กนกวรรณ เลาหลิดานนท์ : การผลิตและคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ LDL ของมนุษย์ และบทบาทของ mm-LDL ต่อกลไกการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN LDL AND THE ROLE OF MM-LDL IN ATHEROSCLEROSIS PROGRESSION). อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา ขันแก้วหล้า, 180 หน้า.

ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง LDL mm-LDL โมโนโคลนอลแอนติบอดี การตรวจวัดปริมาณ LDL ในน้ำเลือดแบบตรง เมทริกเมทัลโลโปรตีเนส โฟมเซลล์

ระดับของ LDL ที่สูงเป็นหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงหลักของพยาธิสภาพการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง วิธีทั่วไปที่ใช้ในการตรวจวัดระดับ LDL ในน้ำเลือดในโรงพยาบาล คือ การคำนวณจากสมการของ Friedewald อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัดโดยขึ้นกับระดับของไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด ดังนั้น เทคนิคจำนวนมากจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดนี้ การศึกษานี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ LDL ของมนุษย์ จำนวน 7 โคลน ถูกผลิตขึ้นโดยเทคนิคไฮบริโดมามาตรฐาน และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ อะโพลิโพโปรตีนชนิดบี 100 (apoB-100) ที่ปรากฏบนอนุภาคของ LDL จากโคลนเหล่านี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลน ที่จับกับตำแหน่งบนแอนติเจนที่จำเพาะต่างกัน คือ โคลน hLDL-E8 (IgG_1) และ hLDL-2D8 (IgG_{2b}) ถูกเลือกสำหรับการพัฒนาเทคนิคตรวจวัดระดับ LDL แบบตรงบนพื้นฐานของเทคนิคแซนด์วิช ELISA เนื่องจาก apoB-100 ไม่ได้ปรากฏบนอนุภาคของ LDL เพียงอย่างเดียว ดังนั้น LDL จะถูกทำให้ตกตะกอนโดยสารเฮพาริน/ซิเตรต ก่อนการหาปริมาณ เพื่อเปรียบเทียบระดับของ LDL ที่ได้จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้น กับระดับของ LDL ที่ได้จากโรงพยาบาล ตัวอย่างน้ำเลือดแบบสุ่มจำนวน 208 ตัวอย่างจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีถูกนำมาตรวจสอบหาปริมาณ พบว่า ค่าเฉลี่ยที่ได้จากเทคนิคที่พัฒนาขึ้น คือ 126.6±43.1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ช่วง 90.0 ถึง 258.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยที่ได้จากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คือ 123.2±42.3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ช่วง 34.0 ถึง 236.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นแสดงความเกี่ยวเนื่องสหสัมพันธ์ที่สูงระหว่างเทคนิคที่พัฒนาขึ้นและจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.8491 ค่าความน่าจะเป็น < 0.0001) เป็นที่น่าสังเกตว่า ระดับของไตรกลีเซอไรด์ไม่มีอิทธิพลต่อการหาปริมาณของ LDL โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ดังนั้น เราได้นำเสนอเทคนิคทางเลือกสำหรับตรวจวัดปริมาณ LDL ในน้ำเลือด

แบบตรง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นเอง แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่ง่ายและเหมาะสมสำหรับการทดสอบประจำในห้องปฏิบัติการ จำเป็นที่จะต้องถูกปรับปรุงให้ดีขึ้น

