บริษัท Corning, USA
4. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น Delta D 200 บริษัท D.S.C. group Co.,Ltd, Taiwan
5. เครื่องชั่ง (Electronic balance) รุ่น PG 4002-S และ รุ่น AG204 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ระบบควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ (stirred-tank bioreactor) รุ่น Biostat B plus ประกอบด้วยถังเลี้ยงเซลล์ชนิด double-jacket ขนาด 2 ลิตร, ส่วนควบคุมระบบ และอุปกรณ์ประกอบ บริษัท Sartorius, Germany, O₂ sensor รุ่น InPro 6820, pH sensor ชนิด combination รุ่น 405-DPAS-SC-K8S/200 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland, เครื่องทำความเย็นควบคุมอุณหภูมิ รุ่น CBDI-1HP บริษัท Scientific

- promotion, Thailand, Spin filter รุ่น MDC 20 μm บริษัท B. Braun Biotech International, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge) รุ่น MSE minor 35 บริษัท M.S.E. LTD, England
 8. เครื่องปั๊มดูดจ่ายของเหลว (Peristaltic pump) รุ่น 323s และ รุ่น 101U/R บริษัท Watson-Marlow Limited, England
 9. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genies, รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc., USA
 10. เครื่องมีอนับเซลล์ (Hemocytometer) ชนิด Blight line บริษัท Boeco, Germany
 11. เครื่องแยกโปรตีน (Automated liquid chromatography system) รุ่น ÄKTAprime บริษัท Amersham Bioscience Limited, Sweden
 12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Multi-detection microplate reader) รุ่น synergy™ HT บริษัท BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
 13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
 14. เครื่องวัดปฏิกิริยาอิมมูน (Microtiterplate reader) รุ่น Titertex Multiskan MCC340 บริษัท Corning, USA
 15. งานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม บริษัท Nunc, Denmark
 16. งานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม บริษัท Nunc, Denmark
 17. ชุดเครื่องมือโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ประกอบด้วย system controller รุ่น SCL-8A, preparative liquid chromatography รุ่น LC-8A, column oven รุ่น CTO-6A, refractive index detector รุ่น RID-6A, chromatopac รุ่น C-R4A บริษัท Shimadzu, Japan และ Microsyringes รุ่น Microliter™ Syringes ขนาด 50 ไมโครลิตร บริษัท Hamilton, Switzerland, คอลัมน์ (HPLC organic acid analysis column) รุ่น Aminex® HPX-87H ชนิด ion exclusion and reverse phase ขนาด 7.8x300 มิลลิเมตร บริษัท BIO-RAD, USA
 18. ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน (Spinner culture vessel and biological stirrer) ขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Techne , UK

19. ตัวกรองอาหารปลอดเชื้อ (Filter capsule) รุ่น Sartobran 150 บริษัท Sartorius, Germany
20. ตัวกรอง (Filter) รุ่น Midisart® 2000 ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ชนิด PTFE บริษัท Sartorius, Germany
21. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ระบบควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) รุ่น Revco ultima บริษัท Revco scientific Inc., รุ่น IT62 บริษัท Yamato Scientific Co.,Ltd., Japan
22. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ISSCO รุ่น HS-124 บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
23. ตู้อบความร้อนแบบแห้ง (Hot air oven) รุ่น Corntherm series five บริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
24. ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert, Germany
25. บีบอากาศ (Air compressor) บริษัท Iwaki, Japan และ รุ่น Swan DR-115 บริษัท Tong Cheng Iron Works, Taiwan
26. บีเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท HBG, Germany
27. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 10, 50 และ 250 มิลลิลิตร บริษัท Nunc, Denmark
28. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
29. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น Udono-RII บริษัท Udono limited, รุ่น Hiclave HV-50, บริษัท Harayama manufacturing corporation และรุ่น KT 30 SD, บริษัท A.L.P., Japan
30. หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microfuge tube) บริษัท Axygen, USA
31. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Nunc, Denmark
32. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB7 บริษัท Memmert, Germany

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Ammonium chloride (NH₄Cl) บริษัท Fluka, Switzerland
2. BCA™ protein assay reagent บริษัท PIERCE, USA
3. Bovine serum albumin (BSA) บริษัท Sigma-Aldrich, Germany

4. Calcium-L-lactate pentahydrate ($\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Fluka, Netherlands
5. Carbondioxide high purity บริษัท ฉัตรกร แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด, Thailand
6. Citric acid monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
7. α -D(+)-glucose บริษัท Sigma-Aldrich, USA
8. Dimethylformamide ($\text{CHON}(\text{CH}_3)_2$) บริษัท Fisher scientific, USA
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท Fluka, Swithzerland
10. Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
11. Disodium hydrogenphosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Carlo erba, USA
12. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide บริษัท Sigma-Aldrich, Germany
13. Enrofloxacin ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$) บริษัท Fluka, Swithzerland
14. Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 95 เปอร์เซ็นต์ กรมสรรพสามิต, Thailand
15. Fetal bovine serum บริษัท Invitromex, Germany
16. Hydrogen peroxide (H_2O_2) บริษัท Fluka, Swithzerland
17. L-glutamine, non-animal source ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$) บริษัท Sigma-Aldrich, Germany
18. N-hydroxysuccimide ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$) บริษัท Fluka, China
19. Nitrogen high purity บริษัท ไทยอินดัสเตรียล แก๊ส จำกัด (มหาชน), Thailand
20. Non-fat dry milk บริษัท Mission, Thailand
21. O-phenylenediamine ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$) บริษัท Abkem Iberia S.L., Spain
22. Oxygen (medical grade) บริษัท ฉัตรกร แล็บ เซ็นเตอร์ จำกัด, Thailand
23. Penicillin G Sodium บริษัท M&H manufacturing, Thailand
24. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific) บริษัท Zymed, USA
25. Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) บริษัท Merck, Germany
26. RPMI 1640 medium บริษัท Invitromex, Germany
27. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) บริษัท Sigma-Aldrich, Germany
28. Sodium cabonate (NaCO_3) บริษัท Merck, Germany
29. Sodium chloride (NaCl) บริษัท Merck, Germany
30. Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท Carlo erba, USA

31. Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท Carlo erba, USA
32. Sodium hypochlorite, Clorox[®] บริษัท The Clorox, USA
33. Sodium nitroprusside dihydrate ($C_5FeN_6Na_2O \cdot 2H_2O$) บริษัท Fluka, Switzerland
34. Sodium pyruvate ($C_3H_3NaO_3$) บริษัท Sigma-Aldrich, Germany
35. Sulfuric acid (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
36. Streptomycin sulfate บริษัท M&H manufacturing, Thailand
37. Tris (hydroxymethyl)-aminomethane ($C_9H_9HgO_2SNa$) บริษัท Sigma Chemical, USA
38. Trypan blue for vital staining บริษัท B.D.H. Laboratory, England

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี fetal calf serum (FCS) 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการถ่ายเซลล์ทุกๆ 2-3 วันเมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด

3.4.1.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาอย่างถาวร

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการเจริญอยู่ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ขณะเย็น ลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร ให้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส DMSO ที่เติมอยู่ในน้ำยาแช่แข็งเซลล์ จะช่วยทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกอันจะส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายระหว่างการแช่แข็งเซลล์

3.4.1.3 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในขั้นต้น โดยการนำเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงย้ายเซลล์ลงสู่ spinner flask ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสำหรับเลี้ยงใน stirred-tank bioreactor มากเพียงพอและความมีชีวิตของเซลล์สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ผลการทดลองที่ 4.2) แล้วจึงเก็บ เซลล์จาก spinner flask บั่นแยกเซลล์ออกแล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ โดยอุ้มน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนการถ่ายเซลล์ จากนั้นจึงถ่ายเซลล์ลงสู่ stirred-tank bioreactor ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การศึกษาการเตรียมเซลล์ตั้งต้นใน spinner flask

ศึกษาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นใน spinner flask และระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากเพียงพอ สำหรับศึกษาการเลี้ยงเซลล์ใน stirred-tank bioreactor และยังคงมีความมีชีวิตสูง มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นการเตรียมเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 10 มิลลิลิตร เลี้ยง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น ถ่ายเซลล์ลงสู่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน ซึ่ง ขั้นตอนดังกล่าวจะได้เซลล์ไฮบริโดมาเข้มข้นประมาณ $7-8 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีความมีชีวิตสูง กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (อาจเตรียมเซลล์ไว้ 2 flask) จากนั้นบั่นแยกเก็บส่วนเซลล์ แล้วถ่ายลงสู่ spinner flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยคำนวณให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นดังนี้ 5.0×10^4 , 1.0×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร 200 มิลลิลิตร กำหนดอัตราการกวนที่ความเร็ว 20 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ ทุก 1 วัน จนกว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจะ ลดลง

3.4.3 การติดตั้งระบบและการเตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

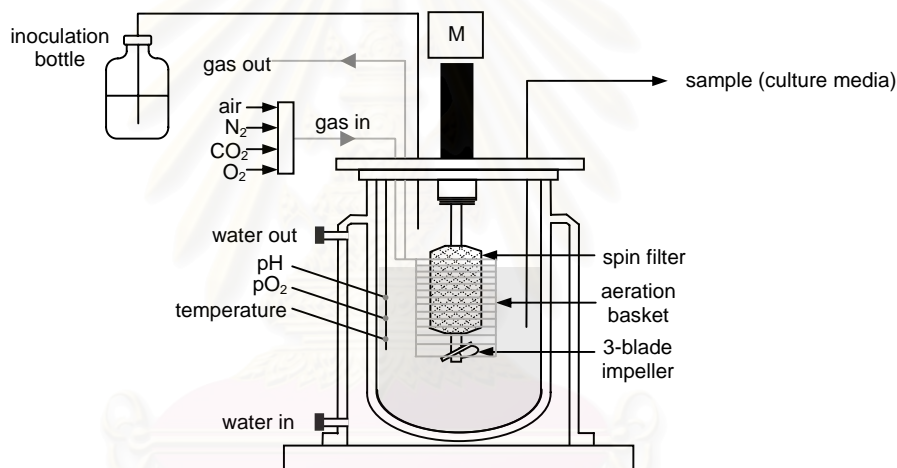
การติดตั้งระบบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนแสดงดังรูปที่ 3.1 ประกอบด้วย ถังแก้วสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิด double jacket ขนาด 2 ลิตร กับชุดควบคุมระบบสำหรับควบคุมภาวะของการเลี้ยงเซลล์ ระบบให้อากาศเป็นแบบ bubble-free aeration ที่ให้ฟองอากาศชนิดละเอียดขนาดเล็ก ผ่านชุดให้อากาศ silicone membrane basket ซึ่งประกอบขึ้นด้วยสายซิลิโคนขนาด 3.00x0.35 มิลลิเมตร ยาว 15.2 เมตร พันอยู่บนโครงเหล็กกล้าไร้สนิม ปลายทั้ง 2 ด้านต่อกับสายซิลิโคนและต่อเชื่อมเข้ากับ top plate การควบคุมการให้อากาศเข้าสู่ bioreactor อาศัยการวัด dissolved oxygen pressure (pO_2) ด้วย pO_2 electrode ชนิดที่สามารถนั่งฆ่าเชื้อได้ ควบคุมค่า pO_2 คงที่ที่ค่าหนึ่งๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ air saturation (ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วย gas mixing station ที่ซึ่งจะผสมอากาศ, ออกซิเจน, ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอัตโนมัติ แล้วจึงปั๊มเข้าสู่ถังเลี้ยงเซลล์ผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอนเมตร กำหนดอัตราการไหลของอากาศ 0.3-0.5 vvm ควบคุมความดันภายในสายซิลิโคนไม่เกิน 0.8 บาร์ การกวนผสมใช้ 3-blade segment impeller ดังรูปที่ 3.2 (Fenge และคณะ, 1993) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.4 เซนติเมตร ทำมุม 30 องศา ติดตั้งอยู่บนด้ามกวน ซึ่งจะให้การกวนที่ไม่รุนแรง ควบคุมอัตราการกวนคงที่ที่ 100 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วย circulating water bath ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.20 ± 0.05 ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ และโซเดียมไฮคาร์บอเนตเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

หลังจากการเตรียมถังและติดตั้งอุปกรณ์ประกอบเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นำไปนั่งฆ่าเชื้อทั้งระบบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิในถังลดลงแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 ลิตร ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมครอนเมตรแล้ว ลงสู่ถังผ่านทางท่อซิลิโคนด้วย peristaltic pump

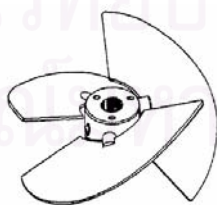
การติดตั้งระบบสำหรับการเลี้ยงเซลล์แบบ perfusion ศึกษาในถังขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.2 ลิตร ควบคุมการเลี้ยงเซลล์ดังภาวะข้างต้น ร่วมกับการใช้อุปกรณ์กักกันเซลล์ ได้แก่ spin filter มีลักษณะเป็นตะแกรงขนาดสม่ำเสมอรูปทรงกระบอก มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 20 ไมครอนเมตร วัสดุเป็น stainless steel มีพื้นที่ผิวการกรอง เท่ากับ 209.54 ตารางเซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางวัดจากด้านนอก 5.8 เซนติเมตร สูง 11.2 เซนติเมตร ขณะเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาตรอาหาร 1.2 ลิตร จะมีพื้นที่ที่สัมผัสกับน้ำเลี้ยงเซลล์ 85.6 ตารางเซนติเมตร spin filter ติดตั้งอยู่บนด้ามกวน เช่นเดียวกับใบพัด ดังนั้น ความเร็วรอบของ spin filter จะเท่ากับความเร็วรอบในการกวนผสม สำหรับการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วยระบบ perfusion มีการเติมอาหารใหม่ลงสู่ถังด้วย peristaltic pump เครื่อง

แรก ในขณะที่ peristaltic pump อีกเครื่องหนึ่งทำหน้าที่ดึงน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากส่วนที่อยู่ภายใน spin filter ซึ่งจะเป็นส่วนที่เกิดการกรองเซลล์ ทั้งนี้ความเร็วรอบของ peristaltic pump กำหนดให้เหมาะสมกับอัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ในแต่ละค่าโดยได้มีการ calibrate ไว้ก่อนล่วงหน้า

การถ่ายเซลล์ลงสู่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถทำได้ ดังนี้คือ หลังจากเลี้ยงเซลล์ใน spinner flask เป็นเวลา 2 วัน จะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 6.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ บั่นแยกเก็บเซลล์ให้ได้จำนวนเซลล์มีชีวิตประมาณ 1.20×10^8 เซลล์ ถ่ายลงสู่อาหารใหม่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นจึงถ่ายเซลล์พร้อมทั้งอาหารเลี้ยงเซลล์ลงสู่ bioreactor ผ่านทางสายซิลิโคนและ peristaltic pump เมื่อสิ้นสุดแล้วจะได้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในถังจะมีค่าประมาณ 1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรเริ่มต้นเท่ากับ 1.2 ลิตร



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงระบบสำหรับการเลี้ยงเซลล์ไฮบริดมาในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน



รูปที่ 3.2 ลักษณะของใบพัดแบบ 3-blade segment impeller (Fenge และคณะ, 1993)

3.4.4 การศึกษาการเลี้ยงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

3.4.4.1 ศึกษาค่า Dissolved Oxygen (DO) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากการถ่ายเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ตั้งต้นลงสู่ถังแล้ว ดำเนินการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ Batch ควบคุมภาวะการเลี้ยงเซลล์ดังข้อ 3.3.3 ควบคุมค่า DO ผ่าน gas mixing station ที่ซึ่งจะผสมอากาศ, ออกซิเจน, ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอัตโนมัติ โดยแปรค่า DO คงที่ตลอดการดำเนินงาน ดังนี้

- 1) 20 เปอร์เซ็นต์ air saturation
- 2) 50 เปอร์เซ็นต์ air saturation
- 3) 80 เปอร์เซ็นต์ air saturation

ติดตามการเจริญและเมตาบอลิซึมของเซลล์ไฮบริโดมา ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์, เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต, การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี, การใช้กลูโคส, การเกิดแลคเตตและแอมโมเนียซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเป็นค่าต่างๆ โดยใช้ค่าที่เซลล์มีการเจริญในระยะเอกซ์โพเนนเชียล (Ozturk และคณะ, 1991; Meilhoc และคณะ, 1990) ดังนี้

$$\text{Specific growth rate ; } \frac{dX_v}{dt} = \mu_{app} X_v$$

$$\text{Specific consumption rate ; } -\frac{dS_i}{dt} = q_i X_v$$

$$\text{Specific production rate ; } \frac{dP_i}{dt} = p_i X_v$$

$$\text{Lactate/Glucose metabolism ; } \frac{\Delta \text{Lactate (mM)}}{\Delta \text{Glucose (mM)}}$$

$$\text{Antibody productivity ; } \frac{[\text{MAb}]}{\text{time}}$$

X_v = viable cell

S_i = substrate concentration

P_i = product concentration

μ_{app} = apparent growth rate

q_i = specific consumption rate

p_i = specific production rate

3.4.4.2 ศึกษาการเลี้ยงเซลล์ระบบ fed-batch

หลังจากการถ่ายเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ตั้งต้นลงสู่ถังแล้ว ดำเนินการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ในระบบ fed-batch ควบคุมภาวะการเลี้ยงเซลล์ดังข้อ 3.4.3 ควบคุมค่า DO คงที่ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ air saturation ตลอดการดำเนินงาน การเลี้ยงเซลล์ระบบ fed-batch จะมีการเติมสารอาหารจำเป็นบางชนิดหลังจากดำเนินการเลี้ยงเซลล์ไปได้ระยะหนึ่ง ช่วงเวลาในการเติมอาหารพิจารณาจากลักษณะการเจริญเมื่อเลี้ยงแบบ batch จากผลการทดลองที่ 4.3 พบว่าตำแหน่งในการเติมอาหารที่เหมาะสม คือ เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน เนื่องจาก เซลล์ไฮบริโดมามีชีวิตยังคงเพิ่มจำนวนอยู่และยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โดยแบ่งการทดลองเป็นดังนี้

1) เติม Fetal calf serum (FCS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร FCS เป็นแหล่งของ growth factor และโปรตีนชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ โดยปริมาณที่เติมนี้อาจทำให้ความเข้มข้นของซีรัมภายในถังเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์

2) เติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น 1 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นที่เติมนี้อาจพิจารณาผลการเลี้ยงเซลล์แบบ batch พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไป 2 วัน ความเข้มข้นของกลูโคสจะลดลงมาจาก 4 กรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 3 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเติมกลูโคสเพิ่มให้มีความเข้มข้นกลับมาเป็น 4 กรัมต่อลิตร เท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น เตรียมโดยละลายกลูโคส 1.23 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 30 มิลลิลิตร

3) เติมกลูตามีนให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น 0.4 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นที่เติมนี้อาจพิจารณาจากสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา มีความเข้มข้นของกลูตามีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลายกลูตามีน 0.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 30 มิลลิลิตร

4) เติมกลูโคสและกลูตามีนให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น 1 กรัมต่อลิตร และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เตรียมโดยละลายกลูโคส 1.23 กรัม และกลูตามีน 0.24 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 30 มิลลิลิตร

การเติมในแต่ละครั้งจะเติมผ่านทางสายซิลิโคนและอุปกรณ์เชื่อมต่อ เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อน ติดตามการเจริญและเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน

3.4.4.3 ศึกษาการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion

หลังจากการถ่ายเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ตั้งต้นลงสู่ถังแล้ว ดำเนินการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมภาวะการเลี้ยงเซลล์ดังข้อ 3.4.3 ควบคุมค่า DO คงที่ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ air saturation การเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ perfusion ประกอบด้วย peristaltic pump 2 เครื่อง ทำหน้าที่เปลี่ยนถ่ายอาหารระหว่างถังเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมากับถังเลี้ยงเซลล์ และระหว่างถังเลี้ยงเซลล์กับถังเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ โดยเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากภายใน spin filter ควบคุมปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ในถังให้คงที่ที่ 1.2 ลิตร ดังรูปที่ 3.3 เริ่มต้นระบบ perfusion เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้เป็นระยะเวลา 2 วัน โดยได้ทดลองดำเนินการเลี้ยงเซลล์แบบ perfusion เป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

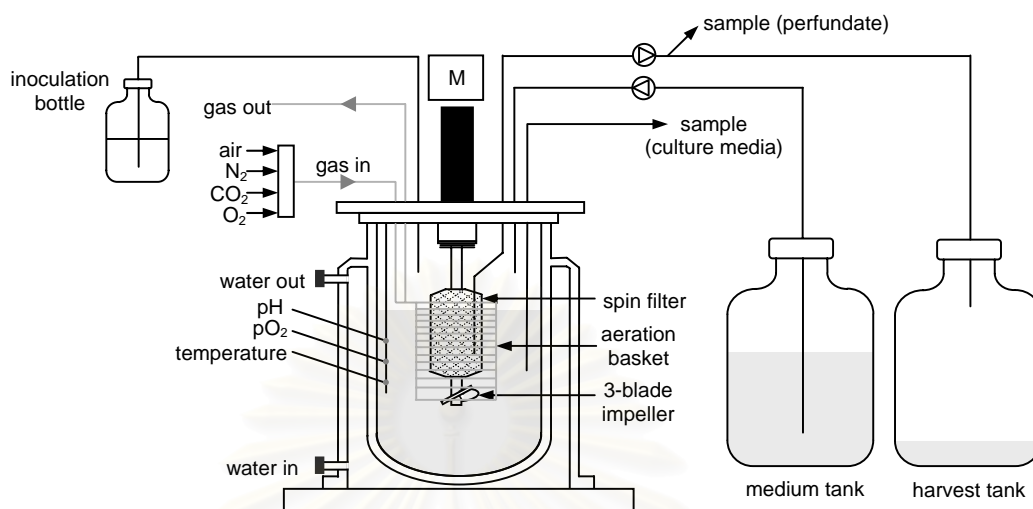
1. ระบบ perfusion แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous perfusion) เปลี่ยนถ่ายอาหารด้วยอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อวัน เริ่มต้นเปลี่ยนถ่ายเป็นครั้งแรกหลังการเลี้ยงเซลล์ได้ 2 วัน จากนั้น เปลี่ยนถ่ายวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร โดยปั้มน้ำเลี้ยงเซลล์ออกผ่านทาง spin filter ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทั้งนี้กระทำการเปลี่ยนถ่ายอย่างรวดเร็ว ติดตามการเจริญและเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน

2. ระบบ perfusion แบบต่อเนื่อง (continuous perfusion) เปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างสม่ำเสมอต่อเนื่องด้วย perfusion rate คงที่ เริ่มต้นเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นครั้งแรกหลังการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน ดำเนินการเปลี่ยนถ่ายอาหารแบบต่อเนื่องผ่าน peristaltic pump 2 ตัว การคำนวณ perfusion rate ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{perfusion rate (vvd)} = \frac{\text{ปริมาตรอาหารใหม่}}{\text{ปริมาตรน้ำเลี้ยงเซลล์ในถัง} / \text{เวลา}}$$

กำหนดควบคุม perfusion rate ให้คงที่ตลอดการดำเนินการ ดังนี้

- 1) 0.10 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ในการเปลี่ยนถ่าย
 - 2) 0.20 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ในการเปลี่ยนถ่าย
 - 3) 0.40 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ในการเปลี่ยนถ่าย
 - 4) 0.40 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 5 เปอร์เซ็นต์ ในการเปลี่ยนถ่าย
 - 5) 0.80 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FCS 5 เปอร์เซ็นต์ ในการเปลี่ยนถ่าย
- ติดตามการเจริญและเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion ใน stirred-tank bioreactor ที่ติดตั้ง spin filter ทำหน้าที่เป็นอุปกรณ์ในการกักกันเซลล์

3.4.5 การศึกษาเรื่อง Inhibition concentration ของ แลคเทตและแอมโมเนีย

3.4.5.1 การศึกษาความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการทดสอบ

เตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 โดยเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน ให้ได้เซลล์มีชีวิตทั้งหมดจำนวนอย่างน้อย 1.20×10^7 เซลล์ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า จากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 , 2.0×10^5 , 5.0×10^5 และ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา เลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน ติดตามการเจริญและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตในแต่ละวัน เลือความเข้มข้นของเซลล์ที่สามารถเจริญและมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงอย่างน้อย 2-3 วัน เพื่อใช้ในการทดลองส่วนต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการตายอันเกิดขึ้นจากการเจริญที่หนาแน่นเกินไป ไม่ได้เกิดจากสารที่ต้องการทดสอบอย่างแท้จริง

3.4.5.2 ความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตต่อการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา

เตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 โดยเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 วัน ให้ได้เซลล์ทั้งหมดจำนวนอย่างน้อย 8.0×10^6 เซลล์ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต

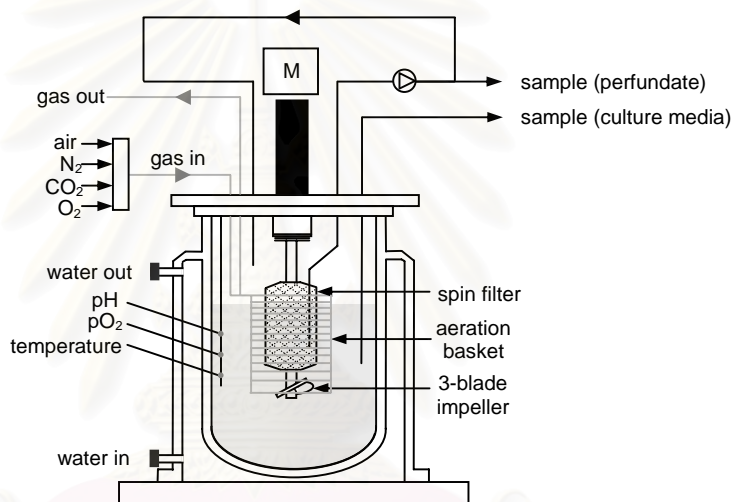
ชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ บั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า จากนั้นจึงจางให้เซลล์มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.0×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (จากผลการทดลองที่ 4.1) เลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แปรค่าความเข้มข้นของแลคเทตและแอมโมเนียต่างๆกัน ดังนี้ เตรียมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลายลิเทียมแลคเทต เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร กรองสารละลายผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นจึงจางลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตเริ่มต้นเท่ากับ 0-10 มิลลิโมลาร์ และ 0-10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 3 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นติดตามการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.6 การศึกษาเรื่องประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (Retention capacity)

การศึกษาเรื่อง Retention capacity ศึกษาในถังเลี้ยงเซลล์ขนาด 2 ลิตร และมีปริมาตรอาหารคงที่เท่ากับ 1.2 ลิตร อุปกรณ์กักกันเซลล์ที่ใช้ได้แก่ spin filter ที่มีขนาดรูพรุน 20 ไมโครเมตร การหมุนของ spin filter ขับเคลื่อนโดยมอเตอร์จากด้านบน เชื่อมต่อสายซิลิโคนจากท่อเก็บตัวอย่างภายใน spin filter มีทิศทางของ perfusion flow ไหลออกจากภายใน spin filter ผ่าน peristaltic pump แล้วแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งเป็นปลายเปิดออกสู่ภายนอกเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จากภายใน spin filter อีกทางหนึ่งต่อกลับเข้าสู่ถังอีกครั้งในลักษณะ recycle loop เพื่อรักษาระดับปริมาตรภายในถังและความเข้มข้นของเซลล์ให้คงที่ ดังรูปที่ 3.4 หลังจากถ่ายเซลล์ลงสู่ถังแล้ว เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาเป็นเวลา 3 วัน ด้วยภาวะดังข้อ 3.4.3 ระยะเวลาการเลี้ยงนี้จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดคงที่ (จากผลการทดลองที่ 4.3) จากนั้นเริ่มแปรค่าอัตราการกวน เท่ากับ 50, 75, 100, 125 และ 150 รอบต่อนาที คิดเป็นความเร็วเชิงเส้นเท่ากับ 0.15, 0.23, 0.30, 0.38 และ 0.46 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ แต่ละค่าอัตราการกวน แปรค่า perfusion rate เท่ากับ 0.25, 0.5 และ 1.0 vvd ดำเนินการในแต่ละค่าตัวแปรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ภายในถัง (ภายนอก spin filter) และตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์จากภายใน spin filter โดยชะสายซิลิโคนประมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อชะเอาเซลล์ที่ติดค้างบริเวณข้อต่อออก จากนั้นนับจำนวนเซลล์แล้วคำนวณค่าเป็นความเข้มข้นเซลล์ของทั้ง 2 ตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Retention capacity (\%)} = \left[1 - \frac{C_{in}}{C_{out}} \right] \times 100$$

เมื่อ C_{in} และ C_{out} คือ ความเข้มข้นของเซลล์ภายในและภายนอก spin filter ตามลำดับ ค่า retention สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่า ไม่มีเซลล์อยู่ภายใน spin filter เลย แสดงว่าการกักกันเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ จะเป็นไปได้ก็ต่อเมื่อ spin filter มีขนาดรูพรุนเล็กกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ หรือเกิดการอุดตันอย่างสมบูรณ์ ค่า retention capacity ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์สามารถผ่าน spin filter เข้าไปได้ นั่นคือ มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ ส่วนถ้าหากค่าการกักกันเซลล์ เท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ หมายความว่าอนุภาคทั้งหมดสามารถผ่าน spin filter เข้าไปได้โดยไม่มีการกักกันเลย (Iding และคณะ, 2000)



รูปที่ 3.4 แผนภาพแสดงระบบการเวียนน้ำเลี้ยงเซลล์แบบ recycle loop สำหรับการศึกษารื่องประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter (retention capacity)

3.4.7 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมา

การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมา ใช้วิธีการถ่ายรูปเซลล์ไฮบริโดมาบน hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า ด้วย Camera converter จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เทียบเป็นสัดส่วนกับขนาดของตารางบน hemacytometer คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไฮบริโดมาโดยโปรแกรม SPSS for Windows

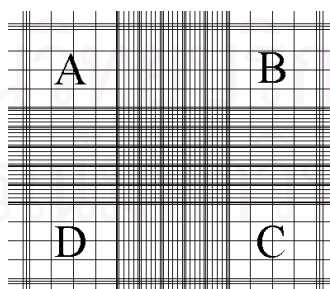
3.4.8 การเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเซลล์และการวิเคราะห์ปริมาณสาร

3.4.8.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยชุดเก็บตัวอย่าง ผ่านท่อซิลิโคนที่ต่อเชื่อมกับท่อ stainless ที่ติดตั้งอยู่ภายใน หลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ค้างอยู่ในท่อเก็บตัวอย่างกลับเข้าสู่ถัง โดยใช้กระบอกฉีดดันผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ตัวอย่างที่ได้แบ่งส่วนหนึ่งไว้เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ ส่วนที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์อื่นๆ ได้แก่ แอนติบอดี กลูโคส แอมโมเนียและแลคเตต

3.4.8.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์

เซลล์ไฮบริโดมา มีลักษณะการเจริญเป็นแบบเซลล์เดี่ยว สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายได้โดย hemacytometer ด้วยวิธี Trypan blue exclusion method (Tennant, 1964) ดังนี้ ผสมน้ำเลี้ยงเซลล์กับสารละลาย trypan blue 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ปิเปตส่วนผสมที่ได้ประมาณ 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงบน hemacytometer ที่ปิดด้วย cover slip โดยอาศัย capillary action นับจำนวนเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่กำลังขยาย 10 เท่า คำนวณค่าที่ได้เป็นความเข้มข้นของเซลล์ สีย้อม Trypan blue มีคุณสมบัติชอบน้ำ สามารถแพร่ผ่านเมมเบรนของเซลล์ได้ เซลล์ตายจะติดสีย้อมและปรากฏสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์มีชีวิตจะสามารถขับสีย้อมออกนอกเซลล์ ปรากฏเป็นลักษณะใสขาว ไม่ติดสีย้อม การนับเซลล์โดยใช้ Hemacytometer ดังนี้



$$\text{ความเข้มข้นของเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ใน 4 ช่องใหญ่ (A-D)} \times \text{อัตราการเจือจาง} \times 10^4}{4}$$

(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต}}{\text{ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

