นิพนธ์ต้นฉบับ
การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์อย่างง่ายโดยวิธีการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล

ทิพย์วรรณ ชื่นจิตร[1], สุจิตรา สุขวิทย์[1], ฉัตรี คมกริช[2], สุชชนา แทบประสิทธ์[1], จุฑาภรณ์ จั่นวงศ์แก้ว[3], อวิรุทธ์ อุ่นอารมย์[3], ขวัญใจ วิพุทธิกุล[1], กรองกาญจน์ สายพิณ[1], ศิริพันธ์ กอนวงศ์[1], ภานุวัฒน์ มิเดิง[4], ดลนภัส กุวานนท์[4] และ ณรงค์ฤทธิ์ ศิริโสภณา[1]

[1]กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร [2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
[3]โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา [4]สถาบันพยาธิวิทยา ศูนย์อำนวยการแพทย์พระมงกุฎเกล้า

ความเป็นมา: *เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ (monocytes) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (precursor) ของแม็คโครฟาร์จ (macrophages) ในเนื้อเยื่อของร่างกาย เซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรค และนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells รวมทั้งหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) ได้หลายชนิด ซึ่งควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน* ***วัตถุประสงค์:*** *เพื่อศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ หาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิต และหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ที่สามารถทำหน้าที่ phagocytosis ได้โดยวิธีการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล ซึ่งเป็น hyperosmotic density gradient medium* ***วิธีการศึกษา:*** *เราใช้ส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ของผู้บริจาคโลหิต ที่สถาบันพยาธิวิทยาซึ่งเป็นส่วนประกอบของโลหิตที่ทางสถาบันพยาธิวิทยาเหลือทิ้ง จำนวน 13 ราย มาศึกษา โดยมีขั้นตอนการดำเนินการ คือ ปั่นแยก PBMC จาก buffy coat โดยใช้ Ficoll-Hypaque gradient (density = 1.070 g/mL) จากนั้นจึงปั่นแยกโมโนซัยท์จาก PBMC โดยใช้ hyperosmolar Percoll gradient (density = 1.064 g/ml) หาเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ โดยการย้อมด้วย monoclonal antibodies ต่อ CD45/CD14 และวัดโดยวิธี โฟลไซโตเมทรี และหาเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิต (viability) โดยย้อมด้วยสี trypan blue และศึกษาว่าโมโนซัยท์ที่แยกได้สามารถทำหน้าที่ phagocytosis ได้หรือไม่ มากน้อยเพียงใด โดยการนับจำนวนเปอร์เซนต์ของเซลล์ซึ่งสามารถจับกิน latex beads ได้* ***ผลการศึกษา:*** *พบว่า เปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ และเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิต (viability) มีค่าสูง (95.3% และ 94.1% ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่มีอยู่ใน PBMC ที่สามารถแยกได้เมื่อใช้ Ficoll-Hypaque gradient คือ 21% และจาก PBMC จำนวน 150 x 10^6 เซลล์ เมื่อใช้เปอร์คอล จะได้ค่าเฉลี่ยของโมโนซัยท์ คือ 16.8 x 10^6 เซลล์ ซึ่งมีเปอร์เซนต์โมโนซัยท์อยู่คิดเป็น 81.3% (% purity) และคิดเป็นจำนวนเซลล์ 43.1% (% recovery) สำหรับโมโนซัยท์ที่แยกโดยวิธีนี้ได้สามารถทำหน้าที่ phagocytosis ได้ 74.8%* ***สรุป:*** *จะเห็นได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และได้ผลดี คือเปอร์เซ็นต์โมโนซัยท์สูง เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด และสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยด้านภูมิคุ้มกันวิทยาอื่นๆ ต่อไปได้*

Key Words: ● *การแยกโมโนซัยท์* ● *เปอร์คอล* ● *การแยกตามความหนาแน่น* ● *ชั้นเม็ดเลือดขาว buffy coat*

เวชสารแพทย์ทหารบก 2553;63:13-22.

บทนำ

เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ (monocytes) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (precursor) ของ แม็คโครฟาร์จ (macrophages) ในเนื้อเยื่อ (tissue) ของร่างกาย เซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรค และนำเสนอแอนติเจนต่อ T cells รวมทั้งหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) ได้หลายชนิดซึ่งควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน หน้าที่ของโมโนซัยท์ซึ่งผิดปกติพบได้ในโรคต่างๆ นอกจากนี้การที่โมโนซัยท์มี CD4 receptors บนผิวเซลล์[1] จึงทำให้เชื้อเอชไอวีสามารถเข้าสู่เซลล์นี้ได้ มีผลให้เมื่อมีโมโนซัยท์ที่ติดเชื้อเอชไอวี

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 23 มีนาคม 2553 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 23 มีนาคม 2553 ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ทิพย์วรรณ ชื่นจิตร กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

อยู่ในร่างกาย โมโนซัยท์ที่ติดเชื้อเอชไอวีจะทำหน้าที่เป็นที่เก็บกัก (reservoirs) เชื้อเอชไอวีและสามารถทำให้เซลล์อื่นติดเชื้อได้ อีกทั้งโมโนซัยท์ที่ติดเชื้อเอชไอวีนี้ไม่สามารถทำหน้าที่ของมันได้จึงทำให้เกิดพยาธิสภาพ (pathogenesis)[2]