LDL สามารถถูกออกซิไดซ์อย่างเป็นขั้นตอน LDL ที่ถูกเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (mm-LDL) เฉพาะส่วนของไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ และ LDL ที่ถูกออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์ (ox-LDL) ทั้งส่วนของไขมันและโปรตีนถูกออกซิไดซ์ การศึกษาจำนวนมากรายงานว่า ox-LDL เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง แต่มีการศึกษาเพียงเล็กน้อยที่กล่าวถึงบทบาทของ mm-LDL ในกระบวนการนี้ ในการศึกษานี้ ได้ศึกษาผลกระทบของ LDL ต่างชนิดกันต่อการแสดงออกของเมทริกเมทัลโลโปรติเนส (MMP) โดยใช้แมโครฟาจที่ได้จากการกระตุ้นเซลล์ชนิด THP1 และ U937 ด้วย phorbal-12-myristate 13-acetate (PMA) โฟมเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยการเลี้ยงแมโครฟาจร่วมกันระหว่าง LDL หรือ mm-LDL หรือ ox-LDL ที่ความเข้มข้นต่างๆ หยดไขมันภายในเซลล์ของโฟมเซลล์ถูกทำให้มองเห็นโดยการย้อมสีชนิด Oil Red O และดูได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ การวิเคราะห์ MMPs โดยใช้เทคนิคการตรวจสารพันธุกรรมด้วยเครื่องตรวจสารพันธุกรรมในสภาพจริง แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ MMP-1, 2, 9, 12, 14, และ 16 ในระดับ mRNA ถูกทำให้เพิ่มขึ้นเมื่อระดับของการออกซิเดชันของ LDL เพิ่มมากขึ้น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลาตินไซโมกราฟี แสดงให้เห็นว่า รูปออกฤทธิ์ของ MMP-2 จะเพิ่มขึ้น เมื่อระดับของการออกซิเดชันของ LDL เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การออกฤทธิ์ของ MMP-9 จะลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มระหว่าง LDL กับแมโครฟาจเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองในเบื้องต้นนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า mm-LDL สามารถเหนี่ยวนำการเกิดโฟมเซลล์และการแสดงออกของ MMPs แม้ว่าผลที่เกิดขึ้นจะไม่ชัดเจนเท่า LDL ที่ถูกออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา กนกวรรณ เลาหลีกนนท์

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

KANOKWAN LOWHALIDANON : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN LDL AND THE ROLE OF MM-LDL IN ATHEROSCLEROSIS PROGRESSION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PANIDA KHUNKAEWLA, Ph.D. 180 PP.

ATHEROSCLEROSIS, LDL, MM-LDL, MONOCLONAL ANTIBODY, DIRECT PLASMA LDL MEASUREMENT, MMP, FOAM CELLS

High level of low density lipoprotein (LDL) is one of the major risk factors in the pathogenesis of atherosclerosis. The most common approach for determination of plasma LDL level in hospital is Friedewald equation. Nonetheless, some limitations of this method are found, especially high plasma triglyceride level. Thus several methods have been developed to overcome these limitations. This study, seven specific monoclonal antibodies (mAbs) against human LDL were generated by standard hybridoma technique and specific to apolipoprotein B-100 (apoB-100) presented on LDL particle. Among these clones, 2 distinct epitope binding mAbs, hLDL-E8 (IgG_1) and hLDL-2D8 (IgG_{2b}), were selected for developing of direct LDL measurement using sandwich ELISA. As apoB-100 is not presented only in LDL particle, therefore the LDL was precipitated by heparin/citrate pH 5.04 prior to quantification. To compare the LDL level obtained by the developed method and from the hospital, 208 randomized samples from Suranaree University of Technology (SUT) hospital were examined. The mean value obtained from the developed method was 126.6±43.1 mg/dl (range 90.0 to 258.0 mg/dl) while the value obtained from the

SUT hospital was 123.2±42.3 mg/dl (range 34.0 to 236.0 mg/dl). Linear regression analysis showed high correlation among assessment by the developing method and from SUT hospital ($r = 0.8491$, p-value < 0.0001). Notably, triglyceride level has no influence on LDL quantification by the developed method. Thus, we prepared an alternative method for direct plasma LDL measurement using in-house mAbs. Nonetheless, the technique is needed to be improved to suit with routine laboratory test.

LDL can be oxidized in a stepwise manner. Minimally modified low density lipoprotein (mm-LDL), which only lipid part is oxidized and fully oxidized-LDL (ox-LDL) which both lipid and protein parts are oxidized. Several studies reported that the ox-LDL is involved in the atherosclerosis progression but a few studies regarding the role of the mm-LDL on this process has been reported. This study, effect of different LDLs on expression of matrix metalloproteinases (MMPs) was studied using macrophages derived from phorbal-12-myristate 13-acetate (PMA) activated THP1 and U937 cells as the study model. These primary results suggested that foam cells were induced by co-cultivation of the generated macrophages with various concentrations of LDL, or mm-LDL, or ox-LDL. MMPs analysis using RT-PCR revealed that mRNA level of MMP-1, 2, 9, 12, 14, and 16 were increased once the degree of oxidation increased. Gelatin zymography showed that active form of MMP-2 was increased when the oxidation degree was increased whereas MMP-9 activity was decreased when increase the incubation time of LDL and macrophages.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry — Student's signature Kanokwan Louhalidanon

Academic Year 2018 — Advisor's signature