(เปอร์เซ็นต์)

3.4.8.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและแลคเตท

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสและแลคเตท วิเคราะห์ด้วย HPLC คอลัมน์ชนิด ion exclusion และ reverse phase ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ กรองตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างครั้งละ 20 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบ โดยมีสารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นสารละลายตัวพา กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลด้วย reflective index detector กลูโคสและแลคเตทมี retention time ประมาณ 9 และ 13 นาที ตามลำดับ เทียบพื้นที่ที่ได้กราฟกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสและแลคเตท ในภาคผนวก ก รูปที่ ก.4 และ ก.5

3.4.8.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA มีขั้นตอนดังนี้ เคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยสารละลายเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมต่อกับ BSA (enro-BSA conjugate) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายแอนติบอดีมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี ที่เจือจางอย่างเหมาะสมแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ซึ่งมี HRP เชื่อมอยู่ (HRP-Rabbit anti-mouse IgG) เจือจาง 2000 เท่า ใน PBS ที่มี BSA 0.5 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน phosphate citrate buffer pH 5.0 (ภาคผนวก ข) หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วย H_2SO_4 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader คำนวณเป็นความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแอนติบอดี ดังภาคผนวก ก (รูปที่ ก.1)

3.4.8.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย

วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในสารละลายตัวอย่างโดยวิธี Indophenol blue reaction ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ยูเรียของ Fewcett และคณะ (1960) ดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมคลอไรด์ 0-5 มิลลิโมลาร์ เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา เติมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ลงในจานชนิด 96 หลุม เติมสารละลาย Sodium phenate 40 ไมโครลิตร สารละลาย Sodium nitroprusside 0.01 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย Sodium hypochlorite อย่างละ 60 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ ในภาคผนวก ก รูปที่ ก.3

3.4.8.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ assay kit ของ บริษัท Pierce ดังนี้ เตรียม Working reagent ด้วยการผสม Reagent A กับ Reagent B ในอัตราส่วน 50 ต่อ 1 เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน และเจือจางสารละลายโปรตีนตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย PBS เติมสารละลายมาตรฐาน BSA และสารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุม เบาๆ ประมาณ 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3.4.9 การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

3.4.9.1 การเตรียมเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมกับ BSA (ENRO-BSA conjugate)

เนื่องจากการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนูในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (มนัสพงศ์, 2005) ฉีดกระตุ้นด้วย ENRO-KLH conjugate ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ ENRO-BSA conjugate สำหรับเคลือบจานชนิด 96 หลุม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซินในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยเตรียมเอนโรฟลอกซาซินที่เชื่อมกับ BSA ตามวิธีของ Watanabe และ คณะ (2002) ละลายเอนโรฟลอกซาซิน 4 มิลลิกรัม, NHS 3 มิลลิกรัม และ EDC 3 มิลลิกรัม ใน DMF 0.5 มิลลิลิตร เขย่าช้า

ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA 4 มิลลิกรัม ในบัฟเฟอร์คาร์บอนเนต 0.5 M, pH 9.6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 4-5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งเก็บแยกไว้เป็นส่วนๆ นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับแอนโอฟลอกซาซิน ด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) และหาน้ำหนักโมเลกุลของ ENRO-BSA conjugate เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ BSA เพื่อยืนยันการเชื่อมติดของแอนโอฟลอกซาซินกับ BSA หากน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น แสดงว่าการเชื่อมติดสำเร็จ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) วิเคราะห์ที่ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

3.4.9.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ซึ่งสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนโอฟลอกซาซิน มาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ผ่านคอลัมน์ ProteinA sepharose ด้วยเครื่องแยกโปรตีน ÄKTAprime และโปรแกรม primeview มีขั้นตอนดังนี้ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 8.0 จนกระทั่งโครมาโตแกรมมีเส้น base line คงที่ แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปรับค่า pH ให้เป็น 8.0 ด้วยบัฟเฟอร์ Tris 1 โมลาร์ pH 9.0 แล้ว ลงในคอลัมน์โปรตีนเอ กำหนดอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นชะโปรตีน unbound ออกด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 8.0 จนกระทั่งโครมาโตแกรมมีเส้น base line คงที่ แล้วจึงชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ซีเตรท 0.1 โมลาร์ pH 3.0 เก็บแยกส่วนสารละลายแอนติบอดีที่ออกมาจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร เติบบัฟเฟอร์ Tris 1 โมลาร์ pH 9.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ชะจนกระทั่งโครมาโตแกรมมีเส้น base line คงที่ แล้วจึงล้างคอลัมน์โปรตีนเอด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ pH 8.0 สำหรับลำดับส่วนที่ได้นั้น เก็บรวมลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร สูงไว้รวมกัน ทั้งนี้พิจารณาจากโครมาโตแกรมที่แสดง นำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง (Hudson และ Hay, 1980) จากนั้นกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วแบ่งเก็บแยกไว้เป็นส่วนๆ เพื่อใช้เป็นแอนติบอดีมาตรฐาน และนำส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay

3.4.9.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์โปรตีน เอ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ดังนี้ separating gel ประกอบด้วยอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้มีความกว้างไม่ต่ำกว่า 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 0.75 เซนติเมตร และ stacking gel ประกอบด้วยอะคริลาไมด์เจล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข) นำสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ผสมกับ sample buffer อัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำมาต้มที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นจึงใส่ตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของเจล เริ่มแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่จนถึงขอบเจลประมาณ 1 เซนติเมตร (90 นาที) หยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปแช่ใน Destaining solution โดยแช่ค้างคืนไว้ และเปลี่ยน Destaining solution จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนสีฟ้า

สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า relative mobility (R_f) กับ logarithm ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Prestained Protein, Fermentas) ที่ประกอบด้วย β -galactosidase (117 kDa), Bovine serum albumin (85 kDa), Ovalbumin (49 kDa), Carbonic anhydrase (34 kDa), β -galactoglobulin (25 kDa) และ Lysozyme (19 kDa) จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก.6)

บทที่ 4

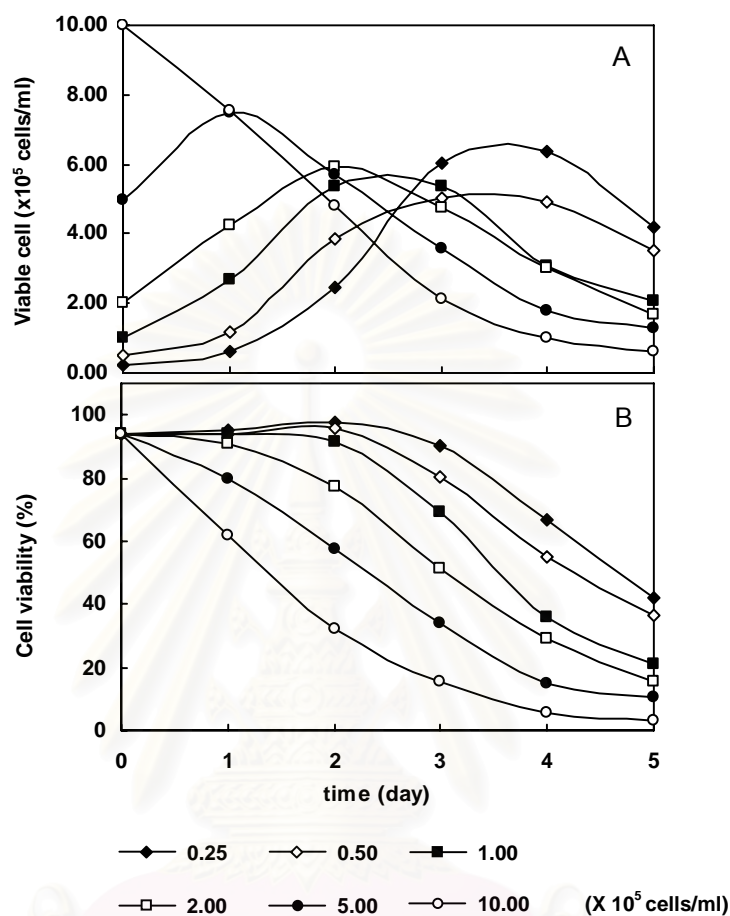
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของแอมโมเนียและแลคเทตต่อการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

เมแทบอลิต์ 2 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนีย และแลคเทตที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของเซลล์ จะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์พันธุ์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์ไฮบริโดมา และยับยั้งการผลิตแอนติบอดี หากมีความเข้มข้นสูงขึ้นถึงระดับหนึ่ง (Ozturk และคณะ, 1992; Chen และคณะ, 1992) การทดลองนี้จึงได้ศึกษาถึงความเข้มข้นของเมแทบอลิต์ทั้ง 2 ชนิด ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงระบบการเลี้ยงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด มีผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.1.1 การเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม

ในการศึกษาเรื่องผลของแอมโมเนียและแลคเทตนั้น จะต้องทำการศึกษากการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ เพื่อเลือกความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการตายของเซลล์ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบ อันเนื่องมาจากเซลล์มีการเจริญที่หนาแน่นเกินไป ซึ่งไม่ได้เกิดจากผลของเมแทบอลิต์ที่ต้องการทดสอบอย่างแท้จริง โดยแปรค่าความเข้มข้นของเซลล์ในช่วง 2.50×10^4 ถึง 1.00×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน ติดตามการเจริญของเซลล์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละค่าพบว่าที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2.50×10^4 , 5.00×10^4 และ 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการเจริญได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2-3 วัน โดยที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 2.00×10^5 และ 5.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าถึงแม้จะยังมีการเจริญอยู่ แต่ก็เริ่มปรากฏการตายของเซลล์เกิดขึ้น สังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตค่อยๆ ลดลงในวันถัดมา ส่วนที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1.00×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีชีวิตลดจำนวนลงทันทีในวันถัดมา ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงทันทีในวันถัดมาเช่นกัน ดังรูปที่ 4.1 จากลักษณะการเจริญนี้ จึงเลือกความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5.00×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบเรื่อง inhibition concentration เนื่องจากเซลล์ยังคงมีการเจริญอยู่ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นานถึง 3 วัน

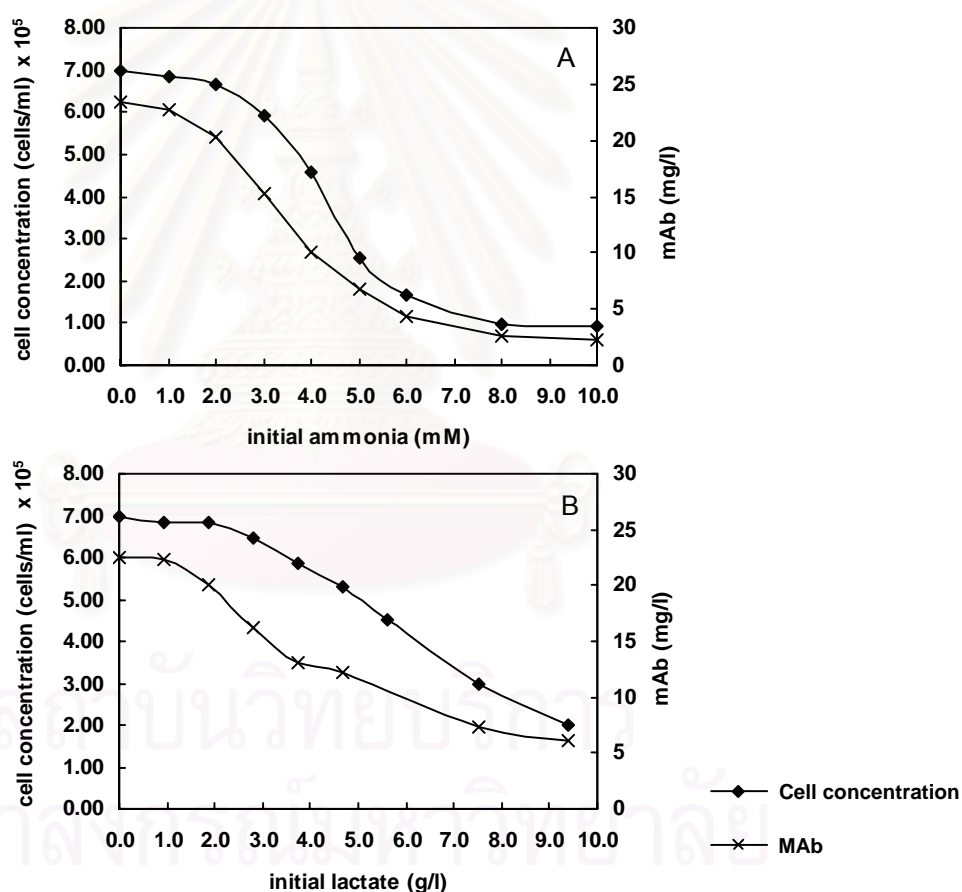


รูปที่ 4.1 การเจริญและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม เมื่อมีเซลล์เริ่มต้น ตั้งแต่ 0.25-10x10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (A) การเจริญของเซลล์ (B) เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์

4.1.2 ความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตที่ยับยั้งการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา (inhibition concentration)

หลังจากเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5.00x10⁴ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีแอมโมเนียและคลอไรด์เข้มข้นในช่วง 0-10 มิลลิโมลาร์ และที่มีลิเทียมแลคเทตเข้มข้นในช่วง 0-10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วติดตามเปรียบเทียบการเจริญและความเข้มข้นของเซลล์ในแต่ละค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียและคลอไรด์เริ่มต้น พบว่า ความเข้มข้นของเซลล์ในชุดทดลองที่มีแอมโมเนียเข้มข้น 0-2 มิลลิโมลาร์ จะมีค่าใกล้เคียงกันในช่วงประมาณ 6.68-6.98x10⁵ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงเป็น 3 มิลลิโมลาร์ เซลล์เริ่มจะมีการเจริญลดลงอย่างชัดเจน และจะลดลงเหลือเพียง 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีแอมโมเนียเริ่มต้นสูงกว่า 4 มิลลิโมลาร์ ส่วนแอนติบอดี เริ่มลดลงเมื่อมีแอมโมเนียเริ่มต้นตั้งแต่ 2 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป ดังรูปที่ 4.2(A) สำหรับการศึกษาลักษณะของแลคเตทที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 พบว่า ความเข้มข้นของเซลล์ในชุดทดลองที่มีแลคเตทเข้มข้น 0-2 กรัมต่อลิตร จะมีค่าใกล้เคียงกันในช่วงประมาณ $6.85-6.96 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงเป็น 3 กรัมต่อลิตร เซลล์เริ่มจะมีการเจริญลดลง และในขณะเดียวกัน กลับพบว่า แอนติบอดีเริ่มมีความเข้มข้นลดลงเมื่อมีแลคเตทตั้งแต่ 2 กรัมต่อลิตรขึ้นไป การลดลงของแอนติบอดี สอดคล้องกับความเข้มข้นเซลล์ที่ลดลงเป็นลำดับ ดังรูปที่ 4.2(B)



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 และความเข้มข้นของแอนติบอดี หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน (A) เมื่อมีความเข้มข้นของแลคเตทเริ่มต้นเท่ากับ 0-10 กรัมต่อลิตร (B) เมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0-10 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตที่เริ่มมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มีค่าเท่ากับ 3 มิลลิโมลาร์ และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นที่เริ่มมีผลต่อการผลิตแอนติบอดีมีค่าเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ Chen และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าเริ่มมีการยับยั้งการเจริญโดยแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ และแลคเทตที่ 2.5 กรัมต่อลิตร สำหรับความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตที่มีผลทำให้เซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 มีจำนวนเซลล์ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งมีค่าประมาณ 4.5 มิลลิโมลาร์ และ 6.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สรุปความเข้มข้นของเมแทบอลิต์ที่มีผลต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ดังตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอมโมเนียและแลคเทตมีผลเพิ่มอัตราการใช้กลูโคสและ กลูตามีน ซึ่งจะยิ่งทำให้เกิดการสะสมของเมแทบอลิต์ทั้ง 2 ชนิดมากยิ่งขึ้น และยังเพิ่มความเป็นกรดภายในเซลล์โดยเฉพาะเมื่อมีแอมโมเนียสูงขึ้นอีกด้วย (Ozturk และคณะ, 1992)

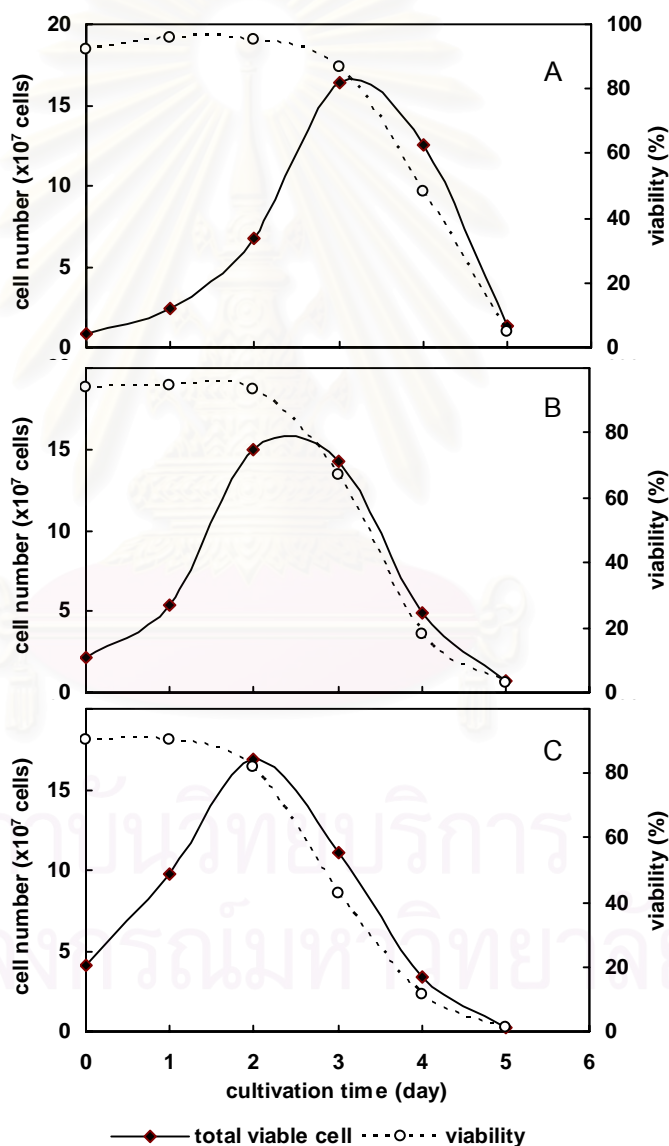
ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของแลคเทตและแอมโมเนียที่มีผลต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

ผลกระทบต่อเซลล์	ความเข้มข้น	
	แลคเทต (กรัมต่อลิตร)	แอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์)
ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์	3.0	3.0
ผลยับยั้งการเจริญ 50 เปอร์เซ็นต์	6.5	4.5
ผลยับยั้งการผลิตแอนติบอดี	2.0	2.0

4.2 การเตรียมเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน spinner flask

การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาใน stirred-tank bioreactor นั้นจะเริ่มต้นการเลี้ยงด้วยเซลล์มีชีวิต ความเข้มข้นประมาณ 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1.2 ลิตร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตให้ได้ไม่ต่ำกว่า 1.20×10^8 เซลล์ ในขณะที่ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงอยู่ ปัจจัยที่จะทำให้ได้เซลล์จำนวนเพียงพอ และยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง คือ การเลือกความเข้มข้นเซลล์ตั้งต้นใน spinner flask ที่เหมาะสม โดยได้แปรค่าความเข้มข้นของเซลล์ เท่ากับ 5.0×10^4 , 1.0×10^5 และ 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงใน spinner flask ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5.0×10^4 เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร จะได้เซลล์จำนวน 1.64×10^8 เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงเหลือ 86.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงถึง 1.50×10^8 เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตยังคงสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 2.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงถึง 1.69×10^8 เซลล์ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกลับลดลงเหลือเพียง 82.1 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.3 เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ส่งผลต่อลักษณะการเจริญและการใช้สารอาหารของเซลล์ เซลล์อาจมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากัน ก็แต่จะมีอัตราการตายของเซลล์ที่ต่างกันด้วย



รูปที่ 4.3 การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน spinner flask ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นต่างๆ ดังนี้ (A) 5.0×10^4 (B) 1.0×10^5 (C) 2.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าการเตรียมเซลล์ใน spinner flask ที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้เซลล์ เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 200 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน จะให้เซลล์ไฮบริดมาจำนวนมากเพียงพอสำหรับเป็นเซลล์เริ่มต้นในถังเลี้ยงเซลล์ และยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์อยู่ จากนั้นจึงปั่นแยกเก็บเอาเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดมาที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม จะมีเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ ได้แก่ แอมโมเนียและแลคเตตสะสมอยู่ ซึ่งจะมีผลต่อการลักษณะเจริญของเซลล์ในถังหากไม่มีการเปลี่ยนอาหาร หลังจากนั้นจึงค่อยถ่ายเซลล์ลงสู่ถังเพื่อศึกษาการเลี้ยงเซลล์ใน stirred-tank bioreactor ต่อไป

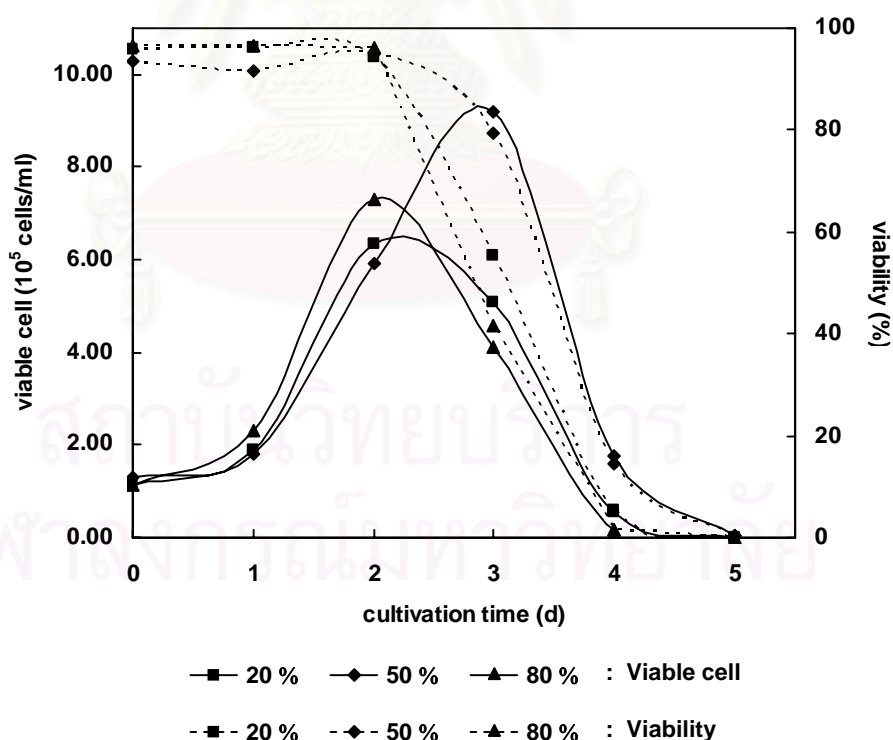
4.3 ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved Oxygen: DO) ต่อการเจริญและการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ คือ การให้ออกซิเจนที่เหมาะสม และเพียงพอต่อความต้องการ มีรายงานการศึกษาผลกระทบของ DO ต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์หลายฉบับ พบว่า การเจริญของเซลล์จะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงในภาวะการเลี้ยงที่ปราศจากออกซิเจน และในทางกลับกัน เซลล์ก็จะถูกทำลายด้วยการออกซิไดซ์ในภาวะที่มีออกซิเจนสูงๆ (Kilburn และคณะ, 1969) ดังนั้นจึงมีช่วงของค่า DO ช่วงหนึ่ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ โดยทั่วไปแล้ว เซลล์แต่ละชนิดจะมีค่า DO ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกัน และมีความไวในการตอบสนองต่อค่า DO ที่หลากหลาย (Thomas, 1986)

เนื่องจากมีรายงานค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ในช่วงที่กว้าง ดังนั้นจึงได้ศึกษาค่าการละลายของออกซิเจนคงที่ที่ค่า DO ที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ไฮบริดมา ENRO 44 โดยกำหนดค่าควบคุมคงที่เท่ากับ 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ดำเนินการเลี้ยงเซลล์ในระบบ batch ติดตามเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การใช้กลูโคส และการผลิตของเสียของเซลล์ ที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน พบว่าเซลล์ไฮบริดมา ENRO 44 มีการเจริญและเมแทบอลิซึม พิจารณาเปรียบเทียบในแต่ละปัจจัย เป็นดังต่อไปนี้

4.3.1 การเจริญและความมีชีวิตของเซลล์

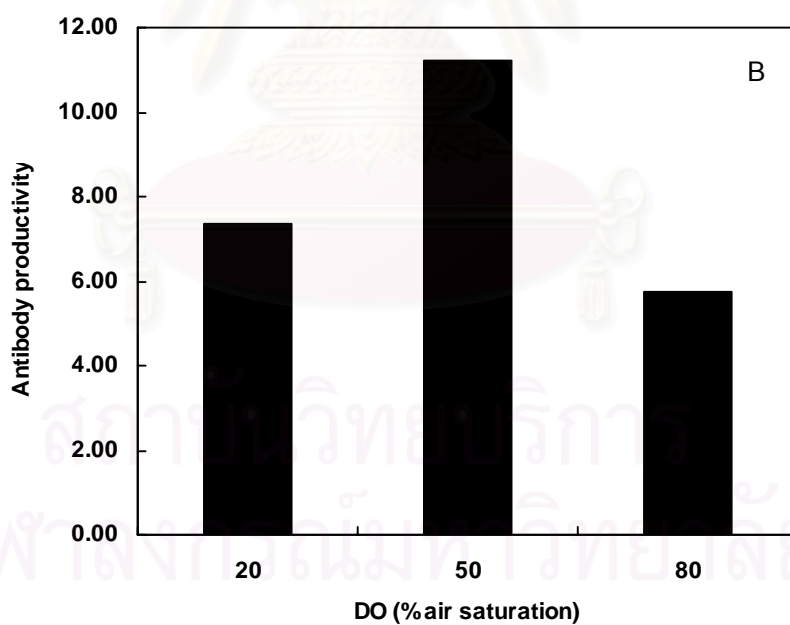
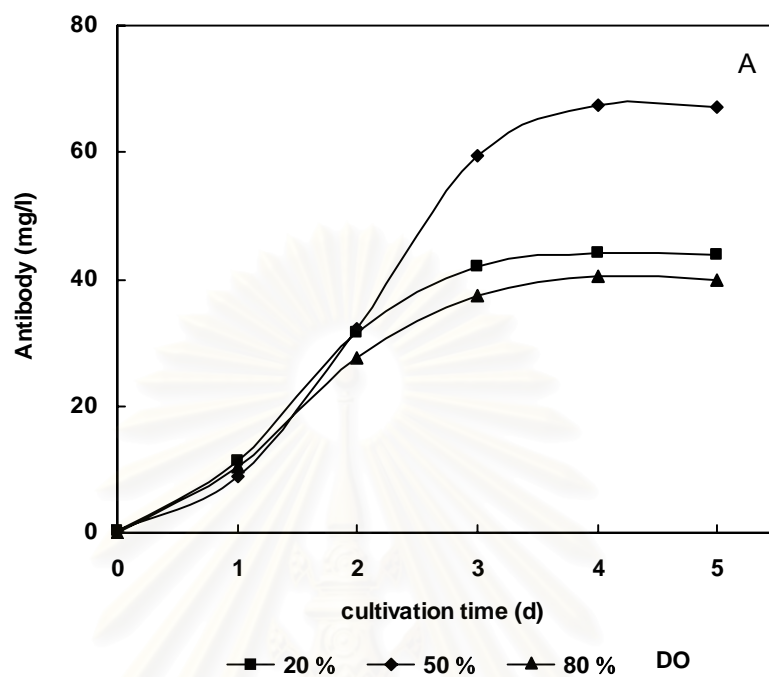
การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ที่ค่า DO 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยพบว่า เซลล์มีการเจริญอย่างช้าๆ ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นเข้าสู่ระยะเอกซ์โพเนนเชียล ซึ่งเซลล์จะมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้น ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะจะใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงประมาณ 0.76-0.87 ต่อวัน และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ค่า DO เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำกว่าอีก 2 ภาวะเล็กน้อย โดยที่ไม่ได้มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ดังตารางที่ 4.2 แต่ถึงแม้ว่าจะมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่า เซลล์กลับสามารถดำรงการเจริญของเซลล์มีชีวิตได้นานกว่า และมีความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 9.21×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงนาน 3 วัน อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตยังลดลงช้ากว่าด้วย ในขณะที่อีก 2 ภาวะ จะมีลักษณะการเจริญที่คล้ายคลึงกัน มีความเข้มข้นของเซลล์สูงที่สุดประมาณ $6.00-7.00 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 วัน และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วในวันถัดมา อย่างไรก็ตาม พบว่าทั้ง 3 ภาวะ สามารถคงเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ได้นานเพียง 2 วันเท่านั้น จากนั้นก็ลดลงอย่างต่อเนื่องในวันถัดมา จนกระทั่งมีค่าต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 4.4 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อการเจริญและความมีชีวิตของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

4.3.2 ผลของ DO ต่อการผลิตแอนติบอดี

จากการติดตามความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ค่า DO ต่างๆ ในแต่ละวัน ได้ผลดังรูปที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีที่ DO 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในระยะ 2 วันแรกของการผลิต ทั้ง 3 ภาวะจะให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีใกล้เคียงกันประมาณ 27.50-32.09 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับลักษณะการเจริญของเซลล์มีชีวิต แต่หลังจากนั้น ที่ค่า DO 50 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของแอนติบอดีจะเพิ่มสูงขึ้นจากเดิมเป็น 2 เท่า อันเป็นผลจากการที่เซลล์มีชีวิตยังคงเพิ่มจำนวนอยู่ในระยะเวลา 3 วัน ส่งผลให้ยังคงมีการผลิตแอนติบอดีให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยมีอัตราการผลิตแอนติบอดีจำเพาะ ในช่วงของการเจริญสูงสุดเท่ากับ 26.80 นาโนกรัมต่อเซลล์ต่อวัน หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลา 5 วัน พบว่าแอนติบอดีที่ได้ มีเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 67.33 มิลลิกรัมต่อลิตร มี productivity เท่ากับ 11.22 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่เมื่อควบคุมค่า DO คงที่ที่ 20 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อยหลังจากช่วงของการเจริญในวันที่ 2 จากนั้นก็จะคงที่ที่ความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 44.03 และ 40.51 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น productivity เท่ากับ 7.34 และ 6.75 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นที่ได้คิดเป็นความเข้มข้นเพียง 65.4 และ 60.2 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นที่ได้สูงสุดที่ค่า DO 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

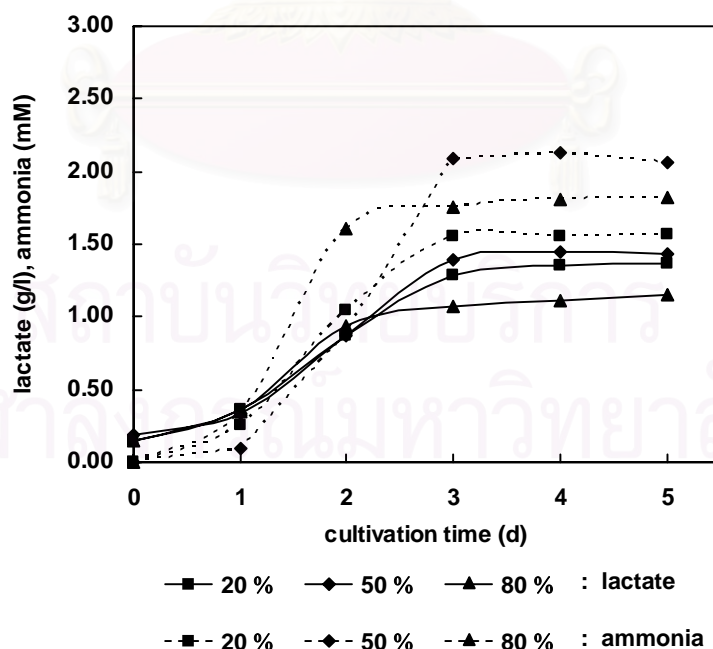


รูปที่ 4.5 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

(A) ความเข้มข้นของแอนติบอดีในแต่ละวัน (B) อัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) ของแอนติบอดี