นอกจากนี้โมโนซัยท์ยังสามารถเจริญเติบโตเป็น dendritic cells ภายนอกร่างกาย (in vitro) และนำมาใช้ศึกษา dendritic cells ได้เช่นกัน ดังนั้นการแยกโมโนซัยท์เพื่อศึกษาหน้าที่และบทบาททางด้านวิทยาภูมิคุ้มกันจึงมีความสำคัญ อย่างไรก็ตาม วิธีการแยกโมโนซัยท์จากโลหิตค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากจำนวนโมโนซัยท์มีประมาณ 10-20 % ของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)[3] จึงทำให้มีการปนเปื้อน (contamination) ของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์สูง ในขณะแยก เทคนิควิธีดั้งเดิมของการแยกโมโนซัยท์ คือ การใช้คุณสมบัติการเกาะติดแก้ว หรือ พลาสติก (adherence) ของโมโนซัยท์[4] หลังจากการแยก PBMC โดยใช้ Ficoll-Hypaque เทคนิคนี้แม้จะทำได้ง่ายแต่ใช้เวลานานหลายขั้นตอน คือ การแยก PBMC จาก whole blood การเกาะติดพลาสติก และการล้าง PBMC ที่ไม่เกาะติดพลาสติกออก นอกจากนี้ จำนวนโมโนซัยท์ที่แยกได้ต่ำ คือประมาณ 10%[5] มีการปนเปื้อนของลิมโฟซัยท์สูง[6] และโมโนซัยท์อาจถูกกระตุ้นระหว่างการแยก[4]

วิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการแยกโมโนซัยท์ คือ immunoselection, centrifugal elutriation และ density gradients วิธี immunoselection (เป็นการใช้ magnetic beads ที่จับกับ monoclonal antibodies ต่อ CD14) ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง ส่วนวิธี centrifugal elutriation ใช้เครื่องมือมีราคาแพง และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ มีประสบการณ์สูงในการทำ

สำหรับวิธี density gradients ซึ่งเป็นวิธีปั่นแยกเซลล์ออกจากกันโดยใช้พื้นฐานของขนาด (size) และความหนาแน่น (density) ของเซลล์ เป็นวิธีที่น่าสนใจและมีผู้พัฒนากันอย่างต่อเนื่อง[5, 7-8] อย่างไรก็ตามเนื่องจากความหนาแน่นของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการแยกออกจากกันจึงเป็นการยาก ถ้าใช้ความหนาแน่นที่แตกต่างกันอย่างเดียว Fluks[9] แสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่ม monocyte purity ได้โดยการใช้ hyper-osmotic density gradient media

ในการศึกษานี้ เป็นการตรวจหาเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ และเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิต (viability) โดยวิธีการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล ซึ่งเป็น hyper-osmotic density gradient media และดูโมโนซัยท์ที่แยกได้สามารถทำหน้าที่ phagocytosis ได้หรือไม่ เป็นการพัฒนาเทคนิค density gradient โดยการใช้เปอร์คอล ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ไม่ใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และได้ผลดี คือเปอร์เซ็นต์โมโนซัยท์สูง เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด และสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยด้านภูมิคุ้มกันวิทยาอื่นๆ ต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้และเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิตโดยวิธีการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล
2. เพื่อศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ที่สามารถทำหน้าที่ phagocytosis

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเลือดของคนปกติ ซึ่งเป็นอาสาสมัครผู้บริจาคโลหิตที่สถาบันพยาธิวิทยา (สพธ.) โดยที่ทาง สพธ. จะนำเลือดของผู้บริจาคเหล่านี้ไปปั่นแยกส่วนที่ไม่ต้องการใช้ออก ได้แก่เม็ดเลือดขาว (buffy coat) ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่วนนี้มาใช้ในการวิจัย โดยส่วนเม็ดเลือดขาวนี้ไม่สามารถระบุตัวบุคคลผู้บริจาคโลหิตได้ และโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะอนุกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย กรมแพทย์ทหารบก

2. น้ำยา และสารต่างๆ ที่ต้องเตรียมเพื่อใช้ในการทดลอง

2.1 อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีสองชนิดคือ Washing media และ Complete media ซึ่งอาหารแต่ละชนิดมีส่วนประกอบดังนี้

2.2 PBS/Citrate pH 7.2

PBS/Citrate เตรียมไว้เพื่อใช้ในการผสม Hyperosmolar Percoll gradient PBS/Citrate ประกอบด้วย Na_2HPO_4 9.15 mM, NaH_2PO_4 1.49 mM, NaCl 139.97 mM และ $C_6H_5Na_3O_7$, $2H_2O$ 13 mM

2.3 Hyperosmolar Percoll gradient

Hyperosmolar Percoll gradient ได้จากการผสม Percoll 9 ส่วนกับ 1.5 N NaCl 1 ส่วน และนำทั้งหมดที่ได้มาผสมกับ PBS/Citrate ในสัดส่วนที่เท่ากัน hyperosmolar Percoll gradient จะต้องผสมวันต่อวัน ไม่สามารถผสมทิ้งไว้ข้ามคืนได้

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์

Media	RPMI (%)	Pen/strep (%)	FBS (%)	L-glutamine (%)
Washing media	97	1	2	-
Complete media	85	1	10	4

3. ขั้นตอนการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (สวพท.)

3.1 การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) ออกจากเลือดโดยการปั่นแยกด้วย Ficoll-Hypaque

ใช้ปิเปตดูดเลือดขึ้นมา 20 ml ค่อยๆ ปล่อยเลือดลงบน Ficoll-Hypaque ปริมาตร 10 ml ที่เตรียมไว้ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml อย่างช้าๆ จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที

ผลการปั่นแยกจะทำให้สารในหลอดแยกออกมาเป็นสามส่วน (รูปที่ 1) คือ 1. ส่วนสีแดงด้านล่างซึ่งจะประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง 2. ส่วนที่เป็นชั้นบางๆสีขาวตรงกลางคือชั้น buffy coat ซึ่งประกอบด้วย PBMC และ 3. ส่วนน้ำใสด้านบน ส่วนชั้น buffy coat หรือ PBMC จะถูกเก็บโดยใช้ pasture pipette เซลล์ PBMC จะถูกล้างด้วย washing media แล้วย้อมด้วยสี trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และคำนวณค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ hematocytometer จากนั้นปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้นเป็น 50 x 10^6 cells/ml