4.3.3 ผลของ DO ต่อการผลิตแลคเตทและแอมโมเนียในระหว่างการเลี้ยงเซลล์

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเสียสำคัญ 2 ชนิดที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ แลคเตทและแอมโมเนีย จากผลการเลี้ยงไฮบริโดมาเมื่อควบคุมค่า DO คงที่ที่ 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ อากาศอิ่มตัว พบว่า แอมโมเนียและแลคเตทมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันแรก จากนั้นความเข้มข้นจึงจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 3 วัน จากนั้นความเข้มข้นก็จะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการดำเนินงาน เมื่อควบคุมค่า DO ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ จะให้ทั้งแอมโมเนียและแลคเตทสูงที่สุดเท่ากับ 2.13 มิลลิโมลาร์ และ 1.44 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงถึงระดับที่เริ่มมีผลต่อการเจริญของเซลล์แล้ว สำหรับ DO 80 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดแลคเตทความเข้มข้นน้อยที่สุด ประมาณ 1.15 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีความเข้มข้นเซลล์น้อย และมีการให้อากาศสูง ในขณะที่ DO 20 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดแอมโมเนียน้อยที่สุด เท่ากับประมาณ 1.56 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 4.6 การที่เมื่อควบคุมค่า DO ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วมีของเสียทั้งแอมโมเนียและแลคเตทเกิดขึ้นมากที่สุดนั้น สอดคล้องกับลักษณะการเจริญของเซลล์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ภาวะนี้ การสะสมของแอมโมเนียและแลคเตทมีความสัมพันธ์กับการเจริญ และจะไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดีเฉพาะในระยะแรกเท่านั้นเนื่องจากมีความเข้มข้นไม่สูงนัก เมื่อเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น แอมโมเนียและแลคเตทจึงสะสมเพิ่มสูงขึ้นตาม จากนั้นเซลล์จึงหยุดการเจริญและการผลิตแอนติบอดี อันอาจจะต้องวิจัยเรื่องความจำกัดของอาหารหรือการสะสมของแอมโมเนีย

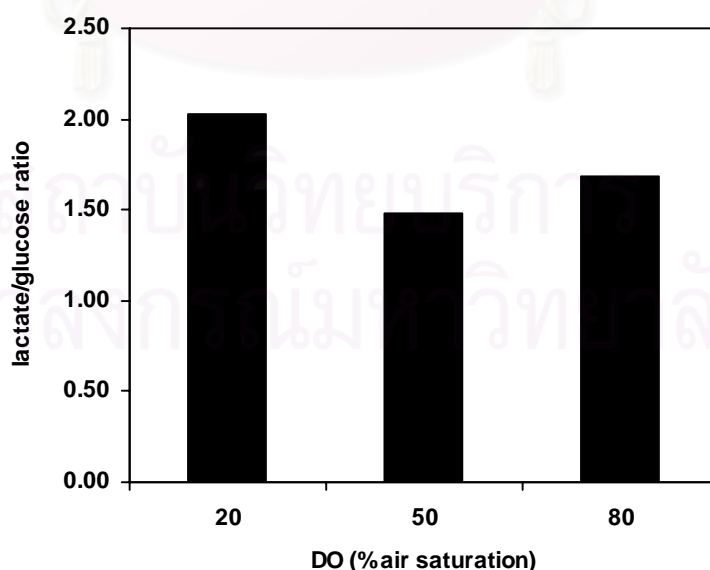


รูปที่ 4.6 ผลของค่า DO ต่อการผลิตแอมโมเนียและแลคเตทในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

4.3.4 ผลของ DO ต่อเมแทบอลิซึมของกลูโคสเมื่อเปลี่ยนไปเป็นแลคเตต

กลูโคสจัดเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับเซลล์ การเปลี่ยนรูปของกลูโคสไปเป็นแลคเตต เป็นสิ่งที่จะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากกลูโคส โดยคำนวณเป็นค่าสัดส่วนของแลคเตตต่อกลูโคส หาได้จากความเข้มข้นของแลคเตต (มิลลิโมลาร์) ที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ ต่อความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิโมลาร์) ที่ใช้ไปในช่วงเวลาเท่ากัน สำหรับค่าสัดส่วนนี้ จะมีค่าตามทฤษฎีปริมาณสารสัมพันธ์สูงสุดเท่ากับ 2.00 หากกลูโคสทั้งหมดเปลี่ยนไปเป็นแลคเตต

จากการคำนวณหาค่าสัดส่วนของแลคเตตต่อกลูโคสเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ภาวะต่างกัน พบว่า กลูโคสที่ใช้ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตต ทั้ง 3 ภาวะ แต่ด้วยสัดส่วนที่ต่างกัน ดังรูปที่ 4.7 สัดส่วนของแลคเตตต่อกลูโคส ที่ค่า DO 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 2.03, 1.48 และ 1.75 ตามลำดับ การที่สัดส่วนค่านี้ที่ DO 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 2.03 สูงกว่าค่าที่ได้จากทฤษฎี น่าจะเป็นเพราะแลคเตตส่วนหนึ่งอาจจะได้มาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูตามีน (Reitzer และคณะ, 1979) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ที่ DO 20 เปอร์เซ็นต์ กระตุ้นให้เซลล์มีเมแทบอลิซึมไปในทิศทางไม่ใช้ออกซิเจนมากกว่า การที่พบว่าสัดส่วนของแลคเตตต่อกลูโคสมีค่าสูง เนื่องจากในการเลี้ยงเซลล์สัตว์ กลูโคสที่ใช้ไปส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตต และมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่เข้าสู่วงจร TCA โดยกลไกของปรากฏการณ์ลักษณะเช่นนี้ยังไม่ปรากฏแน่ชัด (Ozturk และคณะ, 1990; Miller และคณะ, 1989; Reitzer และคณะ, 1979) สำหรับเซลล์ไฮบริดوما ENRO 44 นี้ ก็เกิดปรากฏการณ์ในลักษณะเดียวกัน โดยที่กลูโคสส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตตอย่างมากที่ค่า DO ต่ำ ในขณะที่ค่า DO 50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสจะถูกเปลี่ยนมาเป็นแลคเตตน้อยที่สุด



รูปที่ 4.7 ผลของค่า Dissolved oxygen ต่อเมแทบอลิซึมของกลูโคส

4.3.5 การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 จากการเลี้ยงระบบ batch

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อควบคุมค่า DO คงที่ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงเซลล์ระบบ batch ใน stirred-tank bioreactor จะให้ผลการเลี้ยงเซลล์ที่ดีที่สุด จากการติดตามการดำเนินงานพบว่าลักษณะการเจริญเป็นดังนี้ เซลล์จะมีการเจริญในระยะแลค ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก โดยที่เซลล์มีชีวิตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ จาก 1.30×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 1.79×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเข้าสู่ระยะเอกซ์โปเนนเชียล ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มจำนวนด้วยอัตราที่สูงขึ้น จนถึงความเข้มข้นสูงสุด 9.21×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ คงที่ในช่วง 2 วันแรก จากนั้นก็เริ่มลดลงในช่วงท้ายระยะเอกซ์โปเนนเชียล อันเป็นผลมาจากการลดลงของสารอาหาร การสะสมของของเสีย ได้แก่ แลคเตต และแอมโมเนีย ในขณะที่เซลล์มีชีวิตมีความเข้มข้นสูงสุด เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกลับเริ่มลดลงเหลือประมาณ 79.5 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าเซลล์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 1.22×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อถึง 4 วัน แต่เซลล์มีชีวิตกลับลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันหลัง และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน จนกระทั่งเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 ของการเลี้ยงเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์มีชีวิตในช่วง 2 วันแรก เท่ากับ 0.76 ต่อวัน ดังรูปที่ 4.9

การเพิ่มขึ้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีลักษณะที่สอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ทั้งหมด ความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงที่เซลล์เจริญในระยะ lag จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นถึงความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 67.33 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 3 วัน ส่วนปริมาณกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรก จากประมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร และลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 2.30 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ของเสีย 2 ชนิด ได้แก่ แลคเตตและแอมโมเนียสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมีค่าคงที่เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน เท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตร และ 2.13 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เนื่องจากเซลล์มีชีวิตเริ่มลดจำนวนลงจนกระทั่งตายทั้งหมด สำหรับความเข้มข้นแลคเตตที่เกิดขึ้นมา เท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตร ยังไม่ถึงระดับที่จะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา แต่ความเข้มข้นของแอมโมเนีย เริ่มจะสูงจนถึงระดับที่เริ่มส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์แล้ว

เมื่อควบคุมค่า DO ที่ 20 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จะมีรูปแบบการเจริญ การผลิตแอนติบอดี การเปลี่ยนแปลงกลูโคสและของเสีย ที่คล้ายคลึงกัน ดังรูปที่ 4.8-4.10 ค่าทางจุลศาสตร์ของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ในระยะเอกซ์โปเนนเชียล แสดงดังตารางที่ 4.2

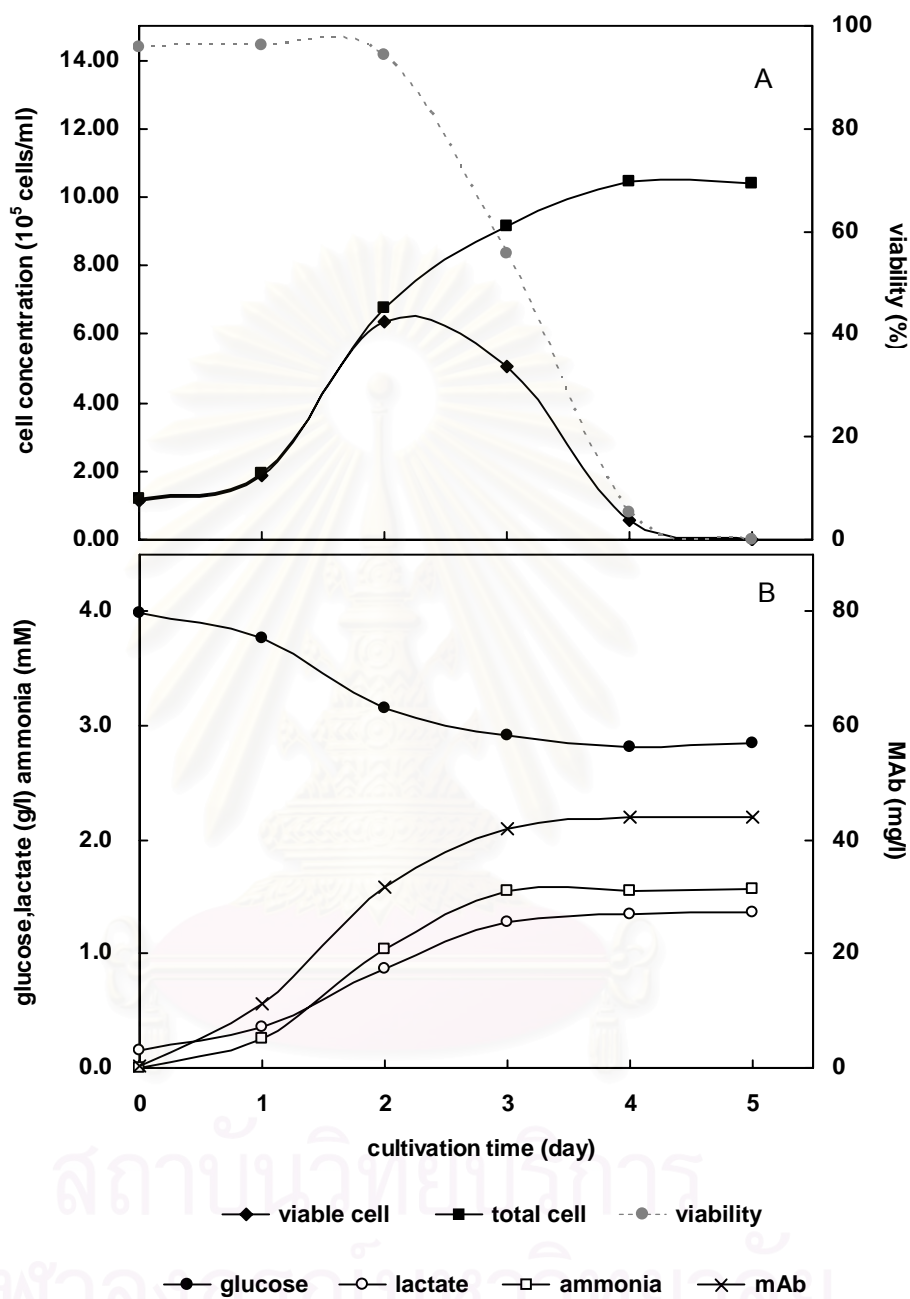
จากผลการศึกษาเปรียบเทียบ พบว่าค่า DO มีอิทธิพลต่อการเจริญ การผลิตแอนติบอดี การใช้กลูโคสและการเกิดของเสียของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 จากผลการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านมา สรุปได้ว่า การควบคุมการละลายของออกซิเจนที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการเลี้ยงเซลล์ที่มี

ประสิทธิภาพที่สุด ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.21×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) จะมีค่าต่ำกว่า แต่ความเข้มข้นเซลล์กลับเพิ่มขึ้นได้สูงกว่าอีก 2 ภาวะ มีอัตราการผลิตแอนติบอดีจำเพาะสูงสุด และให้แอนติบอดีความเข้มข้น 67.33 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น productivity ของผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 11.22 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน มีอัตราการใช้กลูโคสและการผลิตแลคเตตจำเพาะสูงสุด แต่ก็มีภาระสะสมของของเสีย 2 ชนิดสูงสุดด้วย

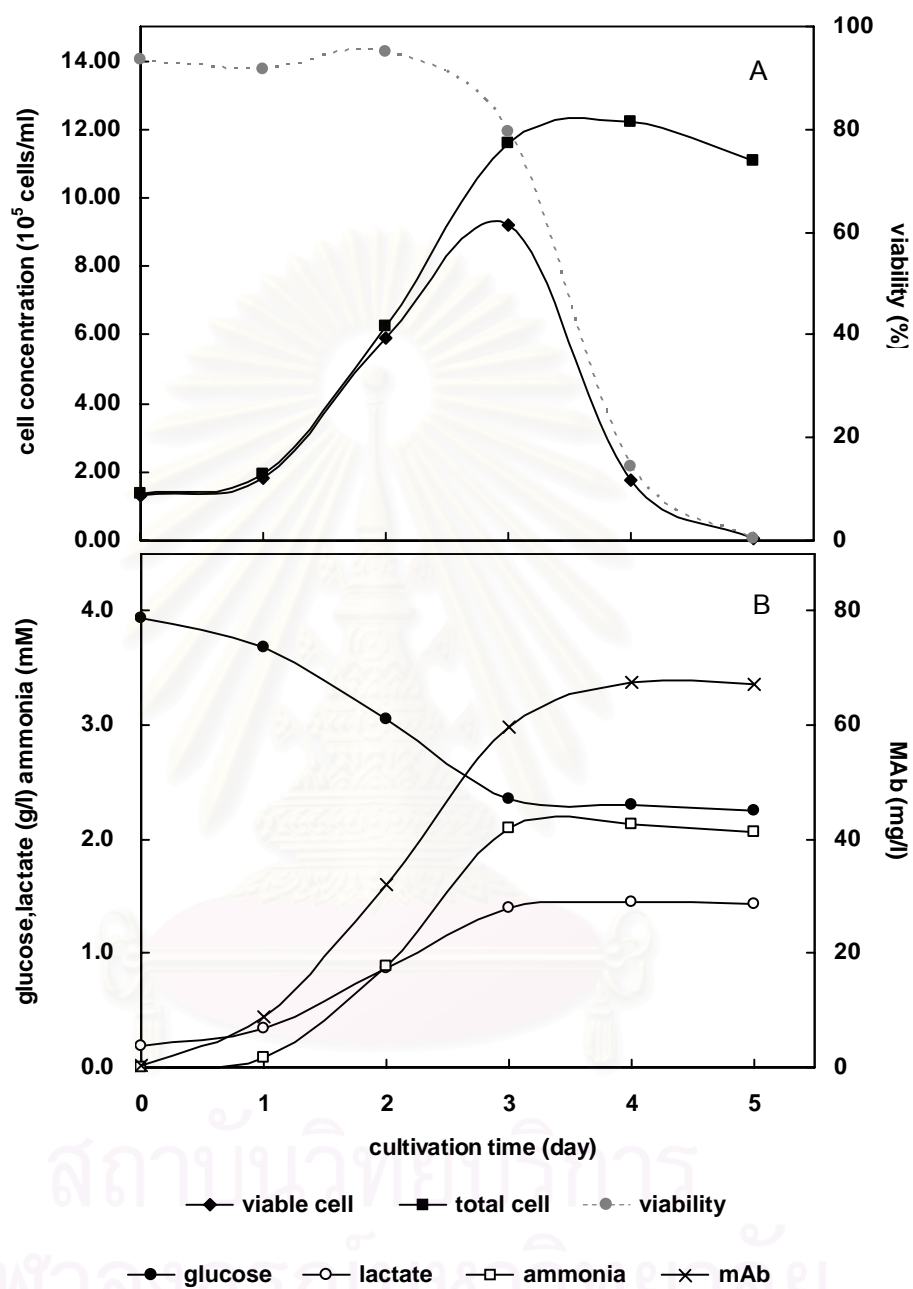
แต่กระนั้น จากผลการเลี้ยงเซลล์แบบ batch พบว่าระยะเวลาการดำเนินงานจำกัดอยู่ที่ 5 วัน แล้วเซลล์ไฮบริโดมาก็จะตายจนหมด เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เพียง 2 วัน จากนั้นก็เริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้ จึงได้ปรับการเลี้ยงเซลล์มาเป็นระบบ Fed-batch เพื่อจะช่วยยืดอายุของเซลล์ และมีระยะเวลาที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงยาวนานขึ้น อันจะส่งผลต่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.2 ค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ batch ใน stirred-tank bioreactor เมื่อควบคุมค่า DO เท่ากับ 20 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์

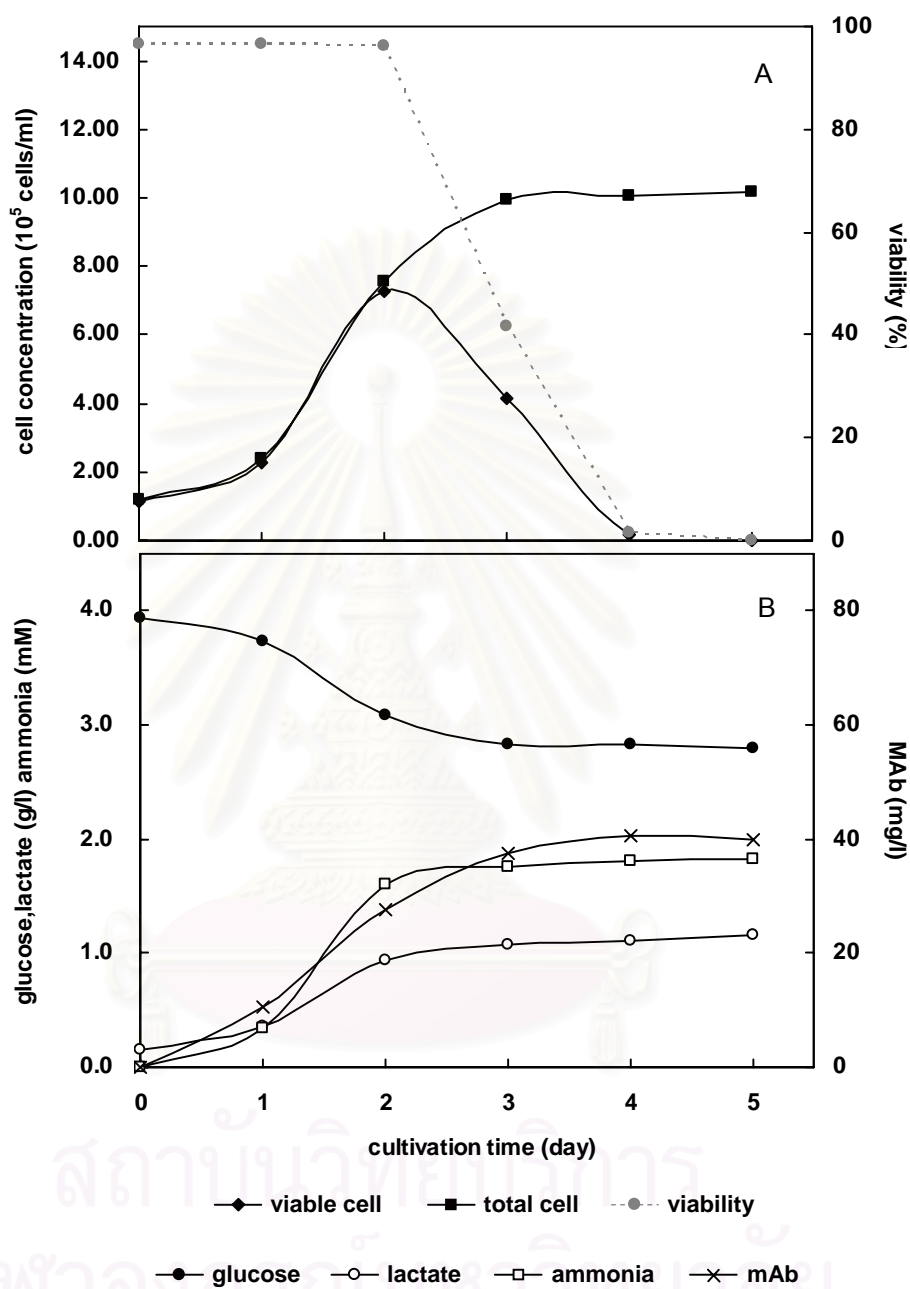
parameters	Dissolved Oxygen (% air saturation)		
	20	50	80
เซลล์มีชีวิตสูงสุด (เซลล์/มล.)	6.36×10^5	9.21×10^5	7.29×10^5
เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มล.)	1.04×10^6	1.22×10^6	1.02×10^6
อัตราการเจริญจำเพาะ (/วัน)	0.87	0.76	0.86
แอนติบอดี (มก./ล.)	44.03	67.33	40.51
อัตราการผลิตแอนติบอดีจำเพาะ (นก./เซลล์/วัน)	24.61	26.80	18.77
อัตราการผลิตต่อหน่วย (มก./ล./วัน)	7.34	11.22	6.75
กลูโคสที่เหลือ (ก./ล.)	2.82	2.25	2.79
อัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ (นาโนกรัม/เซลล์/วัน)	0.66	0.75	0.59
แลคเตต (ก./ล.)	1.37	1.44	1.15
อัตราการผลิตแลคเตตจำเพาะ (นาโนกรัม/เซลล์/วัน)	0.57	0.58	0.55
แอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์)	1.56	2.13	1.82
เมแทบอลิซึมของกลูโคส (โมลต่อโมล)	2.03	1.48	1.75
ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ (วัน)	5	5	5



รูปที่ 4.8 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 20 % air saturation (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี



รูปที่ 4.9 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริดوما ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 50 % air saturation (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี



รูปที่ 4.10 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor แบบ batch ควบคุมค่า dissolved oxygen เท่ากับ 80 % air saturation (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี

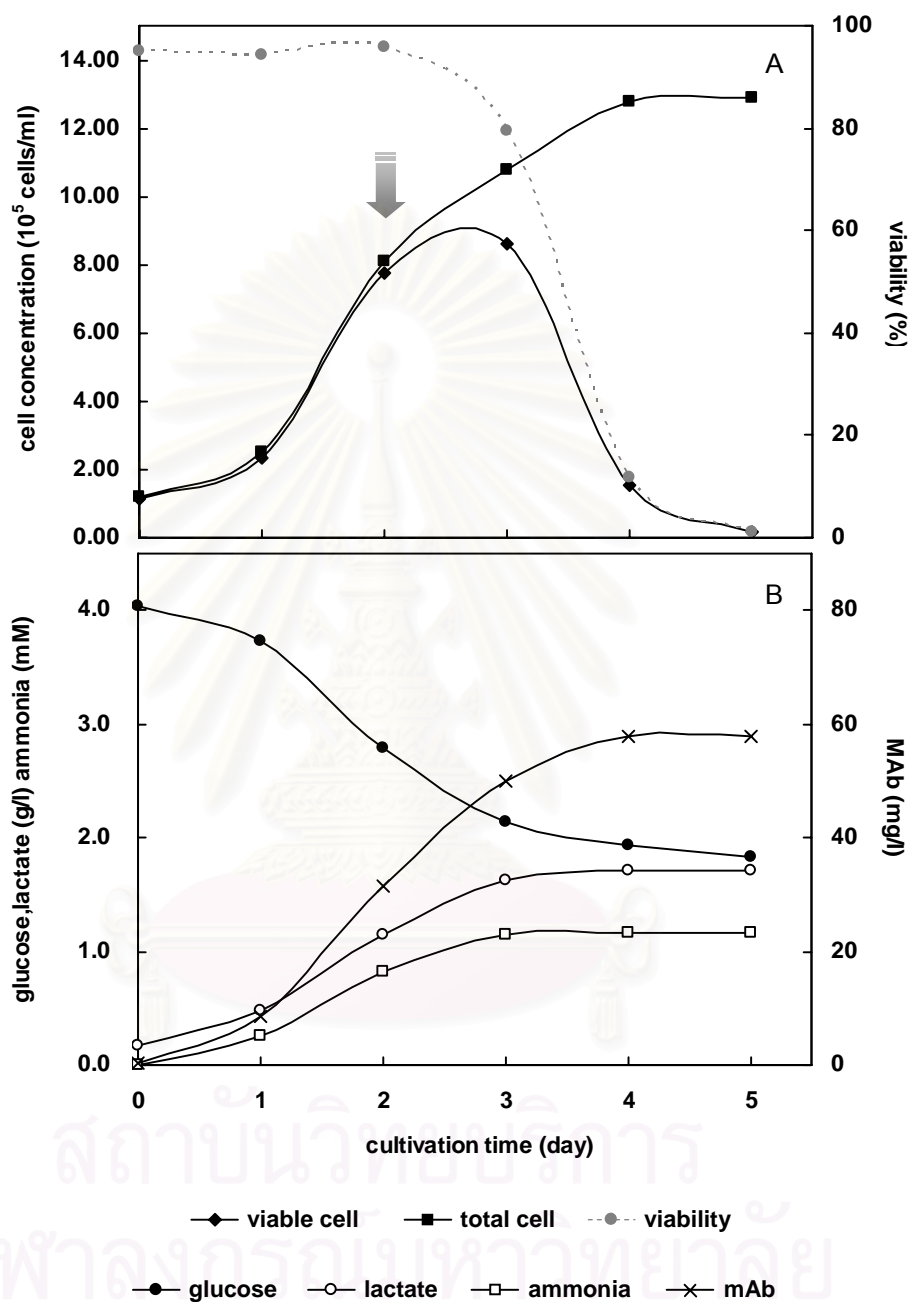
4.4 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ fed-batch ใน stirred-tank bioreactor

ศึกษาผลของการเติมสารอาหารหลักชนิดใดชนิดหนึ่ง ในระยะที่เซลล์ยังมีการเจริญอย่างเต็มที่ โดยที่หลังจากถ่ายเซลล์ตั้งต้นลงในถังแล้วดำเนินการเลี้ยงเซลล์ไปได้ระยะหนึ่ง จะมีการเติมสารอาหารจำเป็นบางชนิดเพิ่มลงไป การพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหาร โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญของเซลล์ในระบบ batch ซึ่งพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน เซลล์ไฮบริโดมายังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงและเซลล์มีชีวิตยังคงเพิ่มจำนวนอยู่ ดังนั้นจึงเลือกที่จะทำการเติมอาหารแก่เซลล์ในวันที่ 2 ของการเลี้ยง สารอาหารที่เติมให้แก่เซลล์ในแต่ละการทดลอง ได้แก่ ซีรัม, กลูโคส, กลูตามีน และ กลูโคสร่วมกับกลูตามีน โดยควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนคงที่ เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

4.4.1 ผลของการเติมซีรัมต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์

การศึกษาผลของการเติมซีรัมต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 พบว่า เซลล์จะมีการเจริญในระยะ lag ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นเข้าสู่ระยะเอกซ์โปเนนเชียล เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตคงที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 2 วันแรก ณ เวลานั้น จึงเติมซีรัมปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ตำแหน่งลูกศรชี้ลงในรูปที่ 4.11) เซลล์มีการเจริญจนถึงความเข้มข้นสูงสุด 8.59×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน ในขณะที่เซลล์มีชีวิตมีความเข้มข้นสูงสุด เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกลับเริ่มลดลงเหลือประมาณ 79.5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ทั้งหมดจะสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 1.29×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน แต่เซลล์มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 3 วันแล้ว และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน จนกระทั่งเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มขึ้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีลักษณะที่สอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ทั้งหมด ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆในช่วงที่เซลล์เจริญในระยะ lag จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นถึงความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 57.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรก จากประมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร และลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 1.80 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ของเสีย 2 ชนิดได้แก่ แลคเตตและแอมโมเนียสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆและเริ่มมีค่าคงที่เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน เท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร และ 1.16 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่สูงถึงระดับที่เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ ดังรูปที่ 4.11

มีรายงานการศึกษาผลของการเติมซีรัมหรืออินซูลิน ระหว่างการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา พบว่าสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ระบบ batch และยืดระยะเวลาเจริญในช่วงเอกซ์โปเนนเชียลของเซลล์ออกไปได้ (Doverskog และคณะ, 1997) จากการทดลองพบว่าได้ผลต่างไปจากรายงานของ Doverskog นั่นคือ ไม่สามารถยืดระยะเวลาการเจริญของเซลล์ได้มาก



รูปที่ 4.11 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริดوما ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมซีรัม 100 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี

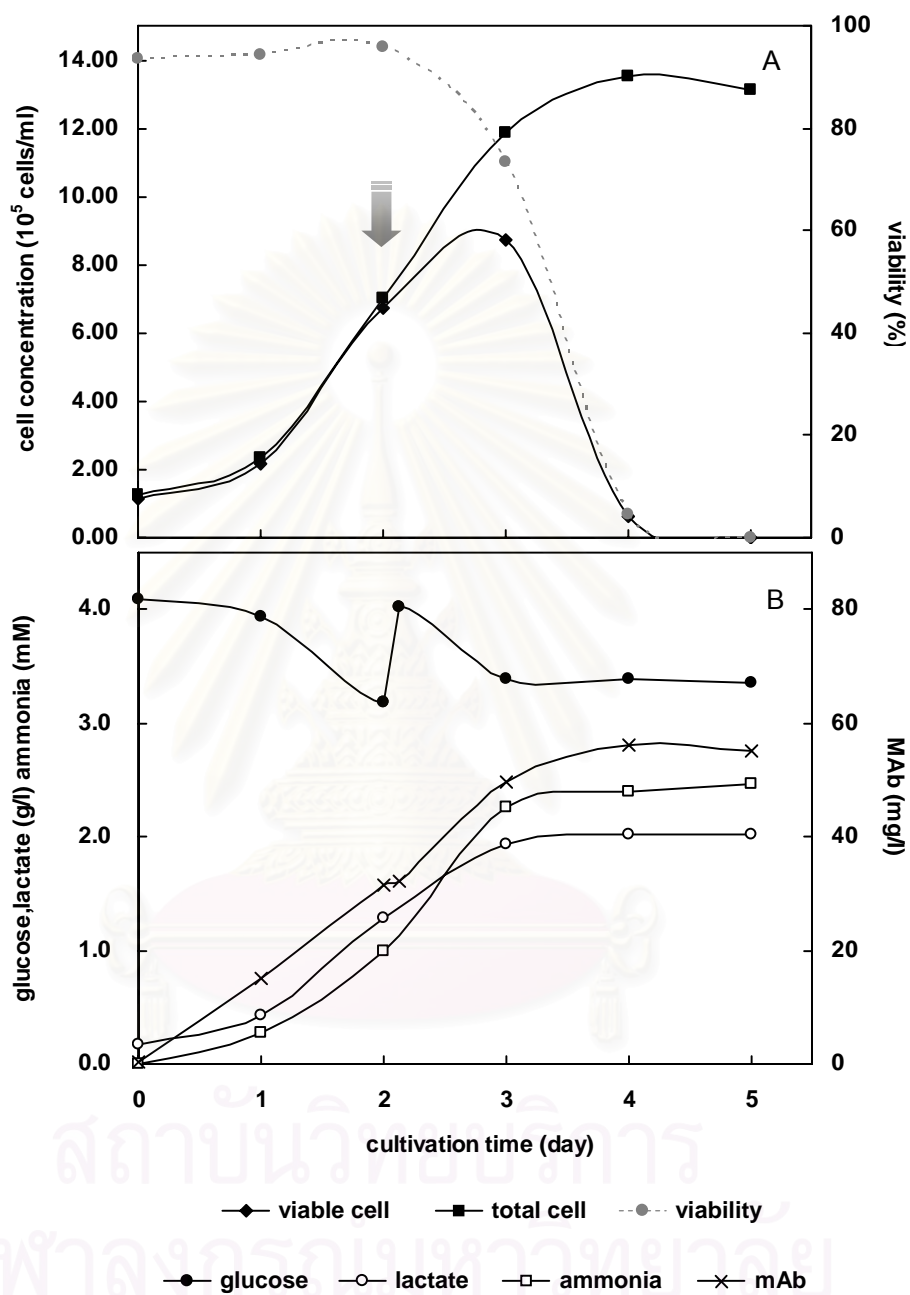
กว่าการเลี้ยงระบบ batch ความเข้มข้นเซลล์และแอนติบอดีไม่ได้สูงขึ้นกว่าเดิม และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตก็ยังคงลดลงหลังจากเลี้ยงได้ 2 วันเช่นเดิม แสดงว่า การลดลงของเซลล์มีชีวิตไม่ได้มีสาเหตุจากการขาดสารจำเป็นที่มีอยู่ในซีรัม

4.4.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์

จากการที่กลูโคส จัดเป็นสารอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์ และจะกลายมาเป็นปัจจัยที่จำกัดการเจริญและการผลิตแอนติบอดีเมื่อเลี้ยงได้ระยะหนึ่ง (Reuveny และคณะ, 1986) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของการเติมกลูโคสในระหว่างระยะการเจริญของเซลล์ ที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

หลังจากที่เซลล์มีการเจริญเข้าสู่ระยะเอกซิปโนแนทียล มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตคงที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 2 วันแรก แล้วจึงเติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นในถังเพิ่มกลับขึ้นมาเป็น 4 กรัมต่อลิตร (ตำแหน่งลูกศรชี้ลงในรูปที่ 4.12) เซลล์มีการเจริญจนถึงความเข้มข้นสูงสุด 8.70×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกลับเริ่มลดลงเหลือประมาณ 73.3 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ทั้งหมดจะสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 1.31×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน แต่เซลล์มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 3 วันแล้ว และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตก็ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 56.24 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 วันแรก จากประมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร ลงมาเหลือ 3.18 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมให้กลับมีความเข้มข้นเป็น 4.00 กรัมต่อลิตรเช่นเดิมแล้ว กลูโคสก็ถูกใช้ไปจนลดลงมาเหลือ 3.36 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านไป 5 วัน ส่วนแลคเตตและแอมโมเนียสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆและเริ่มมีค่าคงที่เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน เท่ากับ 2.03 กรัมต่อลิตร 2.46 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดนี้สูงถึงระดับที่เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลที่ได้พบว่าการเติมกลูโคสมีผลเพิ่มการเกิดแลคเตตให้สูงขึ้นเทียบกับระบบ batch และยังเพิ่มการเกิดแอมโมเนียได้อีกด้วย ลักษณะการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.12

จากการทดลองสรุปได้ว่า การรักษาภาวะความเข้มข้นของกลูโคสที่ระดับ 4.00 กรัมต่อลิตร ไม่อาจยุติระยะการเลี้ยงเซลล์ได้ ความเข้มข้นของเซลล์และแอนติบอดียังคงใกล้เคียงกับระบบ batch ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงได้เพียง 2 วันเช่นเดิม นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นการเกิดของเสียทั้ง 2 ชนิดอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แลคเตตซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของกลูโคสโดยตรง



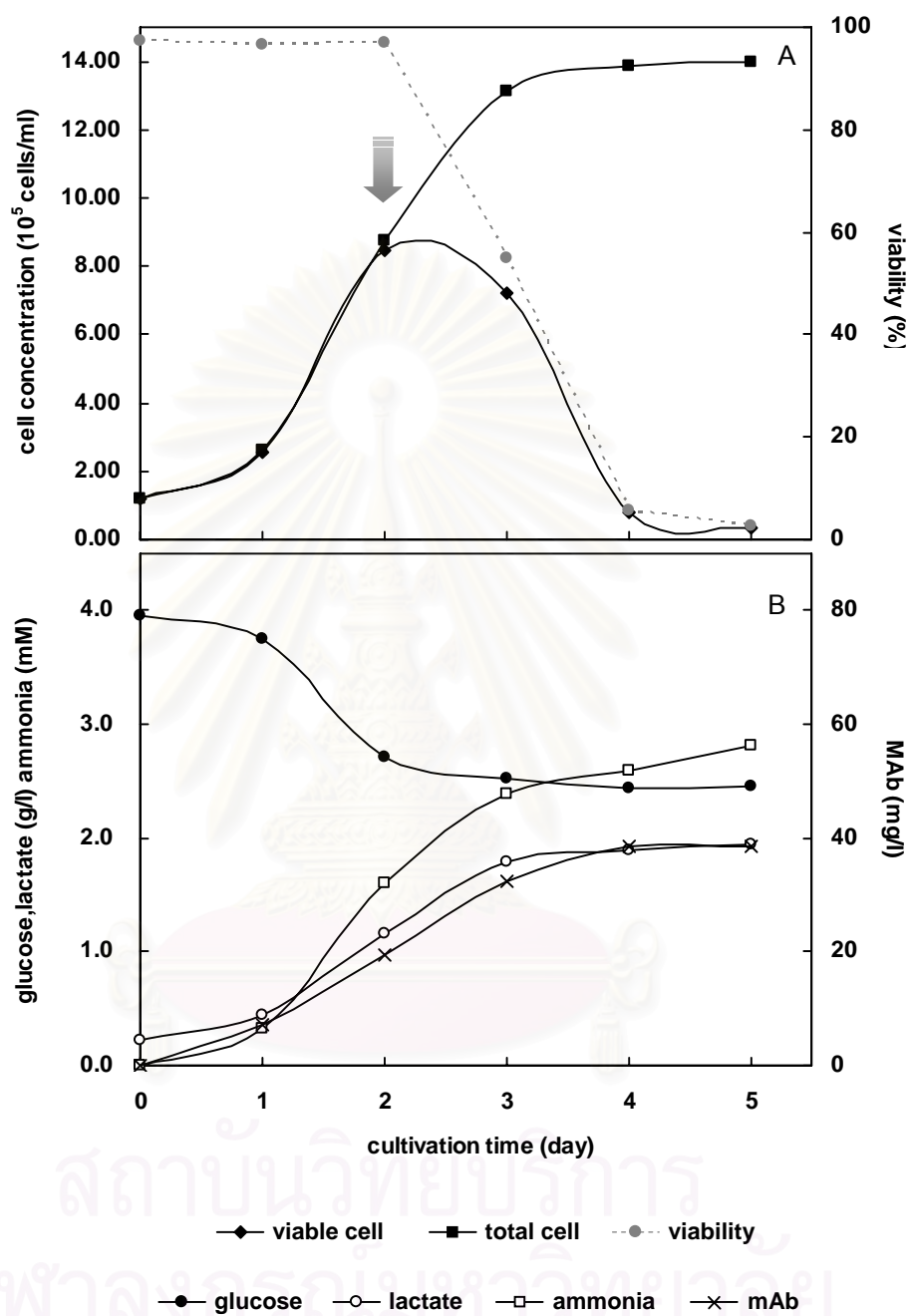
รูปที่ 4.12 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมกลูโคสให้กลับเป็น 4 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี

4.4.3 ผลของการเติมกลูตามีนต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์

กลูตามีนจัดเป็นสารอาหารหลักที่สำคัญต่อการเจริญของเซลล์เช่นกัน เซลล์จะใช้กลูตามีนทั้งเป็นแหล่งพลังงานและใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ และอาจเป็นปัจจัยที่จำกัดต่อการเจริญของเซลล์ (Reuveny และคณะ, 1986) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของการเติมกลูตามีนในระหว่างระยะการเจริญของเซลล์ ที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

เซลล์มีการเจริญระยะเอกซิปโนแนทียล และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตคงที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 2 วันแรก แล้วจึงเติมกลูตามีนให้มีความเข้มข้นในถังเพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 0.4 กรัมต่อลิตร (ตำแหน่งลูกศรชี้ลงในรูปที่ 4.13) แต่เซลล์มีการเจริญจนถึงความเข้มข้นสูงสุด 8.49×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 2 วันแรก และภายหลังจากเติมกลูตามีนแล้ว เซลล์มีชีวิตกลับมีความเข้มข้นลดลงเหลือ 7.22×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตก็ลดลงเหลือประมาณ 55.0 เปอร์เซ็นต์ ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับระบบ batch จำนวนเซลล์มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงได้เพียง 2 วันเท่านั้น เซลล์ทั้งหมดจะสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 1.40×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 5 วัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความเข้มข้นสูงสุดเพียง 38.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับระบบ batch เซลล์ใช้กลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรก ความเข้มข้นลดลงจากประมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 2.45 กรัมต่อลิตร และคงที่ตั้งแต่เริ่มต้น แลคเตตและแอมโมเนียสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆและเริ่มมีค่าคงที่เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน เท่ากับ 1.93 กรัมต่อลิตร 2.82 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นของแลคเตตยังไม่ถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงเกินจากระดับที่เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว จากการเปรียบเทียบกับระบบ batch ลักษณะการเจริญและเมแทบอลิซึม ผลการทดลองที่ได้ พบว่าการเติมกลูตามีนมีผลในการเพิ่มการเกิดแอมโมเนียให้สูงขึ้นอย่างมาก และยังเพิ่มการเกิดแลคเตตได้อีกด้วย ดังรูปที่ 4.13

จากการทดลองสรุปได้ว่า การเติมกลูตามีนให้กลับมามีความเข้มข้นสูงขึ้น ไม่อาจยืดระยะการเลี้ยงเซลล์ได้ ความเข้มข้นของเซลล์ยังคงใกล้เคียงกับระบบ batch ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงได้เพียง 2 วันเช่นเดิม และยังเร่งการตายของเซลล์ให้เกิดขึ้น ที่สำคัญแอนติบอดีที่ได้มีความเข้มข้นลดลงจากเดิมกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นการเกิดของเสียทั้ง 2 ชนิดอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระตุ้นการเกิดแอมโมเนียซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ของกลูตามีนโดยตรง



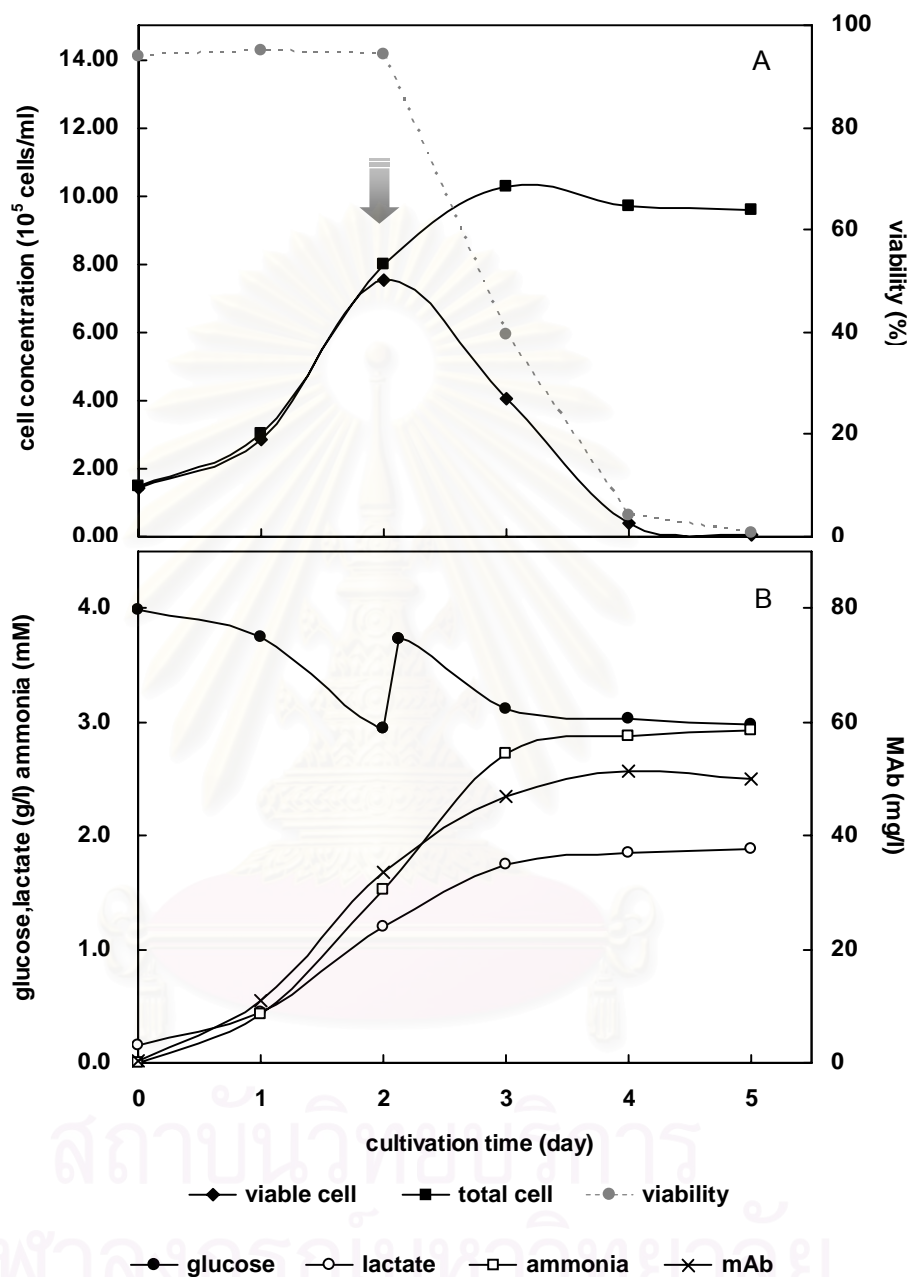
รูปที่ 4.13 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริดوما ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมกลูตามีน 0.4 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี

4.4.4 ผลของการเติมกลูโคสและกลูตามีนร่วมกันต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์

ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาผลของการเติมกลูโคสร่วมกับกลูตามีนในระหว่างระยะการเจริญของเซลล์ ที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

เซลล์มีการเจริญอย่างต่อเนื่อง จนถึงความเข้มข้นสูงสุด 7.54×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตคงที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 2 วันแรก จากนั้นหลังจากเติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นในถังเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4 กรัมต่อลิตร และกลูตามีนให้เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม 0.2 กรัมต่อลิตร (ตำแหน่งลูกศรชี้ลงในรูปที่ 4.14) พบว่าเซลล์มีชีวิตกลับลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 4.05×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตก็ลดลงเหลือประมาณ 39.5 เปอร์เซ็นต์ ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับระบบ batch เซลล์มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงได้เพียง 2 วันเท่านั้น ไมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความเข้มข้นสูงสุดเพียง 51.42 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นลดลงเมื่อเทียบกับระบบ batch เซลล์ใช้กลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรก ความเข้มข้นลดลงจากประมาณ 4.00 กรัมต่อลิตร เหลือ 2.94 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมให้กลับเป็น 4.00 กรัมต่อลิตรแล้ว กลูโคสก็ถูกใช้จนลดลงมาเหลือ 2.97 กรัมต่อลิตร ส่วนแลคเตตและแอมโมเนียสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งมีความเข้มข้น 1.89 กรัมต่อลิตร 2.93 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ระดับความเข้มข้นของแลคเตตยังไม่ถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงเกินจากระดับที่เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว จากผลการทดลอง พบว่าการเติมสารอาหารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน มีผลเพิ่มการเกิดทั้งแลคเตตและแอมโมเนียให้สูงขึ้นอย่างมาก เทียบกับระบบ batch ลักษณะการเจริญและเมแทบอลิซึมแสดงดังรูปที่ 4.14

จากการทดลองสรุปได้ว่า การเติมทั้งกลูโคสและกลูตามีนร่วมกัน ไม่อาจยืดระยะการเลี้ยงเซลล์ได้ ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงได้เพียง 2 วันเช่นเดิม ให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงระบบ batch และยิ่งเร่งการตายของเซลล์ให้เกิดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นการเกิดของเสียทั้งแลคเตตและแอมโมเนียด้วย แอนติบอดีที่ได้มีความเข้มข้นลดลงจากเดิมอันเนื่องมาจากการที่มีเซลล์มีชีวิตลดลงทั้งยังมีของเสียในระดับสูง



รูปที่ 4.14 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริดوما ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch โดยการเติมกลูโคสและกลูตามีน 2.0 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เมื่อเลี้ยงเซลล์ระบบ fed-batch

	batch	fed-batch			
		ซีรัม	กลูโคส	กลูตามีน	กลูโคส- กลูตามีน
เซลล์มีชีวิตสูงสุด (เซลล์/มล.)	9.21×10^5	8.59×10^5	8.70×10^5	8.49×10^5	7.86×10^5
เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มล.)	1.22×10^6	1.29×10^6	1.35×10^6	1.40×10^6	1.03×10^6
แอนติบอดี (มก./ล.)	67.33	57.97	56.24	38.57	51.42
กลูโคสที่เหลือ (ก./ล.)	2.25	1.83	3.18	2.44	2.94
แลคเทต (ก./ล.)	1.44	1.72	2.03	1.93	1.89
แอมโมเนีย (มิลลิโมลาร์)	2.13	1.16	2.46	2.82	2.93
ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ (วัน)	5	5	5	5	5
productivity (มก./ล./วัน)	13.47	11.59	11.25	7.71	10.28

จากผลการเลี้ยงเซลล์ระบบ Fed-batch ทั้ง 4 แบบ พบว่ายังไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ทั้งความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของแอนติบอดีได้ และยังมี productivity ต่ำกว่าระบบ batch อยู่ สาเหตุน่าจะเป็นเพราะสารอาหารหลายชนิดที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดซึ่งไม่ได้ตรวจติดตาม อาจถูกใช้จนหมด และระดับของเสียได้แก่แลคเทตและแอมโมเนีย มีการสะสมเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอนติบอดี

ดังนั้นจึงได้ปรับระบบการเลี้ยงเซลล์จาก Batch และ fed-batch เป็นระบบ perfusion เพื่อให้การเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ได้รับอาหารใหม่และมีการเจือจางเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งน่าจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญได้ยาวนานขึ้น และอาจทำให้ความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

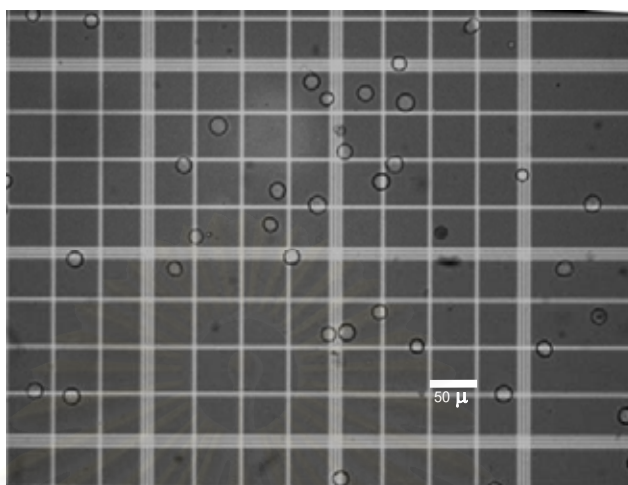
4.5 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมา

การศึกษาการกระจายตัวของขนาดเซลล์ไฮบริโดมา โดยใช้วิธีวัดขนาดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับขนาดของ grid line บน hemacytometer ใช้เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue เพื่อแยกเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ดังรูปที่ 4.15 เซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาวัดขนาด ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ในถังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน หลังจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ แล้วเทียบเป็นสัดส่วนกับช่องบน hemacytometer แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของทั้งเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายโดยโปรแกรม SPSS พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตมีขนาดกระจายตัวอยู่ในช่วง 8.75-26.25 ไมโครเมตร คิดเป็นค่าเฉลี่ย 16.67 ± 2.20 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ตายจะมีขนาดโดยเฉลี่ย 15.39 ± 2.21 ไมโครเมตร เล็กกว่าเซลล์มีชีวิตเล็กน้อย

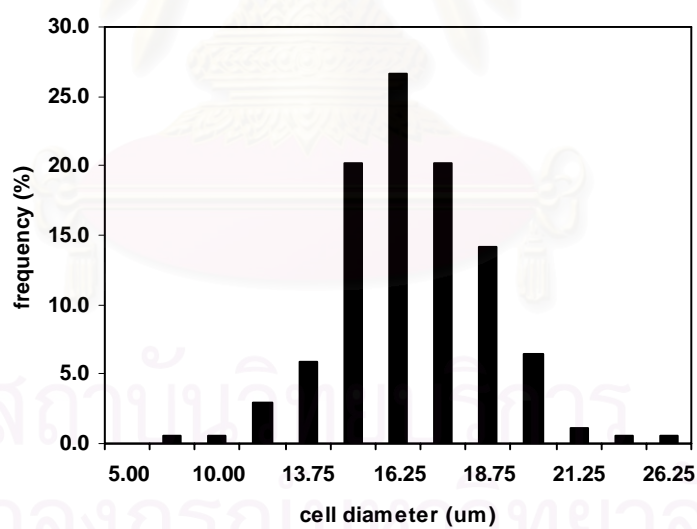
เมื่อนำขนาดเซลล์มาเปรียบเทียบกับขนาดรูพรุนของ spin filter ซึ่งมีขนาดสม่ำเสมอเท่ากับ 20 ไมโครเมตร พบว่ามีสัดส่วนขนาดรูพรุนต่อขนาดเซลล์ (porosity) เท่ากับ 1.20 ค่า porosity ที่สูงกว่า 1.00 เล็กน้อยนี้ เป็นสัดส่วนที่ถือว่าเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion หากค่านี้ต่ำกว่า 1 นั้นแสดงว่าเซลล์มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุน ถึงเซลล์จะไม่หลุดรอดออกมาได้ในขณะที่ดำเนินการ และสามารถกักกันเซลล์ได้สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ แต่กลับจะทำให้เกิดการอุดตันของ filter ได้เมื่อดำเนินการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลาสั้น ในขณะที่หากค่า porosity มีค่าสูงเกินไปก็จะลดประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ลง ส่งผลให้สูญเสียเซลล์ไปในระหว่างดำเนินการมากเกินไป จากการที่เซลล์ตายมีขนาดที่เล็กกว่าเซลล์มีชีวิตเล็กน้อย ส่งผลให้สัดส่วนขนาดรูพรุนต่อขนาดเซลล์ (porosity) มีค่าสูงกว่าเซลล์มีชีวิต โอกาสที่เซลล์ตายจะหลุดลอด spin filter ออกมาพร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์มีสูงกว่า นั้นแสดงให้เห็นว่า spin filter อาจมีคุณสมบัติในการคัดกรองเซลล์ตายออกจากเซลล์มีชีวิตได้ แม้ว่าจะไม่ได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แบบก็ตาม

ตารางที่ 4.4 ขนาดของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 มีชีวิตและเซลล์ตาย

	ขนาดเซลล์เฉลี่ย (μm)	ช่วงขนาดของเซลล์ (μm)	porosity
เซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิต	16.67 ± 2.20	8.75-26.25	1.20
เซลล์ตาย	15.39 ± 2.21	10.00-20.00	1.30



รูปที่ 4.15 การวัดขนาดเซลล์ไฮบริโดมาผ่านกล้องจุลทรรศน์ เทียบกับขนาดของ grid line บน hemacytometer



รูปที่ 4.16 ลักษณะการกระจายตัวของขนาดเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ที่มีชีวิต

4.6 ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter (retention capacity)

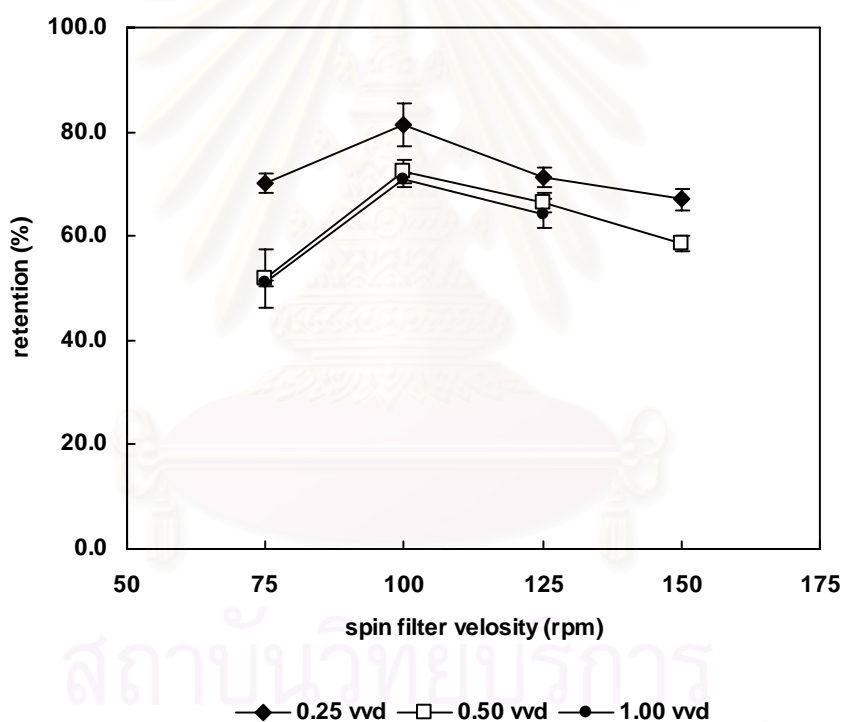
spin filter เป็นอุปกรณ์กักกันเซลล์ชนิดหนึ่งใช้สำหรับการเลี้ยงเซลล์สัตว์ในลักษณะแขวนลอยในระบบ perfusion ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter ขึ้นกับหลายปัจจัย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินการเลี้ยงเซลล์ได้แก่ ความเร็วรอบของ spin filter และ perfusion rate รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการกักกันเซลล์ส่วนใหญ่ กระทำโดยใช้เซลล์หรือใช้ bead เป็นตัวแทน ซึ่งมีความหลากหลายของตัวแปร ทำให้มีข้อสรุปที่แตกต่างกันในรายงานแต่ละฉบับ (Fenge และคณะ, 1991; Siegel และคณะ, 1991; Jan และคณะ, 1992; Yabannavar และคณะ, 1992; Iding และคณะ., 2000) ด้วยเหตุนี้ จึงได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter ที่ขึ้นกับปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ ความเร็วรอบของ spin filter และ perfusion rate

การศึกษาประสิทธิภาพในการกักกันเซลล์ของ spin filter ได้แปรค่าปัจจัยที่สำคัญ 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราการหมุนของ spin filter ที่ 50, 75, 100, 125 และ 150 รอบต่อนาที (คิดเป็นความเร็วเชิงเส้นเท่ากับ 0.15, 0.23, 0.30, 0.38 และ 0.46 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ) และอัตราการหมุนเวียนอาหารผ่าน spin filter (perfusion rate) ที่ 0.25, 0.50 และ 1.00 vvd ในลักษณะ recycle loop เพื่อรักษาปริมาตรให้คงที่ ในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ไฮบริโดมาทำหน้าที่เป็นอนุภาคสำหรับการศึกษาโดยตรง โดยเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เซลล์เจริญจนเต็มที่และจำนวนเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงก่อนเริ่มศึกษา ทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมปัจจัยเรื่องความเข้มข้นของเซลล์ให้คงที่ ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

เมื่อกำหนด perfusion rate ให้อยู่ที่ 0.25 vvd ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์เมื่อกำหนดความเร็วรอบ 75 รอบต่อนาที มีค่าเท่ากับ 70.2 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงขึ้นเมื่อกำหนดความเร็วรอบเป็น 100 รอบต่อนาที โดยให้การกักกันเซลล์สูงถึง 81.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 125 และ 150 รอบต่อนาที จะให้การกักกันเซลล์ลดลงเหลือ 71.4 และ 67.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการปรับ perfusion rate ให้สูงขึ้นเป็น 0.50 และ 1.00 vvd พบว่ารูปแบบการกักกันเซลล์มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน นั่นคือ ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์จะเกิดขึ้นสูงสุด เมื่อกำหนดความเร็วรอบเป็น 100 รอบต่อนาที เช่นกัน ดังรูปที่ 4.17 ผลการทดลองที่ได้นี้มีลักษณะในทิศทางเดียวกันกับรายงานของ Fenge และคณะ (1993) และ Iding และคณะ (2000) ที่รายงานว่าประสิทธิภาพการกักกันเซลล์จะดีที่สุด เมื่อเพิ่มความเร็วรอบ spin filter สูงจนถึงค่าหนึ่ง จากนั้นเมื่อความเร็วสูงขึ้น ความสามารถในการกักกันเซลล์จะลดลง เนื่องจากการที่เซลล์มีขนาดเล็กกว่าขนาดรูพรุนของ spin filter ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการกักกันเซลล์ คือ การเร่งความเร็วของ spin filter ให้สูงเพียงพอจนมีอิทธิพลเหนือกว่าแรงจาก perfusion แต่การใช้ความเร็วรอบที่สูงมากกลับให้ผลการกักกันเซลล์ลดลง การกักกันเซลล์อาศัย

แรงยกตัวและแรงเข้าสู่ศูนย์กลางที่สัมพันธ์กับ perfusion flow เมื่อความเร็วรอบสูงขึ้น แรงทั้ง 2 แรงนี้อาจจะเกิดความไม่สมดุลกับ perfusion flow รวมทั้งมีความปั่นป่วนของเซลล์สูงขึ้นจนอาจเป็นผลให้เซลล์หลุดรอดผ่าน spin filter ได้

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบที่ perfusion rate ต่างๆ พบว่า perfusion rate 0.25 vvd ให้ประสิทธิภาพดีกว่า perfusion rate 0.50 และ 1.00 vvd นอกจากนี้พบว่า ที่ perfusion rate สูงเท่ากับ 0.50 และ 1.00 vvd กลับให้ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน การที่ perfusion rate ต่ำให้การกักกันเซลล์ได้ดีกว่าเนื่องมาจากมีแรงดึงให้เกิดการไหลผ่านเข้าสู่ spin filter ที่ต่ำกว่า สอดคล้องกับรายงานของ Fenge และคณะ (1991) ที่พบว่าประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ จะไม่เปลี่ยนแปลงที่ perfusion rate ช่วงหนึ่ง โดยที่มีความเร็วรอบสูงมากกว่า 0.63 เมตรต่อวินาที



รูปที่ 4.17 ความเร็วรอบของ spin filter ต่อการกักกันเซลล์ เมื่อควบคุมความเร็วรอบคงที่ที่ 75, 100, 125 และ 150 รอบต่อนาที และควบคุม perfusion rate เท่ากับ 0.25, 0.50 และ 1.0 vvd แต่ละค่าได้จากการเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

4.7 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ perfusion ใน stirred-tank bioreactor

การเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ perfusion เป็นระบบการเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่อง มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของ peristaltic pump 2 เครื่อง ทำหน้าที่เปลี่ยนถ่ายอาหารระหว่างถังเก็บอาหารไฮบริโดมากับถังเลี้ยงเซลล์ และระหว่างถังเลี้ยงเซลล์กับถังเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ มีหลักการที่สำคัญ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บออกมานั้น จะเก็บผ่านอุปกรณ์กักกันเซลล์ spin filter เพื่อกรองให้ส่วนที่ผ่านอุปกรณ์เป็นส่วนที่ปราศจากเซลล์หรือมีเซลล์อยู่น้อยที่สุด ในขณะที่เซลล์ส่วนใหญ่จะยังคงอยู่ในถัง ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในถังจะคงที่ที่ 1.2 ลิตร เริ่มต้นการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ การปรับเป็นระบบ perfusion จากระบบ batch สิ่งที่สำคัญคือการเลือกจุดที่เหมาะสมก่อนที่ของเสียที่เกิดขึ้น ได้แก่ แลคเตตและแอมโมเนีย จะสะสมจนถึงระดับสูง ในขณะที่เซลล์มีชีวิตมีความหนาแน่นและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงอยู่ จากผลการเลี้ยงเซลล์ระบบ batch สรุปได้ว่า ตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุดที่จะเริ่มระบบ perfusion คือ หลังจากดำเนินการเลี้ยงเซลล์มาได้ 2 วัน เมื่อเซลล์ยังคงมีการเจริญต่อเนื่อง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตยังคงมีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และระดับของแอมโมเนียและแลคเตต ยังไม่สูงถึงระดับที่มีผลกระทบต่อเซลล์ การดำเนินงานในระบบ perfusion นี้ได้ศึกษาเป็น 2 รูปแบบ ดังต่อไปนี้

4.7.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ระบบ Semi-continuous perfusion

การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแบบ Semi-continuous perfusion ร่วมกับ spin filter เป็นวิธีการเลี้ยงเซลล์ที่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารแบบกึ่งต่อเนื่อง หลังจากเซลล์มีการเจริญได้ 2 วัน จึงเริ่มการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.18) ครั้งละ 100 มิลลิลิตร 1 ครั้งต่อวัน โดยนำอาหารเก่าออกผ่าน spin filter 100 มิลลิลิตรก่อน แล้วจึงเติมอาหารใหม่ลงสู่ถังในปริมาตรที่เท่ากัน หลังดำเนินการเลี้ยงเซลล์ได้ 10 วัน จึงยุติการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (ตำแหน่งลูกศรป่องในรูปที่ 4.18) พบว่าเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 มีการเจริญเป็นดังนี้

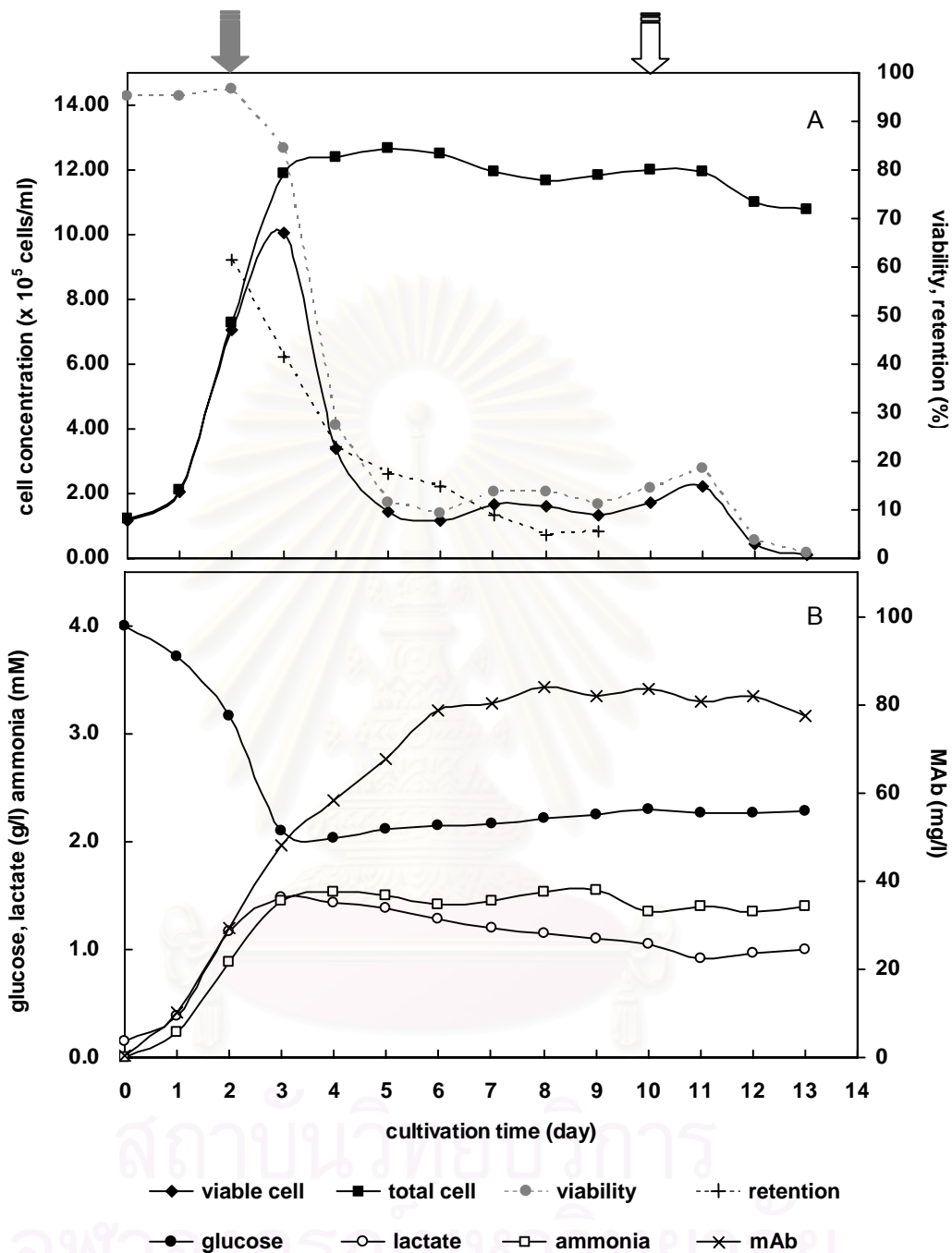
หลังจากเริ่มเปลี่ยนถ่ายอาหารในวันที่ 2 แล้ว พบว่าเซลล์ไฮบริโดมา มีความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตสูงขึ้นจนถึงค่าสูงสุด เท่ากับ 1.01×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สูงกว่าแบบ batch เล็กน้อย จากนั้นความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตเริ่มลดลง และคงที่ที่ความเข้มข้นประมาณ $1.00-2.00 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในช่วง 2 วันแรก และแม้จะมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารแล้ว ก็ไม่สามารถรักษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตให้สูงอยู่ได้นานกว่าเดิม พบว่าในช่วงเวลาถัดมาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องและมาคงที่ที่ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการกักกันเซลล์ของ spin filter พบว่า มีค่าลดลงจาก 61.6 เหลือ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ใน

ระยะเวลา 10 วัน ดังรูปที่ 4.18A สังเกตได้ว่าค่านี้นี้ลดลงทุกครั้งที่เปลี่ยนถ่ายอาหารแบบไม่ต่อเนื่อง จนความเข้มข้นของเซลล์ภายใน spin filter แทบจะเท่ากับเซลล์ภายในถัง หมายความว่าแทบจะไม่เกิดการกักกันเซลล์เลยเมื่อเลี้ยงเซลล์นานขึ้น ทำให้การใช้อุปกรณ์กักกันเซลล์ spin filter ไม่เกิดประโยชน์ นั่นแสดงให้เห็นว่าระบบการเลี้ยงเซลล์แบบ perfusion ร่วมกับการใช้ spin filter ไม่เหมาะสมกับวิธีการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous perfusion)

ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 3 วันแรกของการเลี้ยงเซลล์ จากนั้นความเข้มข้นจะคงที่ที่ 2.10-2.30 กรัมต่อลิตร จนถึงสิ้นสุดการดำเนินงาน ความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นพร้อมๆกับการเจริญของเซลล์ และยังคงเพิ่มขึ้นต่อไปในช่วงเวลา 6 วันแรก แม้ว่าเซลล์จะไม่เพิ่มจำนวนแล้ว จากนั้นความเข้มข้นจะคงที่ที่ประมาณ 80 กรัมต่อลิตร จนกระทั่งสิ้นสุดการดำเนินงาน คิดเป็นอัตราการผลิตต่อหน่วยเท่ากับ 6.82 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ความเข้มข้นของแอมโมเนียสะสมมากขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นคงที่ที่ 1.30-1.50 มิลลิโมลาร์ ส่วนความเข้มข้นของแลคเตต ก็เช่นกัน เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วัน จนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.49 กรัมต่อลิตร จากนั้น ความเข้มข้นเริ่มลดลงเรื่อยๆจนเหลือ 1.00 กรัมต่อลิตร ในช่วงท้าย อันเนื่องมาจากการเจือจางขณะที่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ดังรูปที่ 4.18B

จากผลการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous perfusion) ผ่าน spin filter พบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ เนื่องจากในขณะที่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารนั้น มีการดึงเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากถังผ่านทาง spin filter อย่างรวดเร็ว คิดเป็น perfusion rate ในขณะนั้นค่อนข้างสูง เกิดแรงดึงที่มีทิศทางการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ภายใน spin filter จนทำให้เซลล์หลุดผ่านเข้าสู่ spin filter อย่างมาก ความเร็วรอบที่ใช้ยังไม่เพียงพอสำหรับการกักกันเซลล์ ดังนั้น การเลี้ยงเซลล์ในการทดลองต่อไป จึงดำเนินการในระบบ continuous perfusion มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารเกิดขึ้นแบบต่อเนื่องตลอดเวลา ให้เกิดแรงดึงที่มีทิศทางเข้าสู่ภายใน spin filter น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ซึ่งน่าจะทำให้การกักกันเซลล์สมบูรณ์มากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ semi-continuous perfusion ผ่าน spin filter เปลี่ยนถ่ายอาหารวันละ 100 มิลลิลิตร (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ลูกศรทึบและโปร่งแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)

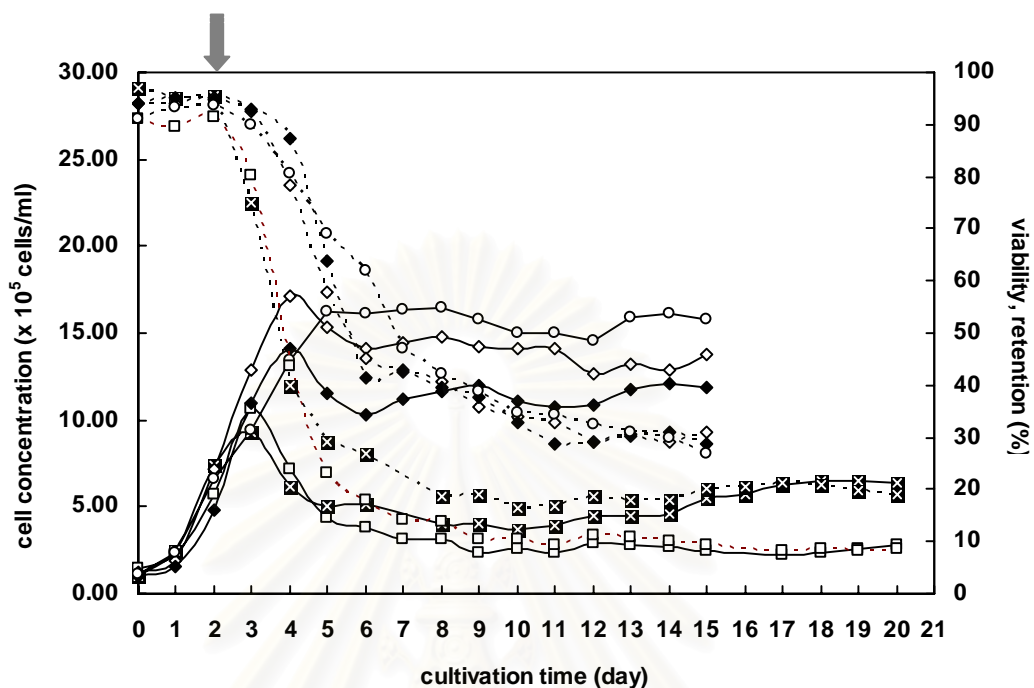
4.7.2 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาระบบ Continuous perfusion

การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ Continuous perfusion มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างต่อเนื่อง อาศัยการทำงานของ peristaltic pump 2 เครื่อง ที่ทำงานด้วยอัตราที่กำหนดไว้ โดยได้ศึกษาถึงผลของอัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหารผ่าน spin filter (perfusion rate) ที่มีต่อเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ในเรื่องต่างๆ กำหนด perfusion rate คงที่ 0.10, 0.20, 0.40 vvd โดยใช้อาหารที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และ perfusion rate 0.40 และ 0.8 vvd โดยใช้อาหารที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์

4.7.2.1 ผลของ perfusion rate และความเข้มข้นของซีรัมต่อการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44

จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ด้วยระบบ perfusion ที่กำหนด perfusion rate ค่าต่างๆ เริ่มระบบ perfusion หลังจากเลี้ยงเซลล์ได้เป็นเวลา 2 วัน (ตำแหน่งลูกศรชี้ลง) ติดตามเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ในแต่ละการทดลอง ได้ผลดังรูปที่ 4.19 พบว่าที่ perfusion rate 0.10 และ 0.20 vvd เซลล์มีลักษณะการเจริญคล้ายคลึงกัน มีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 1.00×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงได้ 3 วัน จากนั้นความเข้มข้นก็จะลดลงมาคงที่อยู่ในช่วง $2.30 - 3.10 \times 10^5$ และ $3.50 - 6.00 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ได้นาน 2 วัน จากนั้นจึงลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเพิ่ม perfusion rate เป็น 0.40 vvd พบว่าสามารถยืดระยะเวลาการเจริญของเซลล์ออกไปได้นาน 4 วัน ทำให้มีความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 1.72×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สูงกว่าระบบ batch ถึง 2 เท่า จากนั้นความเข้มข้นจึงลดลงมาคงที่ที่ $1.30 - 1.50 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ได้นานกว่านานถึง 3 วัน แล้วลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนั้นได้ทดลองเลี้ยงเซลล์ด้วย perfusion rate 0.40 vvd โดยลดความเข้มข้นของซีรัม ลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ยังคงสามารถยืดระยะเวลาการเจริญของเซลล์ได้เป็น 4 วันแต่เซลล์มีการเจริญที่ลดลง ได้ความเข้มข้นสูงสุด 1.41×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นความเข้มข้นจึงลดลงมาคงที่ที่ $1.00 - 1.20 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่ม perfusion rate สูงขึ้นเป็น 0.80 vvd โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและแทบจะมองไม่เห็นการลดลงของเซลล์มีชีวิต ความเข้มข้นคงที่อยู่ที่ประมาณ $1.50 - 1.60 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงขึ้น perfusion rate 0.40 vvd เพียง 1.4 เท่า แม้เพิ่ม rate ขึ้นเป็น 2 เท่า ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีลักษณะคล้ายคลึงกันนั่นคือมีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ได้นาน 3 วัน แล้วจึงลดลงมาคงที่ที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.19

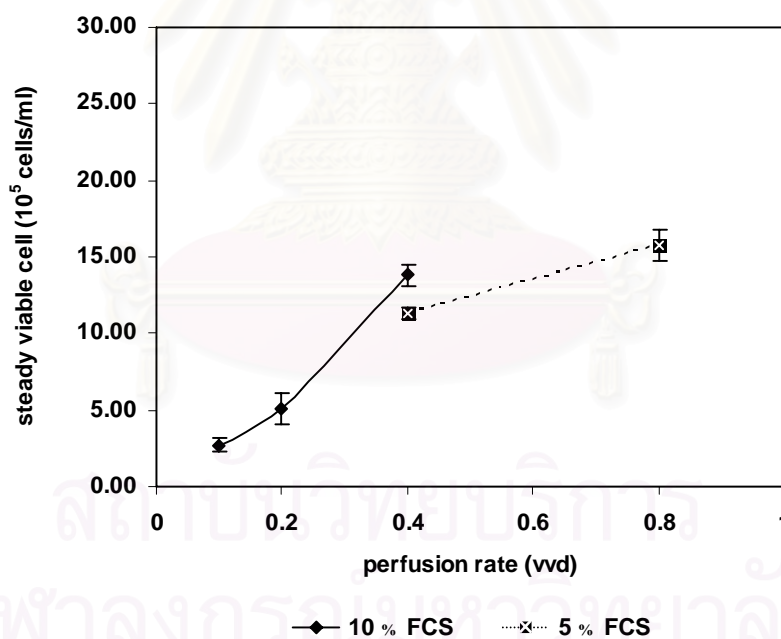


—□— 0.10 vvd —×— 0.20 vvd —◇— 0.40 vvd —◆— 0.4 vvd 5% FCS —○— 0.8 vvd 5% FCS : Viable cell
 -□- 0.10 vvd -×- 0.20 vvd -◇- 0.40 vvd -◆- 0.4 vvd 5% FCS -○- 0.8 vvd 5% FCS : Viability

รูปที่ 4.19 การเจริญเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.10, 0.20, 0.40 vvd ที่ใช้อาหารที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และ perfusion rate 0.40 และ 0.8 vvd ที่ใช้อาหารที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ (ลูกศรทึบแสดงตำแหน่งที่เริ่มการเปลี่ยนถ่ายอาหาร)

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

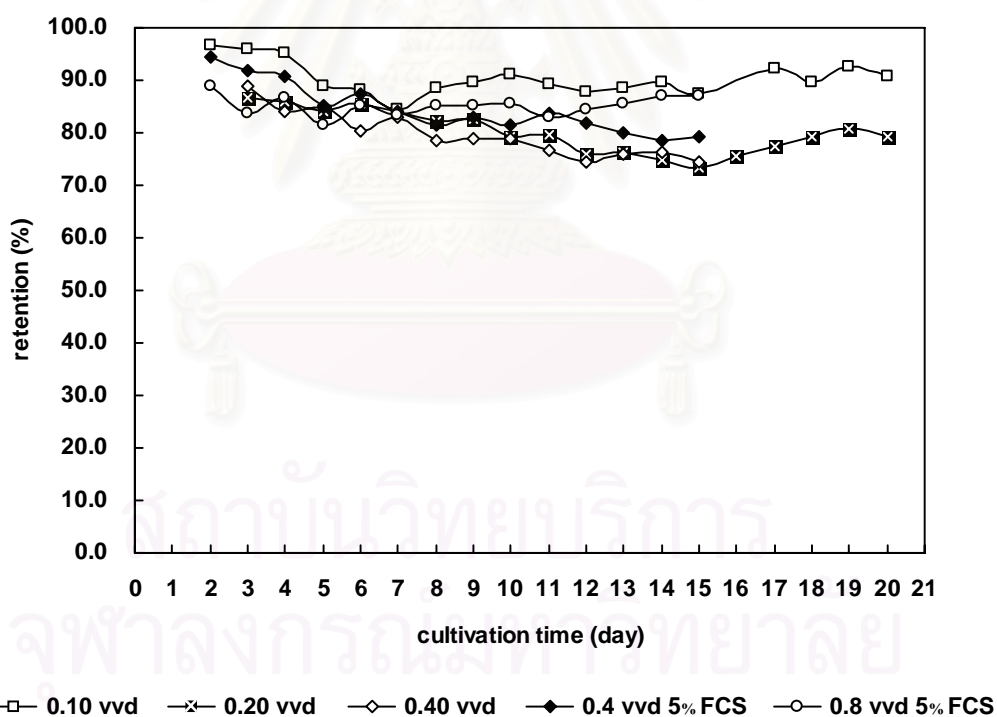
จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุล เมื่อกำหนด perfusion rate แต่ละค่า พบว่าความเข้มข้นเซลล์ที่ภาวะสมดุล จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ perfusion rate ดังรูปที่ 4.20 นอกจากนี้ เมื่อเพิ่ม perfusion rate จาก 0.10 vvd ขึ้น 4 เท่าเป็น 0.40 vvd กลับให้ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตสูงขึ้น ถึง 5.06 เท่า เมื่อลดความเข้มข้นของซีรัมในอาหารเลี้ยง เซลล์ที่ใช้เปลี่ยนถ่ายอาหารแล้ว พบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุลที่ perfusion rate 0.4 vvd มีค่าลดลงมาประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า การลดความเข้มข้นของซีรัมจาก 10 เปอร์เซ็นต์ลงมาเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเจริญและการรักษาระดับความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต อาจมี growth factor หรือโปรตีนจำเป็นบางชนิดถูกจำกัดลง จนถึงระดับที่ส่งผลต่อลักษณะการเจริญของ เซลล์ ระดับความเข้มข้นที่พบนี้สูงกว่าค่าที่ได้จาก perfusion rate 0.1 vvd ประมาณ 4.16 เท่า แต่เมื่อ เพิ่ม perfusion rate ขึ้น 2 เท่าเป็น 0.80 vvd แล้ว กลับพบว่าความเข้มข้นเซลล์ที่ภาวะสมดุลสูงขึ้น เพียง 1.40 เท่า จากรูปแบบที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการลดความเข้มข้นของซีรัมลงมามีผลต่ออัตราการ เพิ่มของเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุล



รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุลเมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ perfusion rate ต่างๆ

4.7.2.2 ผลของ perfusion rate ต่อประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ในสภาพการดำเนินงานแบบต่อเนื่อง

จากการติดตามประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter ในระหว่างดำเนินการเลี้ยงเซลล์ เมื่อกำหนด perfusion rate ต่างๆ พบว่าการกักกันเซลล์มีความสัมพันธ์กับค่า perfusion rate ในช่วงหนึ่งๆ โดยที่เมื่อกำหนดที่ 0.10 vvd แล้ว สามารถกักกันเซลล์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่ม perfusion rate เป็น 0.20, 0.40 vvd และ 0.80 vvd การกักกันเซลล์ลดลงมาอยู่ในช่วงประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเมื่อกำหนดค่า perfusion rate ให้สูงกว่า 0.10 vvd แล้ว พบว่าให้ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 4.21 ลักษณะที่พบนี้แตกต่างกับรายงานของ Yabannavar และคณะ (1992) ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของ perfusion rate ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนที่ผ่านการกรองอย่างมีนัยสำคัญ จนกระทั่ง perfusion rate สูงถึง 3 vvd จึงจะพบการเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 4.21 ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (retention capacity) ที่ perfusion rate ต่างๆ

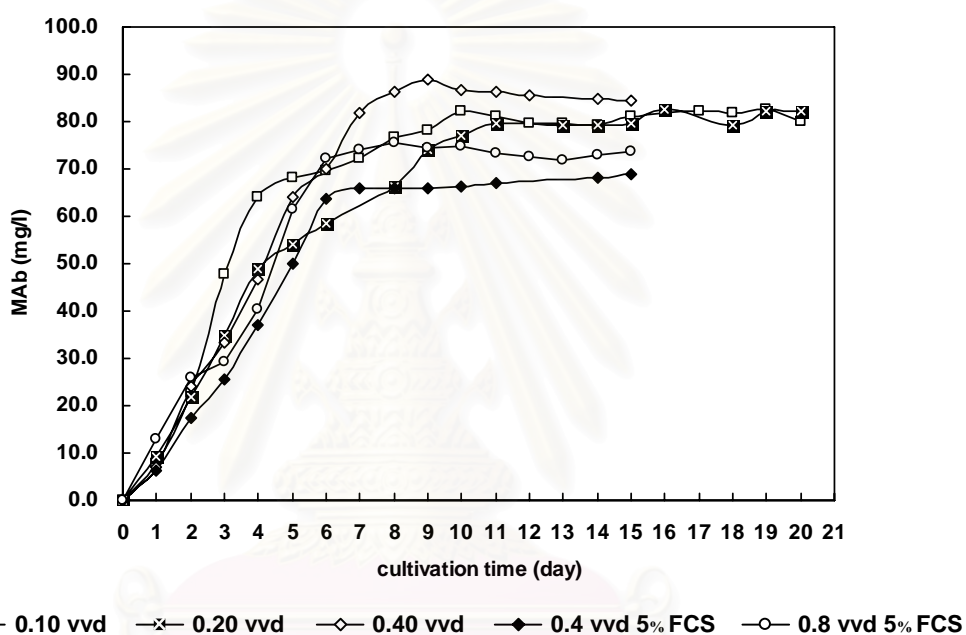
4.7.2.3 ผลของ perfusion rate ต่อการผลิตแอนติบอดี

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอนติบอดีในแต่ละวันพบว่า เซลล์ไฮบริโดมา มีการสะสมแอนติบอดีในช่วง 2 วันแรกที่คล้ายคลึงกัน และหลังจากเริ่มระบบ perfusion แล้ว พบว่าเซลล์มีลักษณะการผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกัน โดยที่ perfusion rate 0.10 vvd ความเข้มข้นจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าในช่วงสัปดาห์แรก อันเป็นผลจากอัตราการเจริญที่น้อยกว่าภาวะอื่น จากนั้นก็เริ่มเข้าสู่ภาวะสมดุล มีความเข้มข้นประมาณ 80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่ม perfusion rate เป็น 0.20 และ 0.40 vvd พบว่าการสะสมของแอนติบอดีมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ในช่วง 4 วันแรก จากนั้น ที่ perfusion rate 0.20 vvd ความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนกระทั่งคงที่ ประมาณ 80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับ 0.10 vvd ในขณะที่ที่ 0.40 vvd ความเข้มข้นจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงสัปดาห์แรก จนถึงภาวะสมดุลที่ความเข้มข้น 85.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุด ลักษณะการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีสอดคล้องกับลักษณะการเจริญของเซลล์ ดังรูปที่ 4.22 เมื่อลดความเข้มข้นของซีรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตแอนติบอดีมีความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วงสัปดาห์แรกอย่างต่อเนื่อง แต่ความเข้มข้นในแต่ละวัน มีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากภาวะอื่นๆ จนกระทั่งถึงภาวะสมดุลที่ความเข้มข้นประมาณ 65.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่ามีความเข้มข้นน้อยที่สุด เมื่อเพิ่ม perfusion rate ให้สูงขึ้นเป็น 0.80 vvd แล้ว ก็ยังพบว่าความเข้มข้นที่ได้ ยังน้อยกว่า perfusion rate 0.40 vvd ที่ใช้อาหารที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ภาวะสมดุลจะสูงกว่าก็ตาม น่าจะเป็นเพราะว่า อัตราการเจริญที่สูงกว่ามีผลทำให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีลดลงด้วย

ผลผลิตต่อวัน (Daily yield) คือ ค่าที่ใช้บอกปริมาณผลผลิตแอนติบอดีที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละวัน คิดจากความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในถังคูณด้วยปริมาตรที่เก็บ ส่วนอัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) เป็นค่าแสดงการผลิตต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรต่อวัน คิดจากผลผลิตต่อวัน/ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ในถัง จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตต่อหน่วยของเซลล์ไฮบริโดมาเป็นค่าที่ขึ้นกับ perfusion rate โดยตรง ยิ่งเพิ่ม perfusion rate สูงยิ่งให้อัตราการผลิตต่อหน่วยสูงขึ้นด้วย แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.23 ลักษณะที่ได้นี้สอดคล้องกับผลผลิตแอนติบอดีต่อวันด้วย นั่นคือ perfusion rate สูง ก็จะทำให้ผลผลิตแอนติบอดีต่อวันสูงขึ้น

ผลผลิตแอนติบอดีสะสมในแต่ละวัน และมูลค่าของแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยคำนวณจากผลผลิตแอนติบอดีที่เก็บเกี่ยวได้ (antibody yield) เทียบกับราคาอาหารที่ใช้ไปในแต่ละวัน ในระยะเวลาการดำเนินการ 15 วัน (ภาคผนวก ค) แสดงตารางที่ 4.5 และดังรูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่า การเลือกใช้ perfusion rate ค่าใดๆ มีผลทำให้ได้รับผลผลิตในปริมาณที่ต้องการ โดยใช้ระยะเวลา

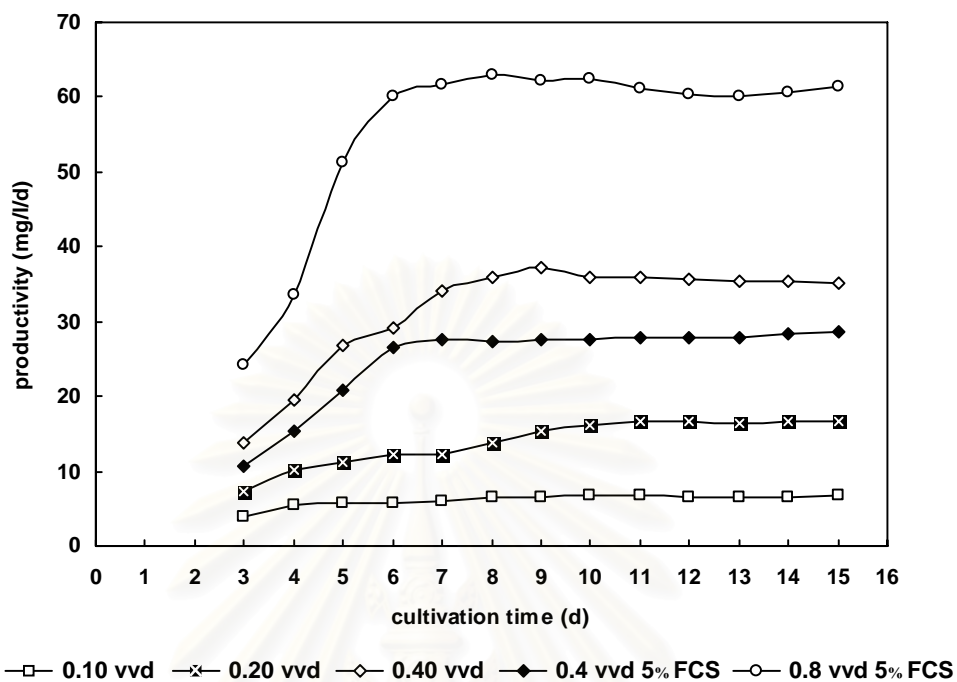
ต่างกัน แน่แน่นอนว่า การเลือกใช้ perfusion rate สูง จะทำให้ได้แอนติบอดีในปริมาณที่ต้องการได้เร็วกว่า โดยไม่ได้มีผลทำให้เกิดการเจือจางของแอนติบอดีลง มูลค่าของแอนติบอดีคำนวณจากปริมาณอาหารที่ใช้ไปที่ perfusion rate 0.10-0.40 vvd มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน ประมาณ 11.64-13.15 บาทต่อมิลลิกรัม เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย perfusion rate 0.40 vvd และใช้อาหารที่มีซีรัม ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลผลิตน้อยลงเหลือ 79.13 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ทำให้ต้นทุนในเรื่องอาหารลดลง เหลือ 8.02 บาทต่อมิลลิกรัม ซึ่งลดลงคิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ perfusion rate เดียวกัน และเมื่อเพิ่ม perfusion rate เป็น 0.80 vvd พบว่าต้นทุนในเรื่องอาหารยิ่งลดลง เหลือ 7.20 บาทต่อมิลลิกรัม