3.2 การแยกโมโนซัยท์ออกจาก PBMC โดยนำ PBMC ไปปั่นแยกด้วยเปอร์คอล

ใช้ปิเปตดูด PBMC ที่มีความเข้มข้น 50 x 10^6 cells/mL จำนวน 3 mL ค่อยๆปล่อยลงบน hyperosmolar Percoll gradient ที่ได้เตรียมไว้ (รูปที่ 2) นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 2,500 rpm นาน 35 นาที

ผลที่ได้จะพบว่ามีชั้นสีขาวขุ่นลอยอยู่ตรงกลางซึ่งเป็นโมโนซัยท์ (รูปที่ 3) ชั้นสีขาวนั้นจะถูกเก็บโดยใช้ pasture pipette และเซลล์จะถูกล้างด้วย washing media แล้วย้อมด้วยสี trypan blue เพื่อนับจำนวนเซลล์และคำนวณค่า viability โดยใช้ hematocytometer

ขั้นตอนการเตรียมการและการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์โดยการใช้เปอร์คอล สามารถสรุปเป็นแผนภูมิ ดังรูปที่ 4

3.3 การตรวจสอบปริมาณโมโนซัยท์และลิมโฟซัยท์ที่มีอยู่ใน PBMC และโมโนซัยท์ที่ได้หลังจากการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล โดยการใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาและโฟลไซโตเมทรี กองวิจัย สวพท.

การย้อม โมโนซัยท์ด้วย Monoclonal antibody ก่อนนำมาวิเคราะห์โดยวิธีโฟลไซโตเมทรี

นำ monoclonal antibody CD45/CD14 ซึ่งติดฉลากสารเรืองแสง 20 μl มาบ่มกับ PBMC และโมโนซัยท์ ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Facflow หลอดละ 1 mL นำไปปั่นล้างที่ความเร็วรอบ 1,250 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการฟิกซ์เซลล์โดยเติม 1% paraformaldehyde 0.5 ml แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ถ้าหากยังไม่นำไปตรวจสอบจะต้องเก็บเซลล์ไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4°C ลิมโฟซัยท์นั้นจะติดเฉพาะ antibody CD45 เนื่องจากไม่มี CD14 บนผิวเซลล์ในขณะที่โมโนซัยท์จะติดแอนติบอดี ทั้งสองชนิด

3.4 การทดสอบ phagocytosis ของโมโนซัยท์ที่แยกได้

การทดสอบ phagocytosis ของโมโนซัยท์ จะทดสอบโดยนำโมโนซัยท์ที่แยกได้จากการปั่นแยกกับเปอร์คอล มาบ่มกับ polystyrene latex beads ที่ 37°C เป็นเวลานาน 19 - 20 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นล้างด้วย PBS แล้วสเมียร์ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นนำกระจกสไลด์ดังกล่าวไปย้อม Wright Giemsa stain แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

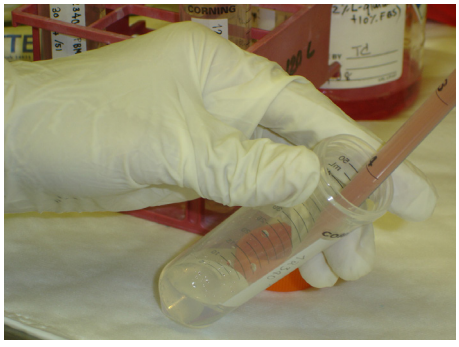
4. การรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการแยกโมโนซัยท์ออกจากเลือด ดังนั้นผลการทดลองที่จะต้องรวบรวมนั้นจึงเป็นข้อมูลต่างๆ ของโมโนซัยท์ ได้แก่ viability, purity, yield และ phagocytosis การให้ได้มาซึ่งข้อมูลต่างๆ ที่ต้องการนั้นคำนวณได้ดังนี้

4.1 Percent of viability

การคำนวณค่า viability percentage จะพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสีฟ้าเมื่อย้อมด้วยสี trypan blue เทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้บน hematocytometer ดังสมการ

รูปที่ 1 ผลที่ได้จากการปั่นแยกเลือดโดยใช้ Ficoll-Hypaque



รูปที่ 2 การนำ PBMC ปล่อยลงบนหลอดที่บรรจุ hyperosmolar Percoll อย่างช้าๆ เพื่อ นำไปปั่นแยกโมโนซัยท์

รูปที่ 3 ผลที่ได้จากการปั่น PBMC กับ hyperosmolar Percoll gradient

$$\%\text{viability} = \frac{\text{N. of cells excluding trypan blue}}{\text{total cells}} \times 100$$

4.2 Percent of purity

การตรวจสอบค่า purity จะพิจารณาจากผลของ Flow cytometry analysis ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงร้อยละของเซลล์ลิมโฟซัยท์และเซลล์โมโนซัยท์ที่มีอยู่ ทำให้สามารถพิจารณาค่า purity ได้โดยพิจารณาจากผลโฟลไซโตเมทรี ของเซลล์ที่แยกได้ด้วยเปอร์คอล

4.3 Percent of yield

ในการคำนวณค่า yield จะพิจารณาจากผลของ Flow cytometry analysis ด้วยเช่นกัน โดยจากผล โฟลไซโตเมทรีของ PBMC จะทำให้คำนวณได้ว่า PBMC ตั้งต้น 150 x 10^6 เซลล์ จะมีโมโนซัยท์อยู่เท่าใด ดังสมการ

$$\text{monocytes in PBMC } 150 \times 10^6 \text{cells} = \frac{\%\text{monocyte from flow result}}{100} \times 150 \times 10^6$$

และจากผลของเซลล์ที่แยกได้ด้วยเปอร์คอลก็จะทำให้คำนวณได้ว่าเซลล์ที่เก็บได้จากการแยกด้วยเปอร์คอล นั้นมีปริมาณโมโนซัยท์อยู่เท่าใด

$$\text{monocytes after percoll} = \frac{\%\text{monocyte from flow result}}{100} \times \text{N. of cells recieved}$$

ทำให้สามารถคำนวณ yield percentage ได้ ดังสมการ

$$\%\ \text{Yield} = \frac{\text{monocyte recieved after percoll}}{\text{monocyte in PBMC } 150 \times 10^6 \text{ cells}} \times 100$$

4.4 Percent of phagocytosis

การคำนวณค่า phagocytosis นั้นจะนับจำนวนเฉพาะเซลล์โมโนซัยท์บนกระจก สไลด์ที่ย้อมสีแล้ว โดยถือว่าเซลล์ที่มีการกิน latex beads ตั้งแต่ 5 เม็ดขึ้นไป จะมีหน้าที่ phagocytosis เทียบกับจำนวนโมโนซัยท์ทั้งหมดโดยจะทำการนับตัวอย่างละ 20 ฟิลด์ การคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ทำได้ดังสมการ

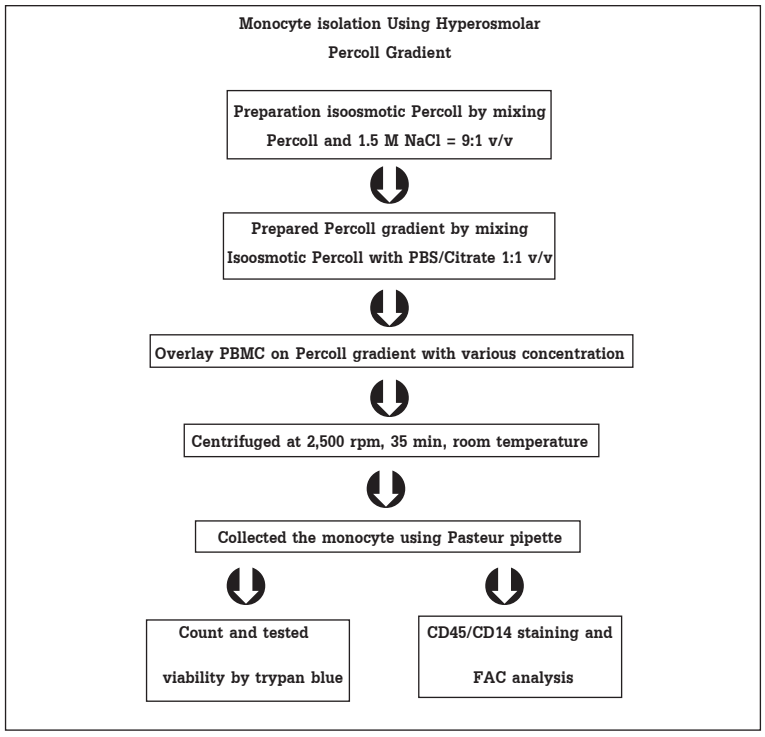
$$\%\ \text{Phagocytosis} = \frac{\text{number of monocyte ingesting at least 5 beads}}{\text{number of total monocyte}} \times 100$$

ผลการวิจัย

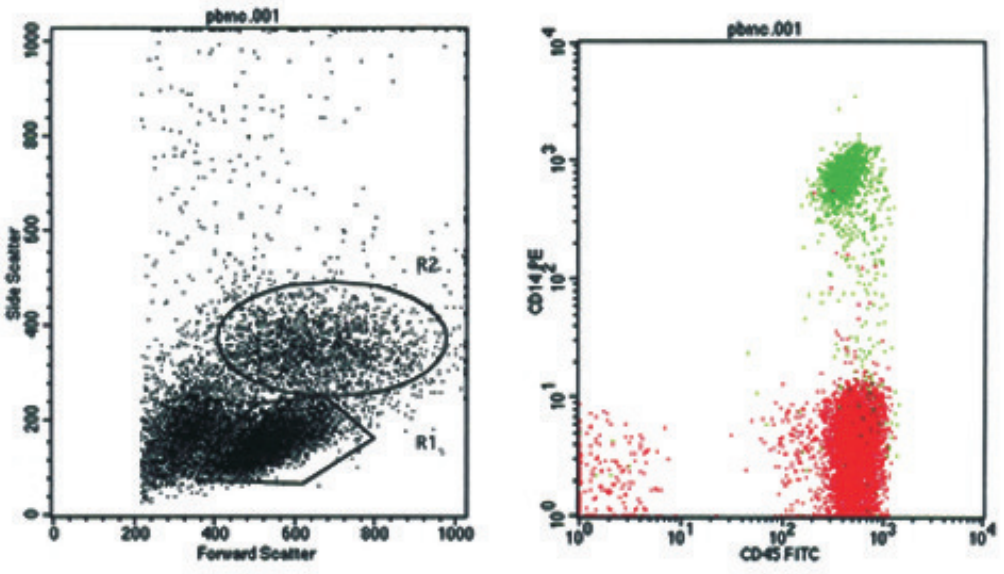
1. ผลการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้

1.1 ผล Monocyte purity percentage

จากการคำนวณหา purity percentage ของโมโนซัยท์โดยวิธี Flow cytometry analysis นั้น จากรูปที่ 5 แสดงถึงตัวอย่างของการวิเคราะห์ผลโดยวิธีโฟลไซโตเมทรี หลังจากการแยกได้



รูปที่ 4 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียมการและการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์โดยการใช้เปอร์คอล



Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	4780	73.71	47.80	519.75	385.05	4.30	3.01	1, 2
R2	1705	26.29	17.05	463.94	428.66	680.74	443.14	1, 2

รูปที่ 5 ผลของ Flow cytometry analysis ของตัวอย่างเลือดเมื่อแยก PBMC โดยใช้ Ficoll- Hypaque