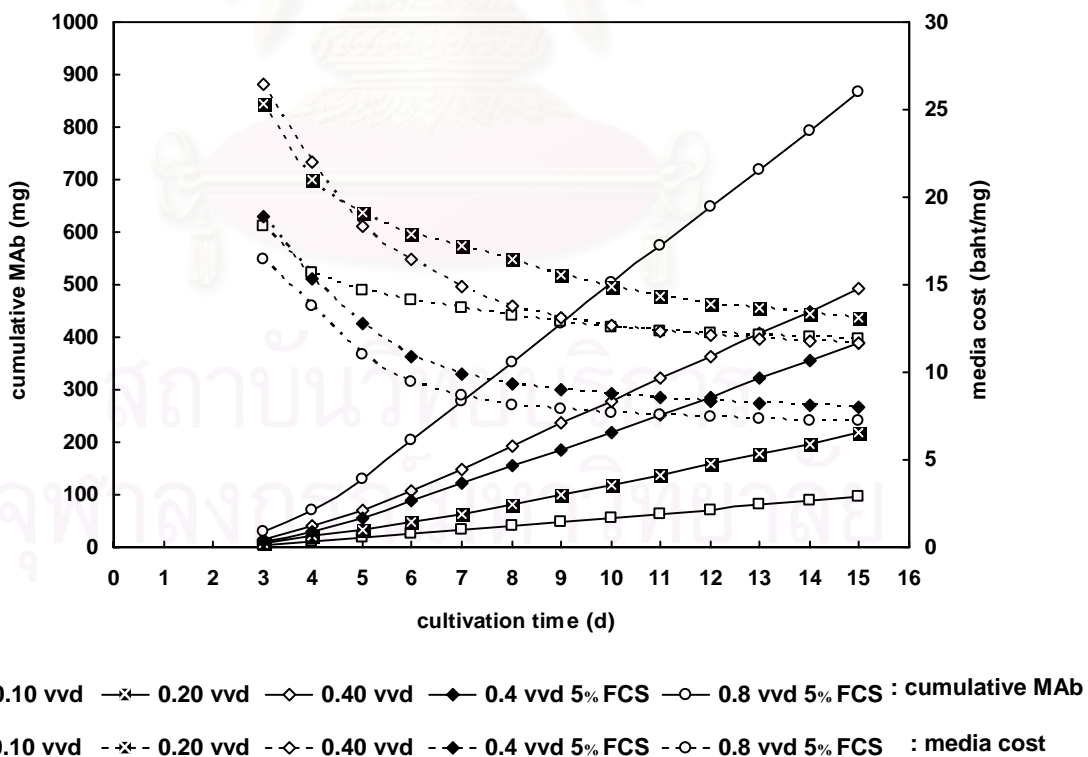
รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของแอนติบอดีในแต่ละวัน ที่ perfusion rate ต่างๆ

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแอนติบอดีสะสมและมูลค่าของแอนติบอดีเมื่อใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 15 วัน

	Perfusion rate				
	0.10 10% serum	0.20 10% serum	0.40 10% serum	0.40 5% serum	0.80 5% serum
ผลผลิตต่อวัน (Daily yield: มก./วัน)	8.11	19.94	42.20	34.38	73.7
Productivity (มก./ล./วัน)	6.76	16.61	35.16	28.65	61.4
ปริมาณแอนติบอดีสะสม (มก.)	96.0	217.6	491.6	389.0	866.8
มูลค่าแอนติบอดี (บาท/มก.)	11.92	13.15	11.64	8.02	7.20



รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ

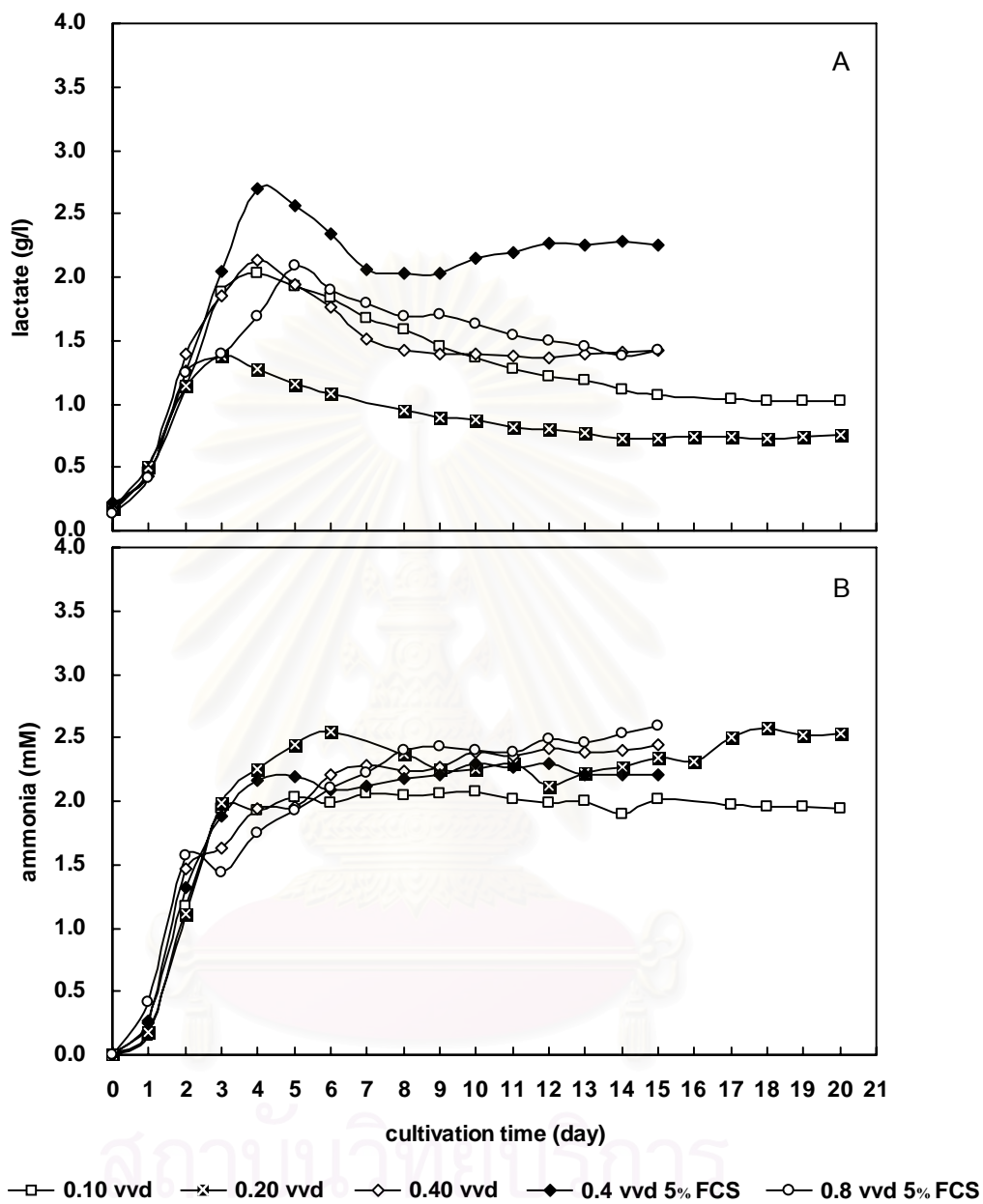


รูปที่ 4.24 ปริมาณแอนติบอดีสะสม และมูลค่าของแอนติบอดี เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ

4.7.2.4 ผลของ perfusion rate ต่อการการสะสมของของเสีย

การสะสมของของเสีย 2 ชนิดได้แก่แลคเตตและแอมโมเนียมีลักษณะดังรูปที่ 4.25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแลคเตตในทุกภาวะ มีลักษณะแบบเดียวกัน การสะสมของแลคเตตเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในระยะแรก ควบคู่กับการเจริญ จนกระทั่งมีความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงได้ 3-4 วัน โดยแต่ละ perfusion rate ให้แลคเตตสูงสุด 2.04, 1.38, 2.13, 2.69 และ 2.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้สัมพันธ์กับ perfusion rate ที่ 0.10 vvd อาจเป็นเพราะที่ perfusion rate ต่ำเท่ากับ 0.10 vvd แลคเตตที่เกิดขึ้นมีการสะสมอย่างรวดเร็วในระยะการเจริญ แต่อัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหารเกิดขึ้นช้ากว่า จึงทำให้พบความเข้มข้นสูง ส่วนที่ perfusion rate 0.40 vvd โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์นั้น ให้ความเข้มข้นของแลคเตตสูงที่สุด ทั้งๆที่มีเซลล์จำนวนน้อยกว่า ผลที่ได้นี้อาจจะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า ปริมาณซีรัมในอาหารมีผลต่อการเกิดแลคเตต หรือมีผลเปลี่ยนทิศทางการใช้กลูโคสของเซลล์ แต่เมื่อเพิ่ม perfusion rate เป็น 0.80 vvd โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่าความเข้มข้นของแลคเตตมีค่าน้อยกว่า แสดงว่าปัจจัยของการเจือจางมีอิทธิพลกว่าอัตราการผลิตแลคเตตที่ภาวะนี้ จากนั้นความเข้มข้นจึงลดลงอันเป็นผลจากการเจือจางด้วยการเปลี่ยนถ่ายอาหาร สำหรับทุก perfusion rate จนกระทั่งมีความเข้มข้นต่ำกว่า 2.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ มีเพียงที่ perfusion rate ที่ 0.40 vvd โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่มีความเข้มข้นประมาณ 2.00-2.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เริ่มมีผลต่อการเจริญของเซลล์แล้ว

สำหรับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอมโมเนีย กลับพบว่ามีความโน้มในทิศทางเดียวกันทั้งหมด มีการสะสมเพิ่มสูงขึ้นในช่วงของการเจริญ 4-5 วันแรก จากนั้นจึงเริ่มเข้าสู่ภาวะสมดุล แม้ว่าจะเพิ่ม perfusion rate สูงขึ้นแต่กลับไม่สามารถเจือจางความเข้มข้นของแอมโมเนียลงได้ แม้ที่ perfusion rate 0.80 vvd ความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 หลังจากเริ่มระบบ perfusion แล้ว แต่ก็กลับเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันถัดมา ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเมื่อกำหนด perfusion rate สูงขึ้น เซลล์ก็มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วย และเซลล์มีอัตราการผลิตแอมโมเนียที่สม่ำเสมอซึ่งแม้อัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหารที่ 0.80 vvd ก็ยังไม่อาจเจือจางความเข้มข้นของแอมโมเนียให้ลงมาอยู่ในระดับต่ำได้ ดังนั้นจึงพบความเข้มข้นแอมโมเนียค่อนข้างใกล้เคียงกันในแต่ละภาวะ โดยที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ 2.00-2.50 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นที่พบนี้ อยู่ในระดับที่เริ่มส่งผลต่อการเจริญของเซลล์แล้ว



รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของแลคเตต (A) และแอมโมเนีย (B) เมื่อเลี้ยงที่ perfusion rate ต่างๆ

4.7.2.5 ผลสรุปรวมการเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อเลี้ยงระบบ perfusion ในแต่ละ perfusion rate

การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ที่ 0.10 vvd

หลังจากถ่ายเซลล์ตั้งต้น 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นเซลล์เพิ่มจำนวนสูงขึ้นถึง 5.72×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะ 2 วันแรกของการเจริญ ซึ่งเป็นระยะการเจริญแบบเอกซโพเนนเชียล จึงเริ่มต้นการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วย perfusion rate 0.10 vvd (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.26) และปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ในถังคงที่เท่ากับ 1.2 ลิตร เซลล์มีชีวิตยังคงมีการเจริญต่อเนื่องจนกระทั่ง มีความเข้มข้นสูงสุด 1.07×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 3 วัน มีค่าสูงกว่าระบบ batch เล็กน้อย แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 2 วันแรกเท่านั้น แล้วลดลงเหลือ 80.1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น เซลล์มีชีวิตมีความเข้มข้นลดลงมาคงที่ที่ $2.30-3.10 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าคงที่ที่ประมาณ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาที่เหลือจนกระทั่งยุติการเลี้ยงเซลล์ (ตำแหน่งลูกศรป่องในรูปที่ 4.26) ในขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดยังคงเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึง 3.37×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงว่าเซลล์ยังคงมีการเพิ่มจำนวน แต่มีชีวิตได้ไม่นาน จึงทำให้เซลล์มีชีวิตมีความเข้มข้นไม่เปลี่ยนแปลงมากนักแต่เซลล์ทั้งหมดกลับเพิ่มจำนวนสะสมสูงขึ้นเรื่อยๆ จากการติดตามความเข้มข้นของเซลล์ที่ผ่านออกมาที่อาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่า มีประสิทธิภาพการกักกันเซลล์อยู่ที่ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ที่ดี กว่าระบบการเลี้ยงเซลล์แบบไม่ต่อเนื่องเป็นอย่างมาก ดังรูปที่ 4.26A

การสะสมของแอนติบอดีสูงขึ้นอย่างรวดเร็วพร้อมกับการเจริญของเซลล์ ในระยะ 4 วันแรก จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนกระทั่งความเข้มข้นคงที่ประมาณ 80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 10 วัน ความเข้มข้นกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วจาก 4.00 กรัมต่อลิตร เหลือ 2.01 กรัมต่อลิตรในระยะ 4 วันแรก สอดคล้องกับการเจริญ จากนั้นกลูโคสจะเริ่มสะสมเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นคงที่ประมาณ 2.80 กรัมต่อลิตรที่ภาวะสมดุล ความเข้มข้นของแลคเตตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 4 วันแรกจนมีความเข้มข้นสูงสุด 2.04 กรัมต่อลิตร จากนั้นความเข้มข้นจึงค่อยๆลดลงอย่างช้าๆ อันเป็นผลจากการดำเนินการระบบ perfusion จนกระทั่งมีความเข้มข้นคงที่ 1.02 กรัมต่อลิตร ส่วนแอมโมเนียมีความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นความเข้มข้นจึงคงที่ที่ประมาณ 2.00 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 4.26B

การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ที่ 0.20 vvd

เซลล์ไฮบริโดมามีการเจริญในระบบ batch ในระยะ 2 วันแรก แล้วจึงเริ่มต้นการเลี้ยง เซลล์ระบบ continuous perfusion ความคุม perfusion rate คงที่ที่ 0.20 vvd (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.27) ลักษณะการเจริญของเซลล์เป็นดังรูปที่ 4.27A ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตเพิ่มจำนวนสูงขึ้น ในช่วง 3 วันแรก จนกระทั่งมีค่าสูงสุด 10.2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สูงขึ้นจากแบบ batch เล็กน้อย จากนั้นเข้มข้นเซลล์ลดลงมาคงที่ในช่วง $3.50-6.00 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 1 สัปดาห์ ในขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดยังคงเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 3.35×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 20 วัน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 2 วันแรก เท่านั้น จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วมาอยู่ที่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์จนกระทั่งยุติการดำเนินการ (ตำแหน่งลูกศรโปร่งในรูปที่ 4.27) ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์มีค่าประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในช่วงที่มีการเจริญของเซลล์ ระยะ 4 วันแรก จากนั้นยังคงเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงวันที่ 10 แล้วความเข้มข้นก็คงที่ที่ประมาณ 80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จนถึงวันที่ 20 ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์แรก จนเหลือประมาณ 2.00 กรัมต่อลิตร จากนั้นกลับเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นประมาณ 3.00 กรัมต่อลิตร ส่วนของเสียได้แก่ แลคเตต มีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตร จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 0.75 กรัมต่อลิตร อันเป็นผลมาจากการเจือจางขณะที่เกิดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ส่วนแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสัปดาห์แรก จากนั้นคงที่ที่ประมาณ 2.20-2.50 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของแอมโมเนียนี้สูงจนถึงระดับที่เริ่มมีผลต่อเซลล์ ดังรูปที่ 4.27B

การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ที่ 0.40 vvd

เซลล์ไฮบริโดมามีการเจริญในระยะ 2 วันแรก แล้วจึงเริ่มต้นการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วย perfusion rate คงที่ 0.40 vvd (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.28) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีลักษณะการเจริญดังรูปที่ 4.28A ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตเพิ่มจำนวนสูงขึ้น ในช่วง 4 วันแรก ยาวนานกว่าที่ perfusion rate 0.10 และ 0.20 vvd จนกระทั่งมีค่าสูงสุด 1.72×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สูงขึ้นจากแบบ batch เป็น 2 เท่า จากนั้นเข้มข้นเซลล์ลดลงมาคงที่ในช่วง $1.30-1.50 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใน 1 สัปดาห์ ในขณะที่เซลล์ทั้งหมดเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึง 4.46×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 15 วัน สำหรับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 3 วันแรก นานขึ้นกว่าการเลี้ยงเซลล์ครั้งก่อนๆ หน้า จากนั้นก็ลดลงอย่างรวดเร็วมาคงที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์จนกระทั่งยุติการดำเนินการ (ตำแหน่งลูกศรโปร่งในรูปที่ 4.28) ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter มีค่า 70-90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการดำเนินงาน

ความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ในช่วงสัปดาห์แรก หลังจากนั้นความเข้มข้นก็คงที่ประมาณ 85.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยง ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4 วันแรก จนเหลือประมาณ 1.70 กรัมต่อลิตร จากนั้นกลับเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นคงที่ประมาณ 2.50 กรัมต่อลิตร ส่วนแลคเตต มีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.13 กรัมต่อลิตร จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนมาคงที่ที่ 1.40 กรัมต่อลิตร อันเป็นผลมาจากการเจือจางขณะที่เกิดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ส่วนแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสัปดาห์แรก จากนั้นคงที่ที่ประมาณ 2.20-2.40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียนี้ สูงจนถึงระดับที่เริ่มมีผลต่อเซลล์ ดังรูปที่ 4.28B

การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ที่ 0.40 vvd เปลี่ยนถ่ายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไฮบริโดมามีการเจริญในระยะ 2 วันแรก แล้วจึงเริ่มต้นการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วย perfusion rate คงที่ 0.40 vvd (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.29) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีลักษณะการเจริญเป็นดังรูปที่ 4.29A ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตเพิ่มจำนวนสูงขึ้นในช่วง 4 วันแรก ยาวนานกว่าที่ perfusion rate 0.10 และ 0.20 vvd จนกระทั่งมีค่าสูงสุด 1.41×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลดลงเล็กน้อยจากการทดลองที่ใช้ซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความเข้มข้นเซลล์ลดลงมาคงที่ในช่วง $1.00-1.20 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ ในขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 4.16×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 15 วัน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 3 วันแรก จากนั้นก็ลดลงอย่างต่อเนื่องมาคงที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์จนกระทั่งยุติการดำเนินการ (ตำแหน่งลูกศรป่องในรูปที่ 4.29) ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter มีค่าประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน

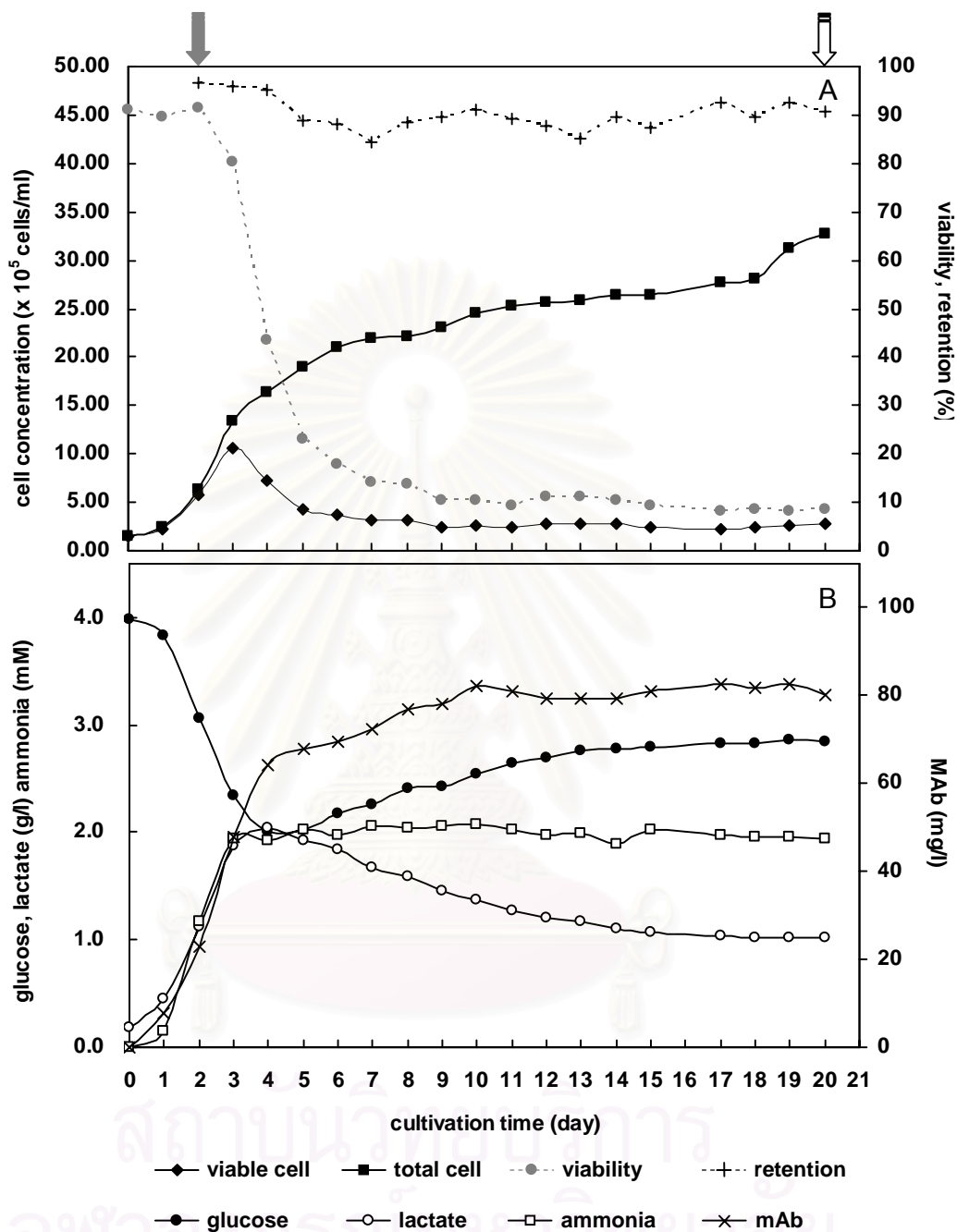
ความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ในช่วงสัปดาห์แรก หลังจากนั้น จึงคงที่ประมาณ 65.00 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งสิ้นสุดการดำเนินงาน ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4 วันแรก จนเหลือประมาณ 1.40 กรัมต่อลิตร จากนั้นกลับเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นคงที่ประมาณ 1.60 กรัมต่อลิตร ส่วนแลคเตตมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 4 สูงถึง 2.69 กรัมต่อลิตร แล้วจึงลดลงมาคงที่ที่ 2.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงถึงระดับที่เริ่มมีผลต่อเซลล์ได้ ส่วนแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 4 วันแรก จากนั้นคงที่ที่ระดับ 2.20-2.30 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียนี้ สูงจนถึงระดับที่เริ่มมีผลต่อเซลล์ ดังรูปที่ 4.29B

การเจริญและเมแทบอลิซึมของเซลล์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ที่ 0.80 vvd เปลี่ยนถ่ายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์

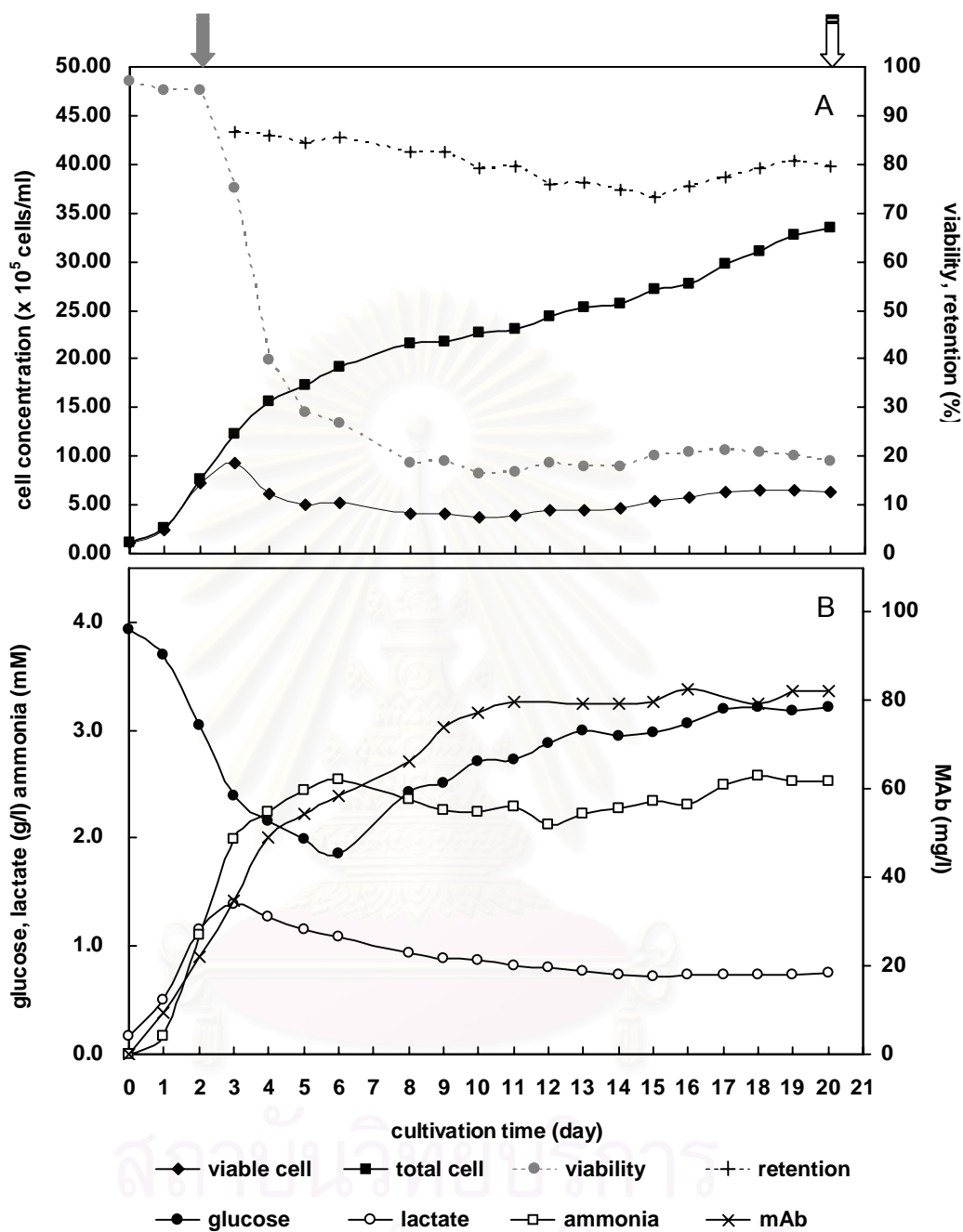
เซลล์ไฮบริโดมามีการเจริญในระยะ 2 วันแรก แล้วจึงเริ่มต้นการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วย perfusion rate คงที่ 0.80 vvd (ตำแหน่งลูกศรที่บในรูปที่ 4.30) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี ซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีลักษณะการเจริญเป็นดังรูปที่ 4.30A ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตเพิ่มจำนวน สูงขึ้นในช่วง 5 วันแรก ยาวนานกว่า perfusion rate 0.10 และ 0.20 vvd จนกระทั่งมีค่าสูงสุด ประมาณ 1.60×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นความเข้มข้นเซลล์ลดลงมาคงที่ในช่วง $1.50-1.60 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจาก 5 วัน ในขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึง 5.92×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 15 วัน สำหรับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มีค่าสูง กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 3 วันแรก จากนั้นก็ลดลงอย่างต่อเนื่องมาคงที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งยุติการดำเนินการ (ตำแหน่งลูกศรโปร่งในรูปที่ 4.30) ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter มีค่าประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน

ความเข้มข้นของแอนติบอดีเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ในช่วง 2 วันแรก หลังจากเริ่มเปลี่ยนถ่ายอาหารแล้ว แอนติบอดีมีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึงเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ถึงวันที่ 6 หลังจากนั้นความเข้มข้นก็คงที่ประมาณ 73.57 มิลลิกรัมต่อลิตร จนกระทั่งสิ้นสุดการ ดำเนินงาน ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก หลังจากเริ่มเปลี่ยนถ่ายอาหาร แล้ว ความเข้มข้นมีค่าคงที่อยู่ที่ 1 วัน แล้วจึงลดลงอีกครั้ง จนถึงวันที่ 5 เหลือ 1.91 กรัมต่อลิตร จากนั้น กลับเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นคงที่ประมาณ 2.40 กรัมต่อลิตร ส่วนแลคเตตมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 5 สูงถึง 2.08 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆจนมีความเข้มข้น 1.40-1.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่สูงมากจนมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ส่วนแอมโมเนียเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 2 วันแรก แล้วจึงลดลงเล็กน้อย อันเป็นผลจากการเจือจางโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหาร แล้วจึงเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนถึง วันที่ 8 และคงที่ที่ระดับ 2.40-2.50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียนี้ สูงจนถึงระดับที่เริ่มมี ผลต่อเซลล์ ดังรูปที่ 4.30B

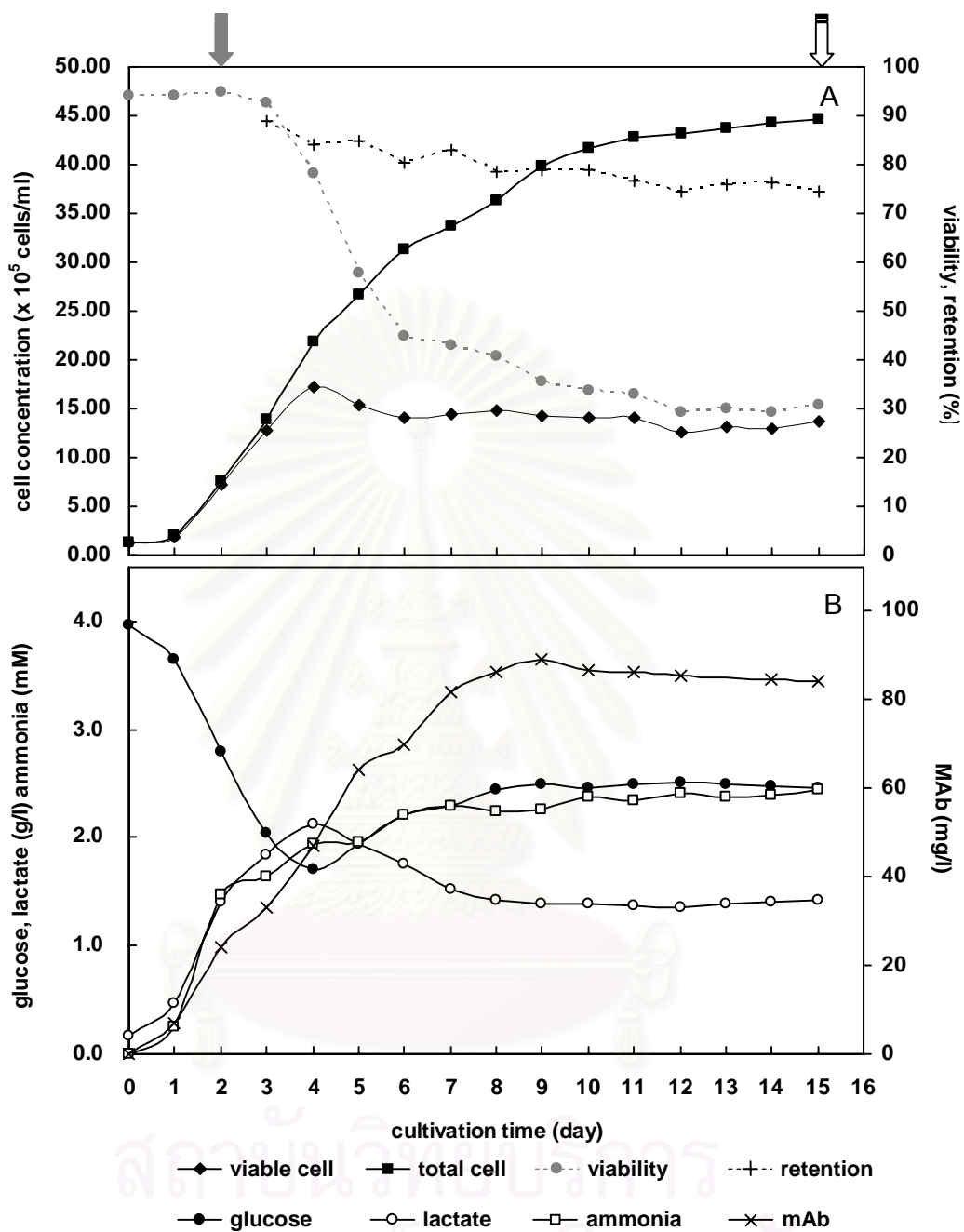
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