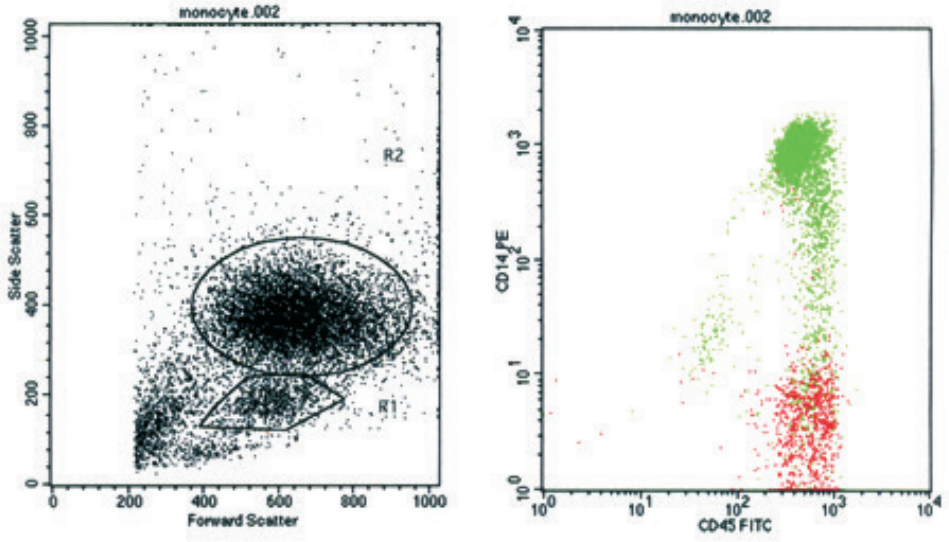
PBMC โดยใช้ Ficoll-Hypaque และนำมาย้อมด้วย Monoclonal antibody CD45/CD14 ซึ่งเป็นการย้อม monocytes สำหรับ Forward scatter นั้นเป็นตัวแทนของขนาดของเซลล์ ส่วน Side scatter ซึ่งเป็นตัวแทนของ granularity ของเซลล์ ดังนั้นในรูป R1 คือ ลิมโฟซัยท์ ส่วน R2 คือ โมโนซัยท์ เมื่อพิจารณาว่า R1 + R2 เป็นตัวแทนของเซลล์ PBMC ทั้งหมด จำนวน 100% แล้ว จากรูป R1 คือ 73.71% และ R2 คือ 26.29% นั่นคือ จากตัวอย่างนี้ Purity ของ โมโนซัยท์ ใน PBMC คือ 26.29%

เมื่อทำการทดสอบต่อโดยนำ PBMC มาแยกโมโนซัยท์โดยใช้เปอร์คอล ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ 2 ของการแยกโมโนซัยท์และย้อมด้วย Monoclonal antibody CD45/CD14 เพื่อหา purity percentage ของ โมโนซัยท์ โดย Flow cytometry analysis และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการแยกโมโนซัยท์ หลังจากการใช้ Ficoll-Hypaque ในขั้นตอนแรก จากรูปที่ 6 พบว่า R1 คือ ลิมโฟซัยท์ มี จำนวน 10.09 % และ R2 คือ โมโนซัยท์ มีจำนวน 90.05 % นั่นคือ จากตัวอย่างในรูปที่ 6 นี้ purity percentage ของ โมโนซัยท์ ที่ได้หลังจากขั้นตอนที่สองโดยการใช้ เปอร์คอล คือ 90.05 %

ผลการแยกโมโนซัยท์ โดยใช้เปอร์คอล ของตัวอย่างเลือดคนปกติ จำนวน 13 ราย โดยใช้ส่วนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ของอาสาสมัครผู้บริจาคโลหิต จากธนาคารเลือด สพธ.ศพม.นั้น ค่า mean ± SD ของ purity percentage ของโมโนซัยท์ ใน PBMC ที่สามารถแยกได้เมื่อใช้ Ficoll-Hypaque และ หลังการใช้ เปอร์คอล คือ 21.0 ± 6.5 และ 81.3 ± 4.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

1.2 ผล Monocyte yield percentage

Monocyte yield percentage เป็นการหาค่าโมโนซัยท์ที่แยกได้ว่ามีจำนวนเป็นกี่เปอร์เซนต์ ของจำนวนโมโนซัยท์ทั้งหมดที่มีอยู่ใน PBMC ตั้งต้น 150 x10^6 เซลล์ จากที่กล่าวข้างต้นว่า ค่า yield percentage จะคำนวณได้จากผลของ Flow cytometry analysis ด้วยเช่นกัน ดังสมการที่กล่าวในวิธีการดำเนินการ ผลการศึกษาพบว่าค่า mean ± SD ของ cells yield ที่แยกได้หลังจากการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล คือ 16.8 ± 9.9 (x 10^6) สำหรับ purity percentage ของโมโนซัยท์หลังจากการปั่นแยกด้วย



Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	799	10.09	7.99	586.11	506.90	9.87	3.51	1, 2
R2	7133	90.05	71.33	457.55	430.36	848.52	644.62	1, 2

รูปที่ 6 ผลของ Flow cytometry analysis ของโมโนซัยท์ที่แยกได้โดยใช้เปอร์คอล

เปอร์คอล คือ 81.3 ± 4.5 ดังนั้นค่าเฉลี่ยของ monocyte yield ในการศึกษานี้ คือ 13.5 ± 7.3 (x 10^6) นั่นคือ ค่า mean ± SD ของ yield percentage ของโมโนซัยท์ คือ 43.1 ± 18.2 (ตารางที่ 2)

1.3 ผล Monocyte viability percentage

การแยก เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์โดยการใช้เปอร์คอล ในการศึกษานี้มี 2 ขั้นตอน

ในขั้นตอนแรกเป็นการแยก PBMC ซึ่งเรานำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์ viability หรือเม็ดเลือดขาวที่มีชีวิต โดยการย้อมด้วยสี trypan blue พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของ PBMC ที่มีชีวิตนั้นมีค่าเท่ากับ 95.3 ± 2.6 (mean ± SD) ดังแสดงในตารางที่ 2

ในขั้นตอนที่สอง เป็นการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์จาก PBMC พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่มีชีวิตนั้นมีค่าเท่ากับ 94.1 ± 8.1 (mean ± SD) ดังแสดงในตารางที่ 2

2. ผลการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ที่สามารถทำหน้าที่ phagocytosis

การศึกษานี้พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ที่แยกได้ สามารถทำหน้าที่ phagocytosis โดยการกิน latex beads ตั้งแต่ 5 เม็ดเป็นต้นไป (รูปที่ 7) คือ 74.8 ± 8.7 (ตารางที่ 2)

บทวิจารณ์

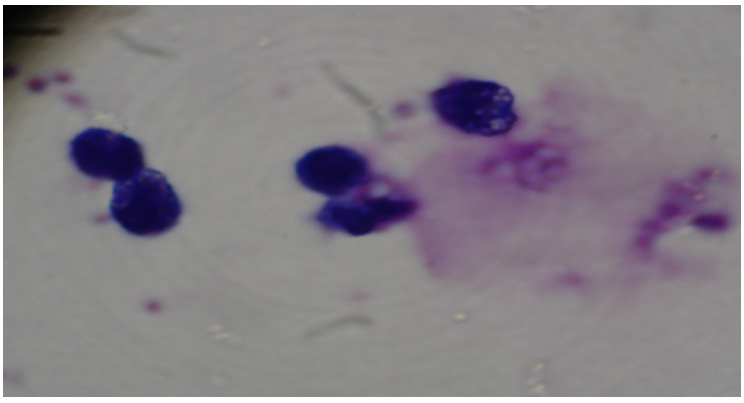
การแยกโมโนซัยท์ในการศึกษานี้ใช้วิธีปั่นแยก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก แยก PBMC จาก buffy coat โดยใช้ Ficoll-Hypaque ส่วนในขั้นตอนหลังแยกโมโนซัยท์ออกจาก PBMC ที่แยกได้ในขั้นตอนแรก โดยการใช้ hyperosmolar Percoll gradient ซึ่งมีนักวิจัยหลายคณะได้ทำการศึกษาโดยการใช้ Percoll gradient และพบว่าปริมาณ โมโนซัยท์ที่แยกได้สูงมีปริมาณลิมโฟซัยท์ปนเปื้อนน้อย มีอัตราการรอดชีวิตสูง[7-10] และยังคงมีความสามารถในการ phagocytosis ได้อยู่[7] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษานี้ในประเทศไทย

ในงานวิจัยนี้เราใช้ส่วน buffy coat ซึ่งได้จากเลือดเป็นจำนวนมากของอาสาสมัครผู้บริจาคโลหิตจำนวน 13 ราย มาทำการศึกษา เพื่อให้ได้ PBMC หลังจากแยกในขั้นตอนแรกโดยใช้ Ficoll-Hypaque เป็นจำนวนมาก เนื่องจากจำนวน PBMC ที่ต้องการใช้ มีจำนวน 150 x 10^6 เซลล์ คงที่เท่ากันทุกครั้งของการศึกษานี้ งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบกับเลือดโดยตรง ซึ่งใช้เลือดในขั้นตอนแรกน้อยกว่า อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Almeida และคณะ ได้เปรียบเทียบการใช้เลือดจำนวนมากและการใช้เลือดจำนวนน้อยในขั้นตอนแรก พบว่าผลเปอร์เซ็นต์โมโนซัยท์ที่ได้คล้ายกัน[7]

ผลการทดลองการแยก โมโนซัยท์ จากอาสาสมัครจำนวน 13 ราย ได้สรุปไว้ดังแสดงในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซนต์ของ PBMC และ โมโนซัยท์ที่มีชีวิต (viability) ซึ่งทดสอบโดยการย้อมด้วยสี trypan blue มีค่าเฉลี่ยสูง คือ 95.3 % และ 94.1% ตามลำดับ ผลเปอร์เซนต์โมโนซัยท์ที่มีชีวิตของการศึกษานี้ มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hardin และคณะ[10] การได้รับค่าเปอร์เซนต์ของ PBMC และ โมโนซัยท์ที่มีชีวิตสูง นั้นปัจจัยที่สำคัญคือ การปั่นล้างทันทีหลังจากการแยกเซลล์ได้แล้ว

ในการศึกษานี้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ของโมโนซัยท์ที่มีอยู่ใน PBMC ที่สามารถแยกได้เมื่อใช้ Ficoll-Hypaque gradient คือ 21% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับหลายการศึกษา[7,10] และจาก PBMC จำนวน 150 x 10^6 เซลล์ เมื่อหลังปั่นแยกโดยใช้เปอร์คอล จะได้ค่าเฉลี่ยของ cells yield และ monocyte yield คือ 16.8 x 10^6 และ 13.5 x 10^6 เซลล์ ตามลำดับ หรือมีค่าเฉลี่ยหลังคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ monocyte yield คือ 43.1% ซึ่งค่าที่ได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะซึ่งใช้เปอร์คอล ในการปั่นแยกที่ได้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ yield ที่ค่อนข้างสูง คือ ตั้งแต่ 70 – 90%[7 - 10] ปัจจัยที่สำคัญซึ่งทำให้ได้เปอร์เซนต์ yield สูง นั้นคือ ประสบการณ์ และความเชี่ยวชาญในการทำการทดสอบที่มากพอ

การแยก PBMC ออกจากเลือดโดยการปั่นแยกด้วย Ficoll – Hypaque gradient (density =1.070) ส่วนของ PBMC จะปรากฏเป็นแถบสีขาวขุ่นอยู่ตรงกลาง เมื่อทำการปั่นเหวี่ยง PBMC กับ hyperosmolar Percoll gradient (density =1.064) แล้ว พบว่าชั้นของ โมโนซัยท์ จะอยู่เหนือชั้นของลิมโฟซัยท์เล็กน้อย เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ใกล้เคียงกัน คือ โมโนซัยท์มีความหนาแน่นอยู่ในช่วง 1.057 – 1.069 g/mL ส่วนลิมโฟซัยท์มีความหนาแน่นอยู่ในช่วง 1.063 – 1.077 g/mL การที่ใช้เป็น hyperosmolar Percoll density gradient นั้นจะช่วยให้เซลล์โมโนซัยท์และลิมโฟซัยท์แยกออกจากกันได้ง่ายและชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากเซลล์ลิมโฟซัยท์มีความไวต่อ hyperosmolarity มากกว่าเซลล์โมโนซัยท์ ทำให้ลิมโฟซัยท์ มีการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์มากกว่า ความหนาแน่นภายในเซลล์จึงมากขึ้น ดังนั้นเมื่อมีการปั่นแยกเซลล์



รูปที่ 7 เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ที่มีการกิน latex beads ตั้งแต่ 5 เม็ดเป็นต้นไป

ลิมโฟซัยท์ จะมีการจัดเรียงตัวอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าโมโนซัยท์ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติการ การดูดเซลล์โมโนซัยท์เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนชั้นของลิมโฟซัยท์ไม่ง่ายนัก นักวิจัยจะต้องมีประสบการณ์ในการทำการทดสอบที่มากพอจึงจะได้ค่า yield สูง อีกทั้งการดูดเซลล์โมโนซัยท์จะต้องดูดให้หมดในชั้นนั้นเพื่อให้ได้จำนวนโมโนซัยท์ที่มีอยู่จริง และนับจำนวนโมโนซัยท์เพื่อไปคำนวณค่า เปอร์เซนต์ yield ของโมโนซัยท์ นอกจากนี้เซลล์ที่หายไปในระหว่างการปั่นล้าง ก็เป็นสาเหตุหนึ่งของการที่ได้เปอร์เซนต์ yield ของโมโนซัยท์ต่ำเช่นกัน

สำหรับการหา purity percentage ของโมโนซัยท์ การศึกษานี้เราใช้เทคนิควิธี โฟลไซโตเมทรี โดยย้อมด้วย Monoclonal antibody CD45/CD14 ซึ่งพบว่า มี % Purity ของ โมโนซัยท์ตั้งแต่ 75.7% ถึง 90.1% ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้ว โมโนซัยท์ ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ 81.3% ซึ่งค่าที่ได้ค่อนข้างสูงเป็นที่น่าพอใจ ใกล้เคียงกับหลายการศึกษาซึ่งใช้เปอร์คอลในการปั่นแยก[7 - 10]

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้ โมโนซัยท์ที่มีชีวิต และหน้าที่ phagocytosis ของโมโนซัยท์หลังจากการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล

Monocyte Properties (N = 13)	Mean ± SD (range)
PBMC ($x10^6$ cells)	150
% Viability of PBMC	95.3 ± 2.6 (89 -100)
% Monocytes in PBMC	21.0 ± 6.5 (10.1 – 33.8)
% Monocytes after Percoll Gradient	81.3 ± 4.5 (75.7 – 90.1)
% Viability of Monocytes	94.1 ± 8.1 (70 – 99)
Cells Yield after Percoll Gradient	16.8 ± 9.9 (8.0 – 39.1) ($x 10^6$)
Monocytes Yield	13.5 ± 7.3 (6.1 – 29.6) ($x 10^6$)
% Yield of Monocytes	43.1 ± 18.2 (28.7 -76.3)
% Phagocytosis of Latex Beads	74.8 ± 8.7 (63 – 88)

ผลการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ของโมโนซัยท์ที่แยกได้และสามารถทำหน้าที่ได้ ในการศึกษานี้เราใช้การทดสอบวิธี phagocytosis โดยการกิน latex beads ตั้งแต่ 5 เม็ดขึ้นไป พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์ที่แยกได้ สามารถทำหน้าที่ phagocytosis คือ 74.8% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาวิจัยอื่นๆ จะน้อยกว่า เช่นการศึกษาของ Almeida และคณะ พบว่าโมโนซัยท์ที่แยกได้ สามารถทำหน้าที่ phagocytosis ประมาณ 90%[7] ปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ได้ โมโนซัยท์ที่สามารถทำหน้าที่ได้ คือ เวลาที่ใช้ในการปั่นแยกโมโนซัยท์ ถ้าปั่นนานเกินไปค่าโมโนซัยท์ที่สามารถทำหน้าที่ได้ที่ได้อาจจะต่ำได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษาที่มิได้ทดสอบการทำหน้าที่ของโมโนซัยท์ที่แยกได้[8 – 10]

สรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการนี้เป็นโครงการวิจัยด้านการพัฒนาเทคนิคในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาโดยการพัฒนาวิธีการแยกเม็ดโลหิตขาวชนิดโมโนซัยท์ ด้วยวิธีการปั่นแยกโดยใช้เปอร์คอลซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและประหยัด สามารถที่จะแยกโมโนซัยท์ออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั่นคือ โมโนซัยท์ที่แยกได้ยังมีชีวิตและความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งเซลล์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ยังคงมีความสามารถในการ phagocytosis คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบนี้ในอาสาสมัครผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีซึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจ การวิจัยนี้ถือว่าเป็นขั้นตอนแรกของการพัฒนาเทคนิคดังกล่าว ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณจำกัด อย่างไรก็ตามในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเฉพาะในคนปกติยังไม่ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันเม็ดโลหิตขาวชนิดโมโนซัยท์ในกลุ่มผู้ป่วยหลายโรคได้นำมาศึกษาเช่น โรคเอดส์ โรควัณโรค เป็นต้น ดังนั้นการแยกเม็ดโลหิตขาวชนิดโมโนซัยท์ในกลุ่มผู้ป่วยโดยวิธีนี้ พร้อมกับการทดสอบหน้าที่ทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาอื่นๆ นอกจากการศึกษา phagocytosis เช่น การศึกษาการหลั่งไซโตไคน์ เปรียบเทียบกับการแยกเม็ดโลหิตขาวชนิดโมโนซัยท์ด้วยวิธีอื่นที่ทันสมัยแต่มีราคาแพง เช่น การใช้วิธี immunoselection จะสามารถนำวิธีนี้ไปใช้อย่างกว้างขวางเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดประโยชน์และพัฒนางานวิจัยด้านภูมิคุ้มกันวิทยาต่อโรคติดเชื้อต่างๆ ได้อย่างดียิ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันพยาธิวิทยา สำหรับการสนับสนุนตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการวิจัย โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา และ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มอบโอกาสให้นักเรียน และนักศึกษา มาฝึกงานและได้เรียนรู้เทคนิคทางห้องปฏิบัติการ และงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัย สวพท. และขอขอบคุณ สมาคมแพทย์ทหารแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลโท สืบพงษ์ สังขะรมย์ อดีต ผอ. สวพท. และประธานกรรมการฝ่ายวิชาการ สมาคมแพทย์ทหารแห่งประเทศไทยสำหรับคำแนะนำในการขอทุน พลตรี กฤษฎา ดวงอุไร อดีต ผอ. สวพท. และ เลขาธิการสมาคมแพทย์ทหารแห่งประเทศไทย พลตรี บุณยรักษ์ พูนชัย ผอ. สวพท. และ พันเอก ณรงค์ฤทธิ์ ศิริโสภณา ผอ.กองวิจัย สวพท. ที่ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดียิ่ง ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ และมีคุณค่า

เอกสารอ้างอิง

1. Levy JA, Shimabukuro J, McHugh T, Casavant C, Stites D, Oshiro L. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. Virology 1985;147:441-8.
2. Moisier D, Sieburg H. Macrophage-tropic HIV: critical for AIDS pathogenesis? Immunol Today 1994;15:332-9.
3. Jones BM, Nicholson JKA, Holman RC, Hubbard M. Comparison of monocyte seperation methods using flow cytometric analysis. J Immunol Methods 1989;125:41-7.
4. Colligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, (Eds), 1994b. In:Current Protocols in Immunology, vol 2, section 7, Immunological Studies in Humans. John Wiley & Sons, USA, pp 7.6.1- 7.6.8.
5. Graziani-Bowering GM, Graham JM, Filion LG. A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. J Immunol Methods 1997;207:157-68.
6. Bennett S, Por SB, Stanley ER, Breit SN. Monocyte proliferation in a cytokine-free, serum-free system. J Immunol Methods 1992; 153:201-12.
7. Almeida MC, Silvaa AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95:221-23.
8. Repnik U, Knezeevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. J Immunol Methods 2003; 278:282-92.
9. Fluks AJ. Three-step isolation of human blood monocytes using discontinuous density gradients of Percoll. J Immunol Methods 1981;41:225-33.
10. Hardin JA, Downs JT. Isolation of human monocytes on re-orienting gradients of percoll. J Immunol Methods 1981; 40: 1-6.

Simple Isolation of Human Peripheral Blood Monocytes Using Density Gradients of Percoll

Thippawan Chuenchitra[1], Suchitra Sukwit[1], Chatree Khomkrit [2], Sutchana Tabprasit[1], Jutaporn Junwongkaew[3], Awirut Urnarom[3], Kwanjai Viputtikul[1], Krongkan Saipin[1], Siriphan Gonwong[1], Panuwat Midoeng[4], Dolnapat Kuvanont[4], Narongrid Sirisopana[1]

[1]Research Division, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), [2] Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

[3]Triam Udom Suksa School, [4]Army Institute of Pathology

Background: *Monocytes play important roles in human immune system and are precursors of macrophages in body tissues. They have responsibility for phagocytosis of foreign substances and present antigens to T lymphocytes including production of many cytokines in order to control the immune system. Objectives: 1) To study and establish the method of human blood monocyte isolation by using Percoll density gradient for an alternative method. 2) To determine monocyte purity, viability, yields and phagocytosis function after isolation by Percoll density gradient.* ***Methods:*** *Acid citrate dextrose blood from 13 healthy blood donors was obtained from blood bank and the buffy coat of blood sample of each donor was used in each experiment. Two step procedure with single gradient in each step for monocytes isolation from whole blood was used. First, we used a Ficoll-Hypaque gradient (density = 1.070 g/mL) for seperation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and then a slight hyperosmolar Percoll gradient (density = 1.064 g/ml). PBMC was counted and viability was estimated by trypan blue dry exclusion. Percentage of monocytes after the Percoll gradient was determined by CD45/CD14 staining and analysis using Flow cytometer. The functional monocytes were detected by phagocytosis of latex beads.* ***Results:*** *Our study demonstrated high percentage of viability of both PBMC and monocyte determined by trypan blue exclusion (95.3 and 94.1, respectively). The average of percentage of monocytes present in the PBMC recovered from the initial Ficoll-Hypaque gradient was found to be 21.0 % monocytes. From PBMC 150 x 10^6 cells, using Percoll gradient, an average of 16.8 x 10^6 monocytes with a purity of 81.3% and a recovery of 43.1% were obtained. The functional monocytes detected by phagocytosis of latex beads was shown to be 74.8 %.*
Conclusion: *Percoll density gradient procedure provides highly purified human monocytes and can be done with usual reagents and equipment of average laboratory. Thus, this procedure is still attractive alternative method for resource limited settings because it is convenient, simple and cheap and can be applied for the other immunological research.*

Key Words: ● *Isolation of monocytes* ● *Percoll* ● *Density gradient* ● *Human buffy coat*

RTA Med J 2010;63:13-22.