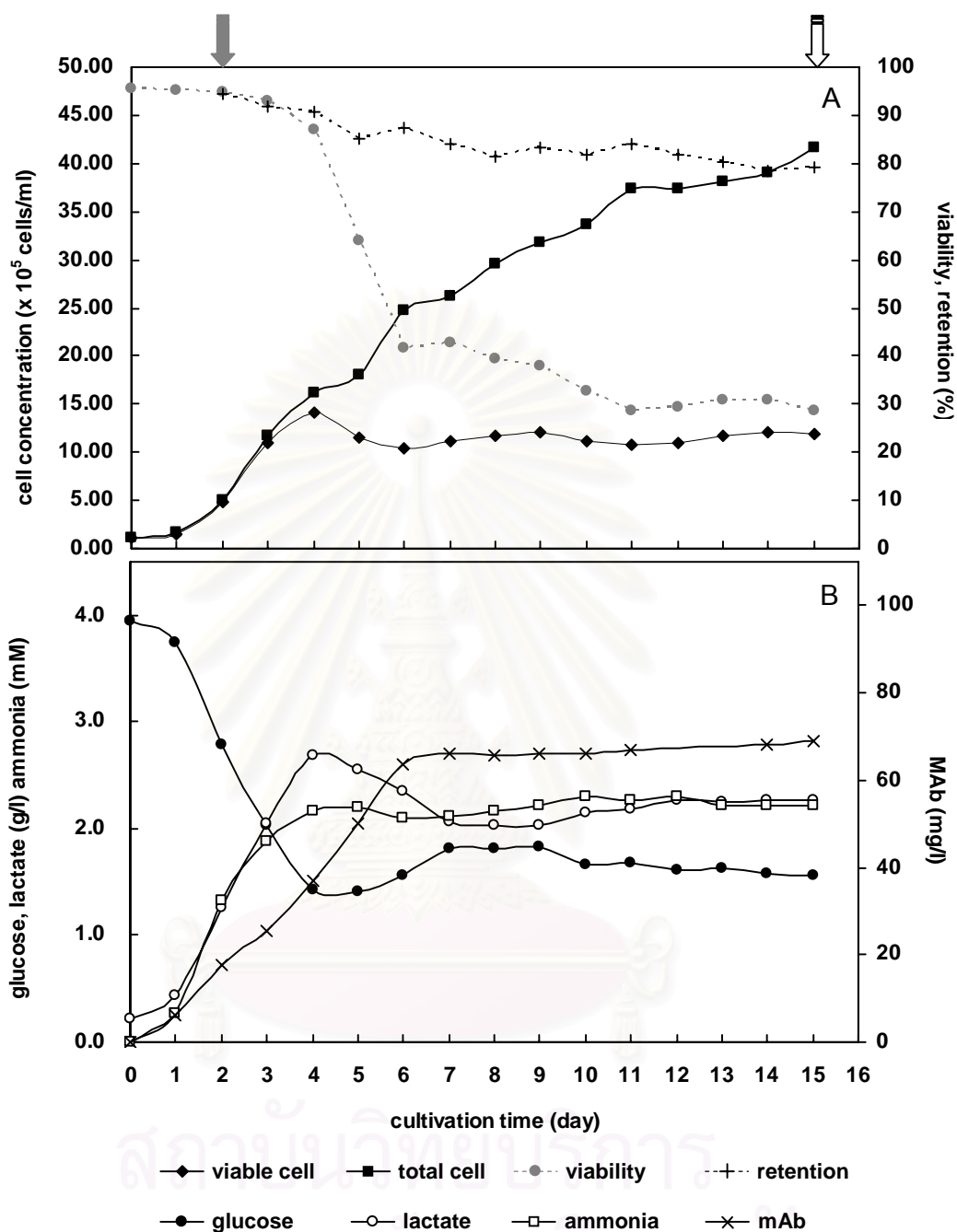
รูปที่ 4.26 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.10 vvd (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ลูกศรทึบและโปร่งแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)



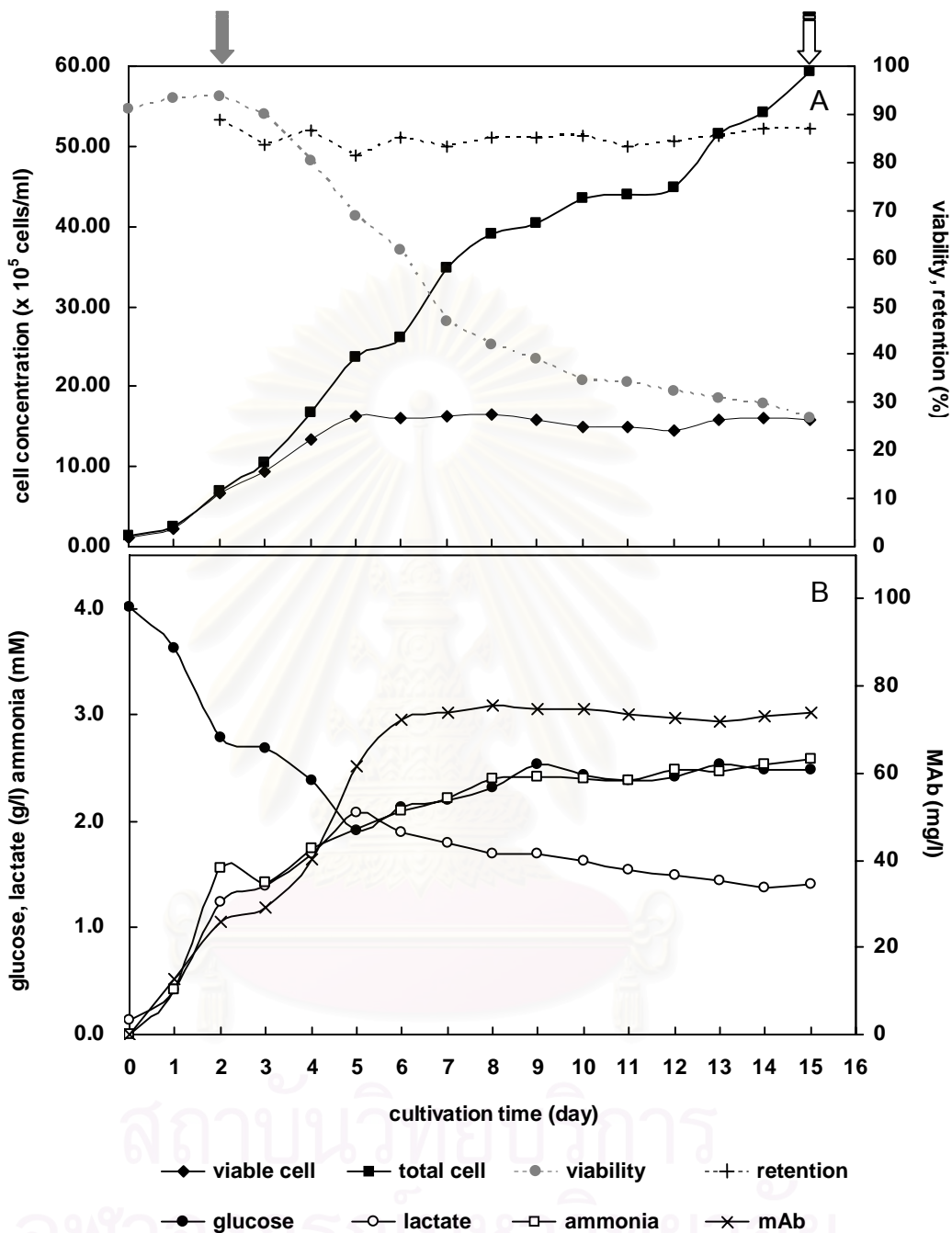
รูปที่ 4.27 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.20 vvd (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ลูกศรทึบและโปร่งแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)



รูปที่ 4.28 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.40 vvd (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์ และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ลูกศรทึบและโปร่งแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)



รูปที่ 4.29 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.40 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ถูกศรที่บและไปรงแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)



รูปที่ 4.30 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ continuous perfusion ผ่าน spin filter ด้วย perfusion rate 0.80 vvd ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริดที่มี ซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ (A) ลักษณะการเจริญของเซลล์และประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ (B) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส แลคเตต แอมโมเนีย และแอนติบอดี (ลูกศรที่บและ โปรงแสดงตำแหน่งที่เริ่มและสิ้นสุดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.6 สรุปค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ perfusion ด้วยอัตราต่างๆ

	Perfusion rate (vvd)				
	0.10	0.20	0.40	0.40	0.80
	10% serum	10% serum	10% serum	5% serum	5% serum
เซลล์มีชีวิตสูงสุด (เซลล์/มล.)	1.07×10^5	1.02×10^6	1.72×10^6	1.41×10^6	1.64×10^6
เซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุล(เซลล์/มล.)	2.73×10^5	5.09×10^5	1.38×10^6	1.14×10^6	1.57×10^6
เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มล.)	3.27×10^6	3.5×10^6	4.61×10^6	4.16×10^6	5.92×10^6
เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่สมดุล (%)	~10	~20	30-40	30-40	30-40
การกักกันเซลล์ (%)	>80	>70	>70	>70	>70
แอนติบอดี (มก./ล.)	80.96	80.55	85.43	67.54	73.57
ผลผลิตต่อวันที่ภาวะสมดุล (มก./วัน)	8.11	19.94	42.20	34.38	73.69
ผลผลิตสะสม 15 วัน (มก.)	96.0	217.6	491.6	389.0	866.8
ราคาต้นทุนแอนติบอดี (บาท/มก.)	11.92	13.15	11.64	8.02	7.20
productivity (มก./ล./วัน)	6.76	16.61	35.16	28.65	61.41
แลคเทตที่ภาวะสมดุล (ก./ล.)	1.13	0.75	1.39	2.23	1.54
แอมโมเนียภาวะสมดุล (มิลลิโมลาร์)	1.98	2.37	2.39	2.25	2.46
ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ (วัน)	>20	>20	>15	>15	>15

การเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ perfusion แบบต่อเนื่อง สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตได้สูงขึ้น สามารถยืดอายุการเลี้ยงเซลล์ออกไปได้นานเท่าที่ต้องการ ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ที่ภาวะสมดุลค่าหนึ่งๆ และคงรักษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตให้มีค่ายาวนานขึ้นได้ โดยค่าเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ การเลือก perfusion rate โดยตรง นอกจากนั้นยังสามารถเก็บเกี่ยวแอนติบอดีที่ผลิตได้อย่างต่อเนื่อง จากการเลี้ยงเซลล์ระบบนี้ พบว่าผลการเลี้ยงเซลล์จะดีขึ้นเมื่อเพิ่ม perfusion rate ให้สูงขึ้น ทั้งความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด ความเข้มข้นเซลล์ที่ภาวะสมดุล เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และปริมาณแอนติบอดีที่เก็บเกี่ยวได้ สำหรับการลดความเข้มข้นของซีรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงจาก 10 เปอร์เซ็นต์ลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้สามารถลดราคาต้นทุนการผลิตแอนติบอดีลงได้ แม้ว่าการเจริญของเซลล์ และความเข้มข้นและปริมาณของแอนติบอดีที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละวันจะน้อยกว่า ทำให้ต้องใช้เวลานานขึ้นในขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration

การศึกษาการเลี้ยงเซลล์ระบบ continuous perfusion ในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีการกำหนด perfusion rate คงที่ตลอดการดำเนินงาน เพิ่ม rate ตั้งแต่ 0.10 vvd ขึ้นมาจนสูงถึง 0.80 vvd โดย

พบว่า สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตในภาวะสมดุลได้สูงมากกว่า 1.50×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีแอนติบอดีเข้มข้นประมาณ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร มี productivity สูงกว่า 60 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Velez (1987) ซึ่งพบว่าเมื่อปรับ perfusion rate สูงขึ้น จะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และ productivity ให้สูงขึ้นได้ ถึงแม้จะมีความเข้มข้นเซลล์ต่ำกว่ารายงานของ Seamans และคณะ (1990) ที่ใช้วิธีการติดตามปริมาณกลูโคสเพื่อปรับ perfusion rate โดยอาศัยค่าทางจุลศาสตร์ ซึ่งสามารถเลี้ยงเซลล์ได้ความเข้มข้นสูงถึง 1.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีประมาณ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในงานวิจัยนี้สามารถผลิตแอนติบอดีได้ความเข้มข้นสูงกว่า แต่อย่างไรก็ดี ความเข้มข้นของเซลล์และ productivity ในงานวิจัยนี้ มีค่าต่ำกว่าที่มีรายงานของ Feng (2006) ซึ่งได้พัฒนาเทคนิคการเติมอาหารโดยควบคุมการเติมกรดอะมิโนบางชนิด พิจารณาผ่านการเปลี่ยนแปลงของค่า OUR ในระหว่างการเลี้ยงแบบ perfusion ซึ่งให้เซลล์มีชีวิตความหนาแน่นได้สูงถึง 1.9×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมี antibody productivity เท่ากับ 325 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน วิธีนี้จำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ออกซิเจนกับการใช้สารอาหารที่ต้องการควบคุม

ในการเลี้ยงเซลล์สัตว์นั้น เมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น จำเป็นจะต้องปรับการจ่ายอาหารแก่เซลล์ให้สูงขึ้น การปรับการจ่ายอาหารให้สูงขึ้นนั้นมักจะต้องใช้วิธีการเพิ่มอัตราการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (perfusion rate) ในขณะที่จะต้องรักษาระดับความเข้มข้นของสารอาหารให้คงที่ที่ภาวะเดิม ซึ่งต่างไปจากการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ ที่สามารถใช้การเติมอาหารที่เข้มข้นได้โดยไม่ส่งผลต่อเซลล์มากเท่าในเซลล์สัตว์ (Seamans และคณะ, 1990)

ตารางที่ 4.7 สรุปค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบต่างๆ

	Cultivation mode			
	Batch	Fed-batch (glucose)	Semi-continuous perfusion (100 ml/d)	Continuous Perfusion (0.80 vvd)
เซลล์มีชีวิตสูงสุด (เซลล์/มล.)	9.21×10^5	8.70×10^5	1.02×10^6	1.64×10^6
เซลล์มีชีวิตที่ภาวะสมดุล (เซลล์/มล.)	-	-	1.49×10^5	1.57×10^6
เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มล.)	1.22×10^6	1.35×10^6	3.5×10^6	5.92×10^6
เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่สมดุล (%)	-	-	10-15	30-40
แอนติบอดี (มก./ล.)	67.33	56.24	81.10	73.57
ผลผลิตต่อวัน (มก./วัน)	13.47	11.25	8.18	73.69
productivity (มก./ล./วัน)	11.22	9.37	6.82	61.41
แอนติบอดีสะสม (มก.)	80.80	67.49	161.60	866.80
ราคาต้นทุนแอนติบอดี (บาท/มก.)	15.68	15.65	12.07	7.20
แลคเทตที่ภาวะสมดุล (ก./ล.)	1.44	2.03	1.04	1.54
แอมโมเนียที่ภาวะสมดุล (มิลลิโมลาร์)	2.13	2.46	1.36	2.46
ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ (วัน)	5	5	>10	>15

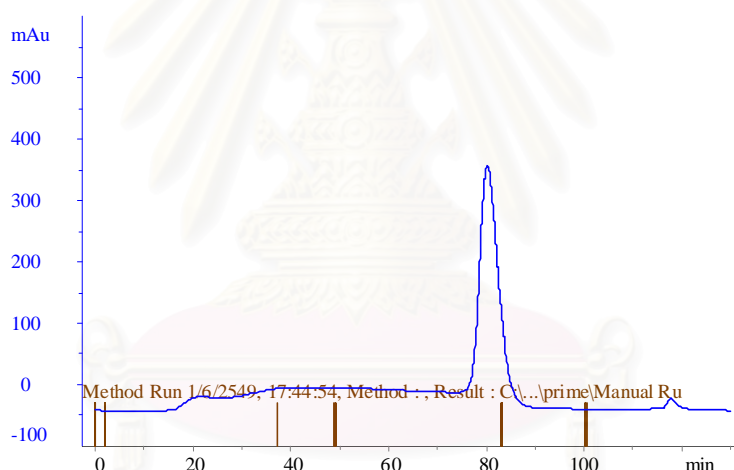
เปรียบเทียบผลการดำเนินการเลี้ยงเซลล์ในแต่ละระบบ ได้แก่ ระบบ batch ที่ควบคุมความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงเซลล์ระบบ fed-batch โดยการเติมซีรัม กลูโคส กลูตามีน ซึ่งพบว่าไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นแอนติบอดีได้ การเลี้ยงเซลล์ระบบ semi-continuous perfusion ที่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารด้วยอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อวัน และการเลี้ยงเซลล์ระบบ continuous perfusion ควบคุม perfusion rate คงที่อยู่ที่ 0.80 vvd จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion ร่วมกับการใช้ spin filter ที่มีขนาดรูพรุน 20 ไมโครเมตร จะมีประสิทธิภาพสูงสุด ความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นจากระบบ batch ประมาณ 2 เท่า สามารถรักษาระดับของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไว้ได้สูงประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ที่สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ภาวะสมดุลสูงขึ้นกว่าระบบ batch เล็กน้อย ทั้งที่มีความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระบบนี้ไม่อาจเลี้ยงการเจือจางของแอนติบอดีอันเกิดจาก perfusion rate ได้ ระบบนี้ให้อัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) สูงกว่าระบบ batch ถึง

6 เท่า สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ต่อเนื่องสม่ำเสมอ ลดการสะสมของผลิตภัณฑ์และเมแทบอลิต์ที่สูงเกินไป ที่สำคัญสามารถดำเนินการเลี้ยงเซลล์ได้ยาวนานต่อเนื่อง ไม่จำเป็นต้องหยุดระบบเพื่อเตรียมเซลล์และเตรียมระบบใหม่เหมือนในระบบ batch ซึ่งจะก่อให้เกิดช่วงเวลาที่ไม่ว่างประโยชน์

4.8 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Protein A affinity chromatography

4.8.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ซึ่งสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บั่นแยกเซลล์ออก นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โปรตีน เอ และเครื่องแยกโปรตีน ÄKTAprime แสดงผลโดยโปรแกรม Prime View Evaluation เป็นดังโครมาโทแกรมรูปที่ 4.31 พีกที่เกิดขึ้นเป็นของแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ด้วยบัฟเฟอร์ซีเตรท 0.1 โมลาร์ pH 3.0

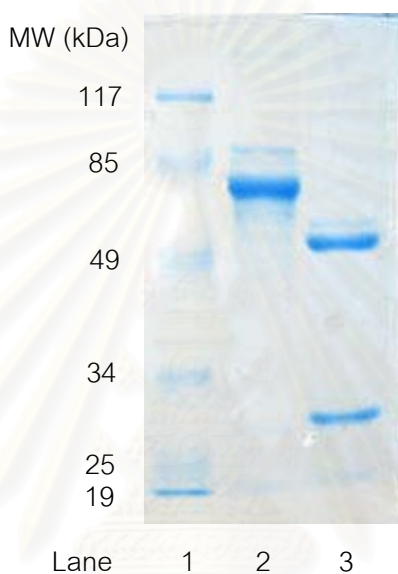


รูปที่ 4.31 โครมาโทแกรมแสดงการแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้คอลัมน์ Protein A sepharose ชะด้วยบัฟเฟอร์ซีเตรท 0.1 โมลาร์ pH 3.0 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากโครมาโทแกรมแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จึงได้เก็บรวมลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงรวมกัน นำไปไดอะไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอนเมตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอนติบอดีโดยวิธี BCA assay เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA (ภาคผนวก ก รูปที่ ก.3) พบว่า สารละลายแอนติบอดีที่ได้มีความเข้มข้น 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งเก็บแยกไว้เป็นส่วนๆ สำหรับใช้เป็นแอนติบอดีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณแอนติบอดี และสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมชุดตรวจสอบสาร enrofloxacin ตกค้างด้วยวิธี ELISA ในอนาคต

4.8.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ แล้ว มาตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE วิธีนี้จะมีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วนของ heavy chains และ light chains แยกออกจากกัน และแยกโปรตีนได้ตามขนาดของโมเลกุล ดังรูปที่ 4.32



รูปที่ 4.32 SDS-PAGE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนโรฟลอกซาซินหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography

Lane 1 = Standard protein marker (2.5 ไมโครลิตร)

Lane 2 = Fetal calf serum (5 ไมโครกรัม)

Lane 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี (IgG₁) หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้ว (5 ไมโครกรัม)

เมื่อนำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE เปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับแถบโปรตีนมาตรฐานเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า R_f กับน้ำหนักโมเลกุล (รูปที่ ก.6 ภาคผนวก ก) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี ประกอบด้วยแถบของสาย Heavy chain ขนาด 59.6 กิโลดาลตัน และแถบของสาย Light chain ขนาด 22.4 กิโลดาลตัน จากแบนที่ปรากฏพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง และไม่พบการปนเปื้อนของโปรตีนจากซีรัม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเรื่องความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์พบว่ามีความเข้มข้นที่ 3 มิลลิโมลาร์ และ 3 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นที่เริ่มมีผลต่อการผลิตแอนติบอดีมีค่าเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของแอมโมเนียและแลคเทตที่มีผลทำให้เซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 มีจำนวนเซลล์ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งมีค่าประมาณ 4.5 มิลลิโมลาร์ และ 6.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การเตรียมเซลล์ใน spinner flask ที่เหมาะสมที่สุด คือ การใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 1.00×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 200 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน จะให้เซลล์ไฮบริโดมาจำนวนมากกว่า 1.20×10^8 เซลล์ เพียงพอสำหรับเป็นเซลล์เริ่มต้นใน stirred-tank bioreactor และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยก่อนการถ่ายเซลล์ลงสู่ถัง ให้ปั่นแยกเก็บเอาเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทั้งนี้ลดการสะสมเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษ ได้แก่ แอมโมเนียและแลคเทต ซึ่งจะมีผลต่อลักษณะการเจริญของเซลล์ในถัง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ batch พบว่าค่า DO มีอิทธิพลต่อการเจริญ การผลิตแอนติบอดี การใช้กลูโคสและการเกิดของเสียของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 จากผลการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านมา สรุปได้ว่า การควบคุมค่า DO ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผล การเลี้ยงเซลล์ที่มีประสิทธิภาพที่สุด ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 9.21×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการผลิตแอนติบอดีจำเพาะสูงที่สุด และให้แอนติบอดีความเข้มข้น 67.33 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น productivity ของผลิตภัณฑ์สูงที่สุดเท่ากับ 11.22 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน มีอัตราการ ใช้กลูโคสและการผลิตแลคเทตจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 0.75 และ 0.58 นาโนกรัมต่อเซลล์ต่อวัน แต่ก็มี การสะสมของของเสีย ได้แก่ แลคเทตและแอมโมเนียสูงที่สุดด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตร และ 2.13 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ สามารถดำเนินการเลี้ยงเซลล์ได้นาน 5 วัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ fed-batch ศึกษาผลของการเติมสารอาหารหลักชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ ซีรัม กลูโคส กลูตามีน และกลูโคส ร่วมกับกลูตามีน ในระยะที่เซลล์ยังมีการเจริญอย่างเต็มที่อยู่ พบว่าไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ เลี้ยงเซลล์ ทั้งความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของแอนติบอดีและระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ และยัง

มี productivity ต่ำกว่าระบบ batch นอกจากนี้ การเติมกลูโคส และ/หรือกลูตามีน จนมีความเข้มข้นในถังสูง ยังเป็นการกระตุ้นการเกิดของเสียได้แก่ แลคเตตและแอมโมเนีย ในระดับที่เริ่มมีผลกระทบต่อ การเจริญและการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 อีกด้วย

การศึกษาการกระจายตัวของขนาดเซลล์ไฮบริโดมา โดยใช้วิธีวัดขนาดเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับขนาดของ grid line บน hemacytometer พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่มีชีวิตมีขนาดกระจายตัวอยู่ในช่วง 8.75-26.25 ไมโครเมตร คิดเป็นค่าเฉลี่ย 16.67 ± 2.20 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ตายจะมีขนาดโดยเฉลี่ย 15.39 ± 2.21 ไมโครเมตร เล็กกว่าเซลล์มีชีวิตเล็กน้อย เมื่อนำขนาดเซลล์มาเปรียบเทียบกับขนาดรูพรุนของ spin filter ซึ่งมีขนาดสม่ำเสมอเท่ากับ 20 ไมโครเมตร พบว่ามีสัดส่วนขนาดรูพรุนต่อขนาดเซลล์ (porosity) เท่ากับ 1.20 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์ระบบ perfusion สามารถกักกันเซลล์ได้สูงและไม่เกิดการอุดตันของ filter ได้ง่าย เมื่อดำเนินการเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน

การศึกษาประสิทธิภาพในการกักกันเซลล์ของ spin filter โดยแปรค่าปัจจัยที่สำคัญ 2 เรื่อง ได้แก่ อัตราการหมุนของ spin filter และอัตราการหมุนเวียนอาหารผ่าน spin filter โดยใช้เซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 เป็นอนุภาคสำหรับการศึกษาโดยตรง พบว่าประสิทธิภาพการกักกันเซลล์สูงสุดเมื่อ กำหนดความเร็วเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ให้ค่าสูงถึง 81.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ perfusion rate 0.25 vvd ส่วนที่ perfusion rate สูงขึ้นจะให้ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์น้อยกว่า perfusion rate ต่ำ และ perfusion rate สูง 0.50-1.00 vvd จะให้ผลการกักกันเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ใน stirred-tank bioreactor ระบบ semi-continuous perfusion ร่วมกับการใช้ spin filter โดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตสูงขึ้นสูงถึง 1.01×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และคงที่ที่ภาวะสมดุลประมาณ $1.00-2.00 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในช่วง 2 วันแรก จากนั้นจึงมีค่าคงที่ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพในการกักกันเซลล์ของ spin filter มีค่าลดลงจาก 61.6 เหลือ 5.6 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาเพียง 10 วัน แสดงให้เห็นว่า ระบบนี้ทำให้ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ของ spin filter ลดลง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ENRO 44 ระบบ Continuous perfusion เป็นระบบที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ระบบนี้ จะมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยการทำงานของ peristaltic pump ให้ประสิทธิภาพการกักกันเซลล์ที่สูงถึง 70-90 เปอร์เซ็นต์เมื่อกำหนด perfusion rate อยู่ในช่วง 0.10-0.80 vvd การเจริญของเซลล์จะขึ้นกับ perfusion rate โดยที่เมื่อกำหนด perfusion rate 0.80 vvd เซลล์ไฮบริโดมาจะมีระยะการเจริญได้นานขึ้นกว่า perfusion rate ต่ำ มี

ความเข้มข้นเซลล์สูงถึง 1.57×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และสามารถดำเนินการเลี้ยงเซลล์ได้เป็นระยะเวลายาวนาน อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของแอนติบอดีใกล้เคียงกันในแต่ละค่า perfusion rate คือประมาณ 70.0-80.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ก็สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ต่อวันได้ปริมาณสูงกว่า เก็บเกี่ยวได้ 73.69 มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อลดความเข้มข้นของ FCS ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะมีการเจริญและมีความเข้มข้นของแอนติบอดีลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบในด้านต้นทุนการผลิตแอนติบอดีในเรื่องอาหาร จะมีมูลค่าลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน เป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาได้เป็นอย่างดี เนื่องจากการควบคุมภาวะที่เหมาะสมแก่เซลล์ การติดตามความเปลี่ยนแปลง การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และการขยายขนาดสามารถทำได้โดยง่าย โดยการเลี้ยงเซลล์ระบบ continuous perfusion ที่มี spin filter ทำหน้าที่เป็นอุปกรณ์ในการกักกันเซลล์ ช่วยให้การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมามีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ ผลผลิตต่อวัน และอัตราการผลิตต่อหน่วย (productivity) ให้สูงขึ้นได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการเลี้ยงเซลล์ในระบบ perfusion พบว่า ความเข้มข้นของแลคเทตและแอมโมเนียยังคงมีค่าสูง ถึงแม้ว่าจะเพิ่ม perfusion rate ให้สูงขึ้น ความเข้มข้นของแลคเทตและแอมโมเนียจะมีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ไฮบริโดมา วิธีหนึ่งในการลดการผลิตของเสีย 2 ชนิดนี้ลงได้ คือ การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสและกลูตามีนภายในถังให้มีความเข้มข้นอยู่ในระดับต่ำ โดยอาจใช้วิธีการปรับสูตรอาหารที่ใช้ในการเปลี่ยนถ่ายให้มีความเหมาะสมขึ้น เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของกลูโคส และกลูตามีนภายในถังสูงเกินไป

2. กลยุทธ์หนึ่งในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ การปรับกระบวนการเติมอาหารให้เหมาะสมแก่ความต้องการของเซลล์ในขณะนั้นได้อย่างรวดเร็ว อาจใช้ค่าตัวแปรที่ติดตามได้ง่ายในการกำหนดอัตราการเติมอาหาร เช่น ค่า oxygen uptake rate, glucose consumption rate เป็นต้น ทั้งนี้อาจจะต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรกับเมแทบอลิซึมของเซลล์

3. การใช้ระบบการเลี้ยงเซลล์มากกว่า 1 หน่วย และดำเนินการต่อเนื่องกัน เพื่อให้มีการใช้อาหารคุ่มค่ามากขึ้น และอาจเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- มนัสพงศ์ ชูศรี. 2005. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนโรฟลอกซาซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาพร บานชื่น, ทศนีย์ สุโกศล, ธารารักษ์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิริวิไล. 2537. ในอิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ภาษาอังกฤษ

- Al-Rubeai, M., Singh, R.P. 1998. Apoptosis in cell culture. Curr. Opin. Biotechnol. 9 : 152-156.
- Arathoon, W.R. Birch, J.R. 1986. Large-scale cell culture in biotechnology. Science. 232 : 1390-1395.
- Banik, G.G., Heath, C.A. 1994. An investigation of cell density effects on hybridoma metabolism in a homogeneous perfusion reactor. Bioprocess Eng. 11 : 229-237.
- Banik, G.G., and Health, C.A. 1995. Hybridoma growth and antibody production as a function of cell density and specific growth rate in perfusion culture. Biotechnol. Bioeng. 48(3) : 289-300.
- Bertino, J.Jr., Fish, D. 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. Clin. Ther. 22(7) : 798-817 ; discussion 797.
- Bierau, H., Perani, A., Al-Rubeai, M., Emery, A.N. 1998. A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with Hybridomas modified for inhibited apoptotic response. J. Biotechnol. 62 : 195-207.
- Blasey, H.D., Jäger, V. 1991. Strategies to increase the efficiency of membrane aerated and perfused animal cell bioreactors by an improved medium perfusion. In: Sasaki R,

- Ikura K, editors. Animal Cell Culture and Production of Biologicals: Kluwer Academic Publishers. 61–73.
- Blohm, D., Bollschweiler, C., Hillen, H. 1988. Pharmaceutical proteins. Angew. Chem. 27 : 207-221.
- Boraston, R., Thompson, P. W., Garland, S., Birch, J. R. 1984. Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. Dev. Biol. Stand. 55 : 103–111.
- Bruce, M.P., Boyd, V., Duch, C., White, J.R. 2002. Dialysis-based bioreactorsystems for the production of monoclonal antibodies—Alternatives to ascites production in mice. J. Immunol. Methods. 264 : 59-68.
- Carswell, K.S., Papoutsakis, E.T. 2000. Culture of human T cells in stirred bioreactors for cellular immunotherapy applications: shear, proliferation, and the IL-2 receptor, Biotechnol. Bioeng. 68 : 328-338.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A. 2002. Cell retention devices for suspended–cell perfusion cultures. In: Scheper T, editor. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin Heidelberg: Springer–Verlag. 129–169.
- Chatzisavido, N., Björling, T., Fenge, C., Boork, S., Lindner–Olsson, L., Apeiman, S. 1994. A continuous cell centrifuge for lab scale perfusion processes of mammalian cells. In: al. TKe, editor. Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects: Kluwer Academic Publishers. 463–468.
- Chen, Z., Chen, Y., Chen, J., Shen, C. 1992. Effects of ammonium and lactate on hybridoma cell growth and metabolism. Chin. J. Biotechnol. 8(4) : 255-61.
- de la Broise, D., Noiseux, M., Lemieux, R., Massie, B. 1991. Long–term perfusion culture of hybridoma: A "grow or die" cell cycle system. Biotechnol. Bioeng. 38:781–787.
- Deo, Y.M., Mahadevan, M.D., and Fuchs, R. 1996. Practical considerations in operation and scale-up of spin-Filter based bioreactors for monoclonal antibody Pproduction. Biotechnol. Prog. 12 : 57-64.

- Doblhoff-Dier, O., Gaida, T., Katinger, H., Burger, W., Gröschl, M., Benes E. 1994. A novel ultrasonic resonance field device for the retention of animal cells. Biotechnol. Progr. 10 : 428-432.
- Dorresteyn, R.C., Numan, K.H., de Gooijer, C.D., Tramper, J., Beuvery, E.C. 1996. On-line estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations. Biotechnol. Bioeng. 50 : 206-214.
- Dong, H., Tang, Y.J., Ohashi, R., and Hamel, J.F.P. 2005. A perfusion culture system using a stirred ceramic membrane reactor for hyperproduction of IgG_{2a} monoclonal antibody by hybridinacells. Biotechnol. Prog. 21 (1) : 140-147.
- Doverskog, M., Ljunggren, J., Öhman, L., Häggström, L. 1997. Physiology of cultured animal cells. J. Biotechnol. 59 : 103-115.
- Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science. 122 : 501-504.
- Emery, A.N., Jan, D.C.H., Al-Rubeai, M. 1995. Oxygenation of intensive cell-culture system. Appl. Microbiol. Biot. 43 : 1028-1033.
- Esclade, L.R.J., Carrel, S., Péringer, P. 1991. Influence of the screen material on the fouling of the spin filters. Biotechnol. Bioeng. 38 : 159-168.
- Eyer, K., Oeggerli, A., Heinzle, E. 1995. On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine. Biotechnol. Bioeng. 45:54-62.
- Falkenberg, F.W. 1998. Monoclonal antibody production: Problems and solutions. 74th Forum in Immunology. Res. Immunol. 149 : 542-547.
- Favre, E. 1993. Constant Flow-Rate Filtration of Hybridoma Cells Suspensions. J. Chem. Technol. Biot. 58(2) : 107-112.
- FDA. 2000. Enrofloxacin for poultry: opportunity for hearing. Federal Register. 65 : 64954-65.
- Fewcett, J.K., and Scott, J.E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. J. Chin. Path. 13 : 156-159
- Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., Xie, L., Tang, H., Chen, Z. 2006. Application of "oxygen uptake rate-amino acids" associated mode in controlled-fed perfusion culture. J. Biotechnol. 122 : 422-430.

- Fenge, C., Klein, C., Heuer, C., Siegel, U., Fraune, E. 1993. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. Cytotechnology. 11: 233–244.
- Freshney, R. L. 2005. Culture animal : a manual of basic technique. 5th ed. United States of America : A John Wiley & Sons.
- Ganzeveld, K.J., Chisti, Y., Moo-Young, M. 1995. Hydrodynamic behaviour of animal cell microcarrier suspensions in split-cylinder airlift bioreactors. Bioproc. Eng. 12 : 239–247.
- Glacken, M.W., Fleischaker, R.J. and Sinskey, A.J. 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. Biotechnol. Bioeng. 28 :1376-1389.
- Gregory, P.A., Louis, M.W. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. Nature Biotechnology. 23 : 1147 – 1157.
- Griffiths, J.B. 1992. Animal cell culture processes – batch or continuous. J. Biotechnol. 22 : 21–30.
- Griffiths, J.B. 2000. Animal cell products, overview. In : Spier R.E. (Ed.). Encyclopedia of cell technology. Vol 1, New York: Wiley, 71-76.
- Grima, E.M., Chisti, Y., Moo-Young, M. 1997. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. J. Biotechnol. 54 : 195-210.
- Hauser, H. 1997. Heterologous expression of genes in mammalian cells. In: Hauser H, Wagner R. (Eds.). Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin : Walter de Gruyter, 3-32.
- Himmelfarb, P, Thayer, P.S., Martin, H.E. 1969. Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension. Science. 164 : 555–557.
- Hudson, L., and Hay, F.C. 1980. Practical immunology. Blackwell Scientific publica tion. London.
- Iding, K., Lütkemeyer, D., Fraune, E., Gerlach, K., Lehmann, J. 2000. Influence of alterations in culture condition and changes in perfusion parameters on the retention performance of a 20 μ m spinfilter during a perfusion cultivation of a recombinant CHO cell line in pilot scale. Cytotechnology. 34 : 141–150.

- Jäger, V. 1996. Perfusion bioreactors for the production of recombinant proteins in insect cells. Cytotechnology. 20 : 191–198.
- Jan, D.C.H, Emery, A.N., Al-Rubeai, M. 1992. Optimization of spin-filter performance in the intensive culture of suspended cells. In: Spier RE, Griffiths JB, MacDonald C, editors. Animal cell technology: developments, processes and products. Oxford: Butterworth–Heinemann. 448–451.
- Jang, J.D., Barford, J.P. 2000. Effect of feed rate on growth rate and antibody production in the fed-batch culture of murine hybridoma cells. Cytotechnology. 32 : 229-242.
- Kawahara, H., Mitsuda, S., Kumazawa, E., Takeshita, Y. 1994. High-density culture of FM-3A cells using a bioreactor with an external tangential-flow filtration device. Cytotechnology. 14 : 61–66.
- Kilburn, D.G., Lilly, M.D., Webb, F.C. 1969. The effect of dissolved oxygen partial pressure on the growth and metabolism of mouse LS cell. J. Cell Sci. 4 : 25-37.
- Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497.
- Kummerer, K. 2004. Resistance in the environment. J. Antimicrob. Chemother. 54(2): 311-20.
- Kretzmer, G. 2002. Industrial processes with animal cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 : 135-142.
- Kroner, K.H., Nissinen, V. 1988. Dynamic filtration of microbial suspensions using an axially rotating filter. J. Membrane Sci. 36:85–100.
- Kummerer, K. 2004. Resistance in the environment. J. Antimicrob. Chemother. 54 (2) : 311-20.
- Kurokawa, H., Park, Y. S., Iijima, S., and Kobayashi, T. 1994. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. Biotechnol. Bioeng. 4(1) : 95-103.
- Lee, I., Radosevich, J.A., Ma, Y.X., Combs, S.G., Rosen, S.T., Gould, V.E. 1985. Immunohistochemical analysis of human pulmonary carcinomas using monoclonal antibody 44-3A6. Cancer Res. 45 (11/ 2) : 5813-7.

- Lehmann, J., Vorlop, J., Büntemeyer, H. 1988. Bubble-free reactors and their development for continuous culture with cell recycle. Animal Cell Biotechnology 3 : 221-237.
- Leist, C.H., Meyer, H-P., Fiechter, A. 1990. Potential and problems of animal cells in suspension cultures. J. Biotechnol. 15 : 1-46.
- Levintow, L., Eagle, H. 1961. Biochemistry of cultured mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 30 : 605-640.
- Maiorella, B., Dorin, G., Carion, A., Harano, D. 1991. Cross-flow microfiltration of animal cells. Biotechnol. Bioeng. 37(2) : 121-126.
- McKeehan, W.L. 1986. Glutaminolysis in Animal Cells. In Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells; Morgan, M. J., Ed.; Plenum Press: New York. 111-150.
- Meilhoc, E., Wittrup, K.D., Bailey, J.E. 1990. Influence of dissolved oxygen concentration on growth, mitochondrial function and antibody production of hybridoma cells in batch culture. Bioproc. Eng. 5: 263-274.
- Mercille, S., Johnson, M., Lemieux, R., Massie, B. 1994. Filtration-based perfusion of hybridoma cultures in protein-free medium: Reduction of membrane fouling by medium supplementation with DNase I. Biotechnol. Bioeng. 43 : 833-846.
- Mercille, S., Massie, B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. Biotechnol. Bioeng. 44 : 1140-1154.
- Miller, W.M., Wilke, C.R., Blanch, H.W. 1987. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. J. Cell Physiol. 132(3) : 524-530.
- Miller, W.M., Wilke, C. R., and Blanch, H.W. 1989. Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. Biotechnol. Bioeng. 33, 477-486.
- NRC [National Research Council]. 1999. Monoclonal Antibody Production. Washington DC: National Academy Press.
- Omasa, T., Ishimoto, M., Higashiyama, K., Shioya, S., and Suga, K. 1992. The enhancement of specific antibody production rate in glucose- and glutamine-controlled fed-batch culture. Cytotechnology. 8(1) : 75-84.

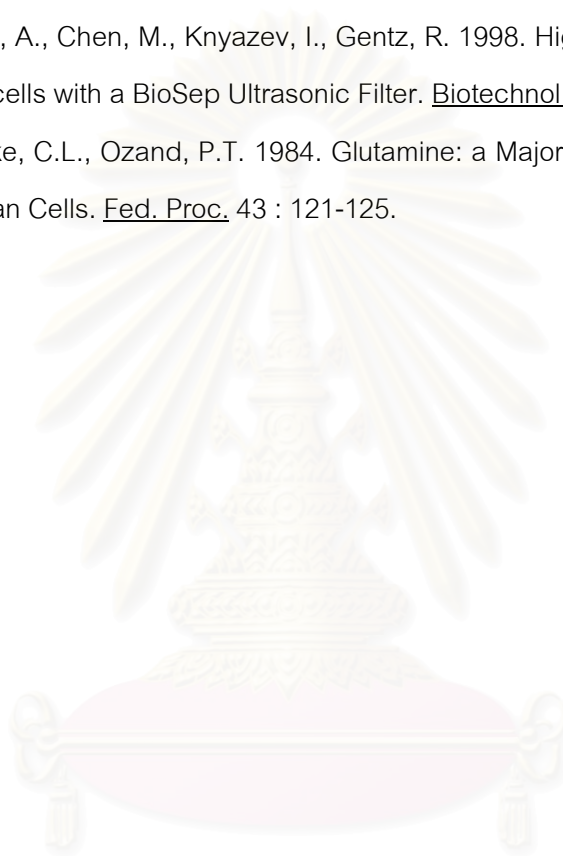
- Ozturk, S.S., and Palsson, B.O. 1990. Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. Biotechnol. Prog. 6(6) : 437-446.
- Ozturk, S.S., Palsson, B.O. 1990. Loss of Antibody Production During Long-term Cultivation of a Hybridoma Cell Line in Low-serum and Serum-free Media. Hybridoma. 9 : 167-175.
- Ozturk, S.S., and Palsson, B.O. 1991. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture : 1. Analysis of data from controlled batch reactors. Biotechnol. Prog. 7(6) : 471-480.
- Ozturk, S.S., and Palsson, B.O. 1991. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. Biotechnol. Prog. 7(6) : 481-494.
- Ozturk, S.S., Palsson, B.O. 1991. Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serumfree medium. Biotechnol. Bioeng. 37 : 35-46.
- Ozturk, S.S., Riley, M.R., Palsson, B.O. 1992. Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism and Antibody Production. Biotechnol. Bioeng. 39(4) : 418-431.
- Phillips, H. A., Scharer, J. M., Bols, N. C., Moo-Young, M. 1987. Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture. Biotechnol. Lett. 9 : 745-750.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J. Antimicrob. Chemother. 53(1): 28-52.
- Pretlow, T.G., Pretlow, T.P. 1982. Cell separation. Methods and selected applications. London : Academic Press.
- Pringle, A.T. 1992. Fermentation and mammalian cell culture. In: Klegerman, M.E., Groves, M.J. (Eds.). Pharmaceutical biotechnology, fundamentals and essentials. Interpharm Press, 115-137.

- Prior, C.P., Doyle, K.R., Duffy, S.A., Hope, J.A., Moellering, B.J., Prior, G.M., Scott, R.W., Tolbert, W.R. 1989. The recovery of purified biopharmaceuticals from perfusion cell culture bioreactors. J. Parent. Sci. Techn. 43 : 15–23.
- Prokop, A., Rosenberg, M.Z. 1989. Bioreactor for mammalian cell culture. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 39 : 29–71
- Reitzer, L.J., Wice, B. M., Kennel, D. 1979. Evidence that glutamine not sugar is the major energy source for cultured HeLa cells. J. Biol. Chem. 154 : 2669-2676
- Reuveny, S., Velez, D., Miller, L., Macmillan, J.D. 1986. Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. J. Immunol. Methods. 86 : 61–69.
- Reuveny, S., Velez, D., Maemillan, J.D. and Miller, L. 1986. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. J. Immunol. Methods. 86 : 53-59.
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J.D., and Miller, L. 1987. Factors affecting monoclonal antibody production in culture. Dev. Bio. Stand. 66:169-75.
- Roda A., Manetta A.C., Piazza F., Simoni P., and Lelli R. 2000. A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for clenbuterol. Talanta. 52 : 311-318.
- Ryll, T., Dutina, G., Reyes, A., Gunson, J., Krummen, L. 2000. Performance of small– scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. Biotechnol. Bioeng. 69(4):440–449.
- Sandig, V., Rose, T., Winkler, K., Brecht, R. 2005. Mammalian cells. In: Gellissen, G. (Eds.). Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic systems. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 233-252.
- Schneider, M., El Alaoui, M., von Stockar, U., Marison, I. 1997. Batch cultures of a hybridoma cell line performed with in situ ammonia removal. Enzyme Microb. Tech. 20:268–276.

- Seamans, T.C., and Hu, W.S. 1990. Kinetics of growth and antibody production by hybridoma cell line in a perfusion culture. J. Ferment. Bioeng. 70(4) : 241-245.
- Siegel, U., Fenge, C., Fraune, E. 1991. Spin filter for continuous perfusion of suspension cells. In: Murakami H, Shirahata S, Tachibana H, editors. Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects. Fukuoka, Japan: Kluwer Academic Publishers. p 434–436.
- Singh, R.P., Al-Rubeai, M., Gregory, C.D., Emery, A.N. 1994. Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. Biotechnol. Bioeng. 44 : 720-726.
- Snary, E.L., Kelly, L.A., Davison, H.C., Teale, C.J., Wooldridge, M. 2004. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. J. Antimicrob. Chemother. 53(6) : 906-17.
- Spier, R.E. 2000. History of animal cell technology. In: Spier R.E. (Ed.). Encyclopedia of cell technology. Vol. 2, New York : Wiley : 853-872.
- Stern, M., Herrmann, R. 2005. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 54 (1) : 11-29.
- Su, W.W. 2000. Bioreactors, perfusion. In: Spier R.E. (Eds.). Encyclopedia of cell technology. Vol 1, New York : Wiley, 230-242.
- Tennant, J.R. 1964. Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation 2 : 685–694.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 2002. Committee for veterinary medicinal products, Enrofloxacin, Summary report (5).
- Thomus, J.N. 1986. Nutrients, oxygen, and pH. In Mammalian Cell Technology. Thilly, W.G. (Eds.), Butterworths : Boston. 199-221.
- Tokashiki, M., Arai, T., Hamamoto, K., Ishimaru, K. 1990. High density culture of hybridoma cells using a perfusion culture vessel with an external centrifuge. Cytotechnology. 3 : 239–244.
- Tokashiki, M., Takamatsu, H. 1993. Perfusion culture apparatus for suspended mammalian cells. Cytotechnology. 13:149–159.

- Tokashiki, M., Yokoyama, S. 1997. Bioreactors designed for animal cells. In: Hauser, H. and Wagner, R. (Eds.), *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, Walter de Gruyter, Berlin. 279-317.
- Tolbert, W.R., Feder, J., Kimes, R.C. 1981. Large-scale rotating filter perfusion system for high-density growth of mammalian suspension cultures. *In Vitro Cell Dev.* 17(10) : 885-890.
- Trampler, F., Sonderhoff, S.A., Pui, P.W.S., Kilburn, D.G., Piret, J.M. 1994. Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells. *Bio-Technol.* 12(3) : 281-284.
- Velez, D., Reuveny, S., Miller, L., Macmillan, J.D. 1987. Effect of feeding rate on monoclonal antibody production in a modified perfusion-fed fermentor. *J. Immunol. Methods.* 102 : 275-278.
- Velez, D. 1989. Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* 33:938-940.
- Vetterlein, D. 1989. Monoclonal antibodies : production, purification and technology. *Adv. Clin. Chem.* 27 : 303-354.
- Vogel, J.H., Anspach, F.B., Kroner, K.H., Piret, J.M., Haynes, C.A. 2002. Controlled shear affinity filtration (CSAF): a new technology for integration of cell separation and protein isolation from mammalian cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 78:805-813.
- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P.-A., Baer, G., Kadouri, A. 2003. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 82(7) : 751-765.
- Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., and Tsuji A. 2002. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst.* 127:98-103.
- Werner, R.G., Walz, F., Noé, W., Konrad, A. 1992. Safety and economic aspects of continuous mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* 22:51-68.
- Yabannavar, V.M., Singh, V., Connelly, N.V. 1992. Mammalian cell retention in a spinfilter perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 40:925-933.

- Yabannavar, V.M., Singh, V., Connelly, N.V. 1994. Scaleup of spinfilter perfusion bioreactor for mammalian cell retention. Biotechnol. Bioeng. 43(2):159–164.
- Yang, J.D., Angelillo, Y., Chaudhry, M., Goldenberg, C., and Goldenberg, D.M. 2000. Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. Biotechnol. Bioeng. 69(1) : 74-82.
- Zhang, J., Collins, A., Chen, M., Knyazev, I., Gentz, R. 1998. High-density perfusion culture of insect cells with a BioSep Ultrasonic Filter. Biotechnol. Bioeng. 59(3) : 351–359.
- Zielke, H.R., Zielke, C.L., Ozand, P.T. 1984. Glutamine: a Major Energy Source for Cultured Mammalian Cells. Fed. Proc. 43 : 121-125.



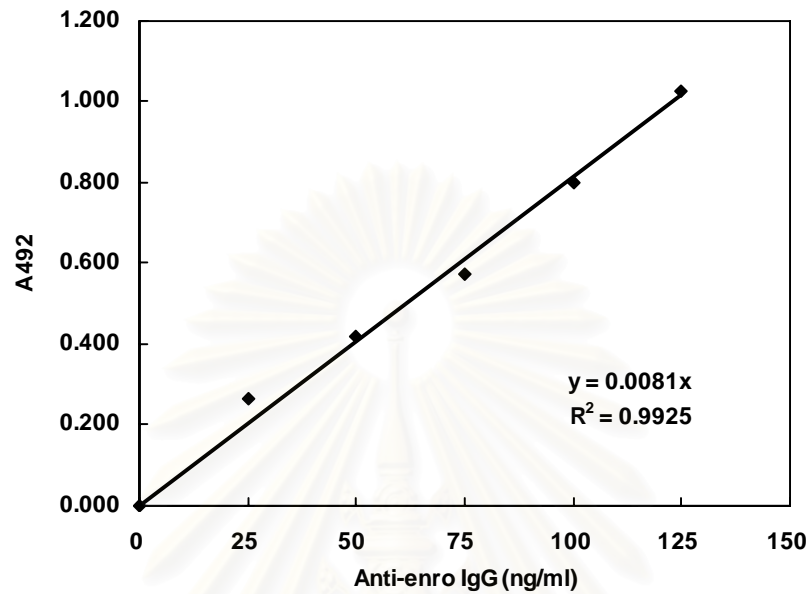
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



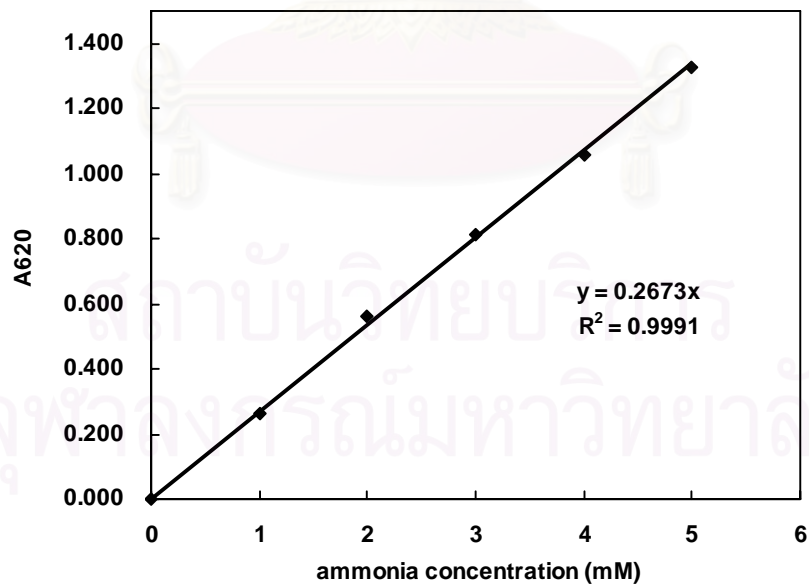
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

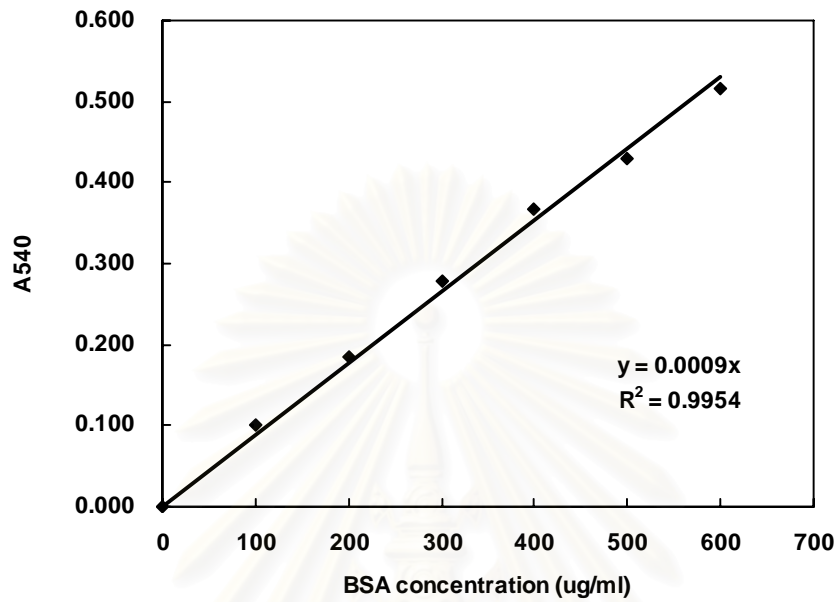
ภาคผนวก ก



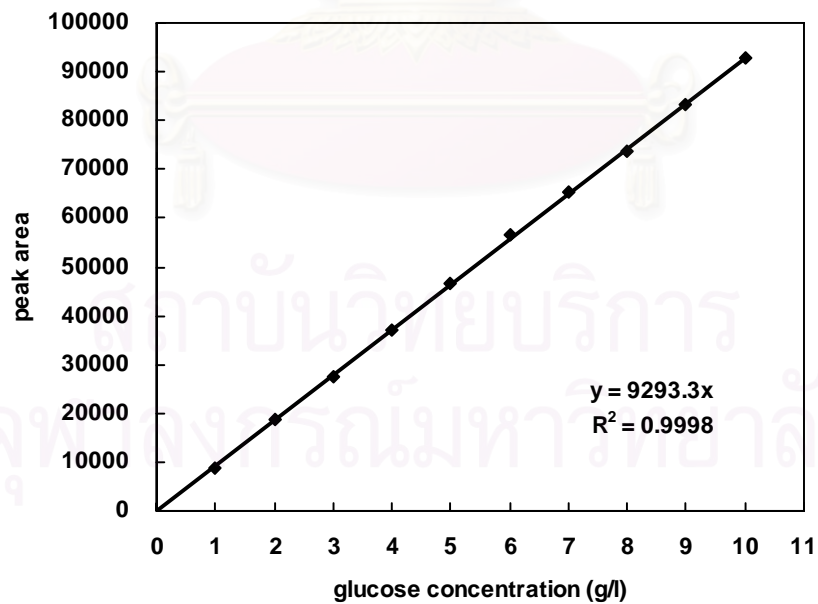
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส ENRO 44 ต่อแอนโรฟลอกซาซิน ที่ความเข้มข้น 0 – 150 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



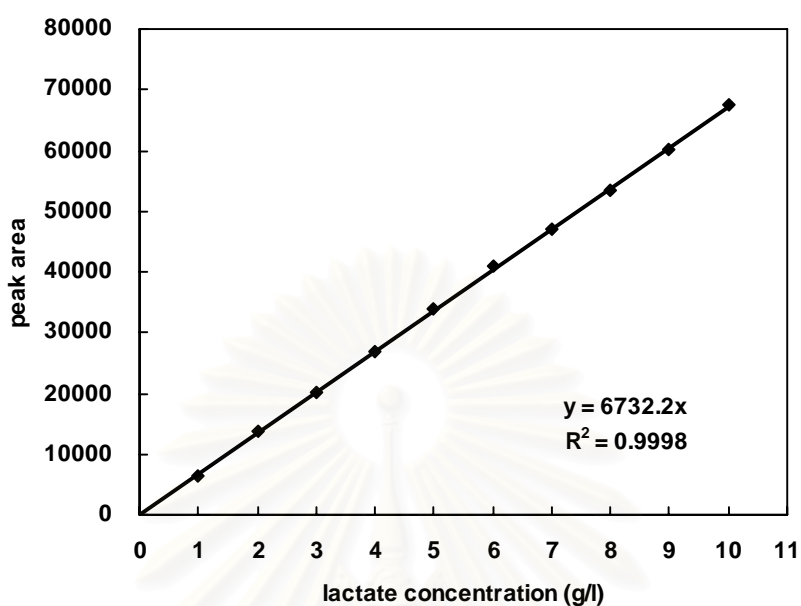
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแอมโมเนีย ด้วยวิธี Indophenol blue reaction ความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิโมลาร์ (Fewcett และคณะ, 1960)



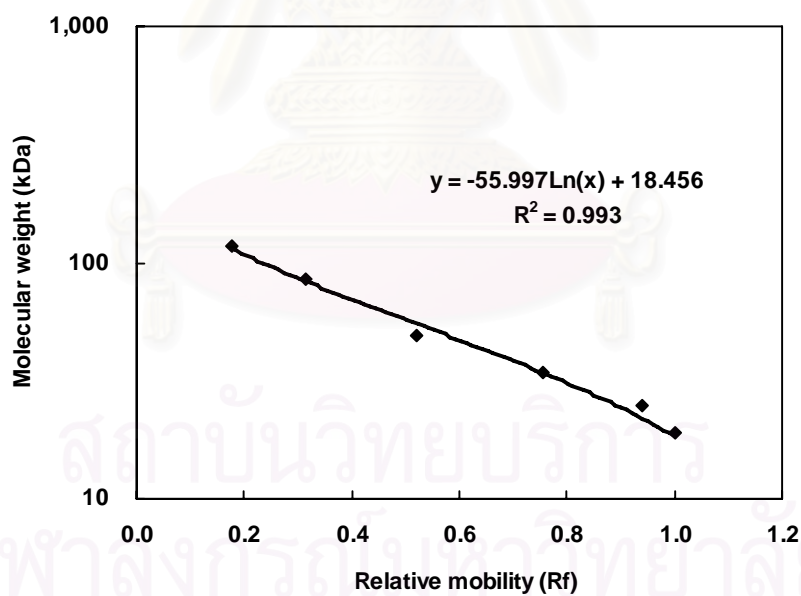
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยวิธี BCA



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกลูโคสความเข้มข้น 0–10 กรัมต่อลิตร กับพื้นที่ใต้พีค ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของแลคเตตความเข้มข้น 0–10 กรัมต่อลิตร ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ ก.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับ น้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของไมโนโคลนอลแอนติบอดี (หลังจากทำให้บริสุทธิ์) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

RPMI 1640	10.4	กรัม
NaHCO ₃	2.0	กรัม
L-glutamine	0.1	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Sodium pyruvate	0.11	กรัม
Penicillin G Sodium	1000000	ยูนิต
Streptomycin sulfate	1	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water)	1	ลิตร

กรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ผสม FCS 10 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมน้ำยาแช่แข็งเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	65	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	25	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายสำหรับการเชื่อมเอนโรฟลอกซาซินกับ BSA

0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
NaHCO ₃	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M citrate buffer pH 3

Citric acid	0.1	M
Na ₂ HPO ₄	0.1	M

ไตเตรตกรดด้วยต่างจนได้ pH 3 กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M Phosphate buffer pH 8

ชั่ง NaH ₂ PO ₄	13.8	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ชั่ง Na ₂ HPO ₄	35.8	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 8 กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 1 M Tris HCl buffer pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
HCl	1.0	M

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 9.0 กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายสำหรับใช้วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี BCA

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม

น้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร

BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท

PIERCE) ก่อนใช้ผสม Reagent A : B ในอัตราส่วน 50:1

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสและแลคเตตด้วย HPLC

1. สารละลายกลูโคสและแลคเตตมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร

Glucose 0.2 กรัม

Calcium-L-lactate pentahydrate 0.3422 กรัม

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 100 มิลลิลิตร

กรองด้วยเมมเบรน Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. สารละลายตัวพา

H₂SO₄ 96 เปอร์เซ็นต์ 0.278 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 1000 มิลลิลิตร

กรองผ่านเมมเบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมโครเมตร กำจัดฟองอากาศด้วย sonicator 30 นาที ก่อนใช้

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ (Tennant, 1964)

สารละลาย Trypan blue 0.4 เปอร์เซ็นต์

Trypan blue 0.4 กรัม

NaCl 0.01 กรัม

K₂HPO₄ 0.06 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

การเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer (Stock reagent)

ชั่ง NaH_2PO_4	27.6	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ชั่ง Na_2HPO_4	71.63	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock 0.2 M Phosphate buffer

2. 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1.0	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	19	ลิตร

อาจเติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ Thimerosal (preservative) 20 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกรองสารละลาย แล้วเก็บใส่ถังสีขาว

3. 5 เปอร์เซ็นต์ นมพร่องมันเนย (Blocking solution)

นมพร่องมันเนย mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

4. 0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0

Na_2HPO_4	11.9	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Citric acid	7	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตต่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 เก็บใส่ขวดสีขาว ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

5. Substrate OPD

O-phenylenediamine	0.04	กรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer pH 5.0	100	มิลลิลิตร
30 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีขาว) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

6. 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของแอมโมเนีย

1. สารละลายมาตรฐาน NH_4Cl 1.0 M

NH_4Cl 53.49 มิลลิกรัม

อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริด 1 มิลลิลิตร

เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-7 mM ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริด

2. Sodium phenate

Phenol A.R. 25.0 กรัม

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 800 มิลลิลิตร

4N NaOH 78 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น ไม่ควรใช้เมื่อสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นำออกมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้

3. Sodium nitroprusside 1 เปอร์เซ็นต์

Sodium nitroprusside 1 กรัม

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 100 มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

4. Sodium nitroprusside 0.01 เปอร์เซ็นต์

Sodium nitroprusside 1 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 100 มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

5. Sodium hypochlorite ประมาณ 0.02 N

Clorox (NaOCl 6 เปอร์เซ็นต์) 25 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปลอดประจุ (deionized distilled water) 75 มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stacking and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separating gel (10%)
distill water	1.46	4.8
40% Acrylamide gel	0.25	2.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	2.5
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	-
10% SDS	0.02	0.1
10% APS	0.02	0.1
TEMED	0.002	0.004
final volume (ml)	2	10

2. Sample buffer

SDS	2	%
Bromophenol blue	0.01	%
Glycerol	10	%
beta-mercaptoethanol	10	%
60 mM Tris (pH 6.8)		

3. Running buffer(1X) 1 L

Tris	3.02	กรัม
Glycine	18.8	กรัม
SDS	1.0	กรัม

4. Coomassie brilliant blue (250 ml)

Coomassie Brilliant blue R-250	0.25	%
Methanol	50	%
Acetic acid	10	%

5. Destaining solution (1 L)

Methanol	5	%
Acetic acid	10	%

ภาคผนวก ค

การคำนวณ

การคำนวณราคาต้นทุนต่อแอนติบอดีที่ผลิตได้

$$\text{ราคาต้นทุน (บาทต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{ราคาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ไปในแต่ละวัน}}{\text{ปริมาณแอนติบอดีที่เก็บเกี่ยวได้}}$$

มูลค่าที่นำมาคำนวณนี้เป็นมูลค่าเฉพาะส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ไปในแต่ละวันตั้งแต่เริ่มการเลี้ยงระบบ continuous perfusion โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์มีราคา 880 บาทต่อลิตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์มีราคา 480 บาทต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายชัชวาล อุดมโชคมงคล เกิดเมื่อวันที่ 13 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด สุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย