Thesis Title Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Membrane Molecules on Thrombin-Activated Platelets

Author Miss Nungruthai Nimnuch

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul

ABSTRACT

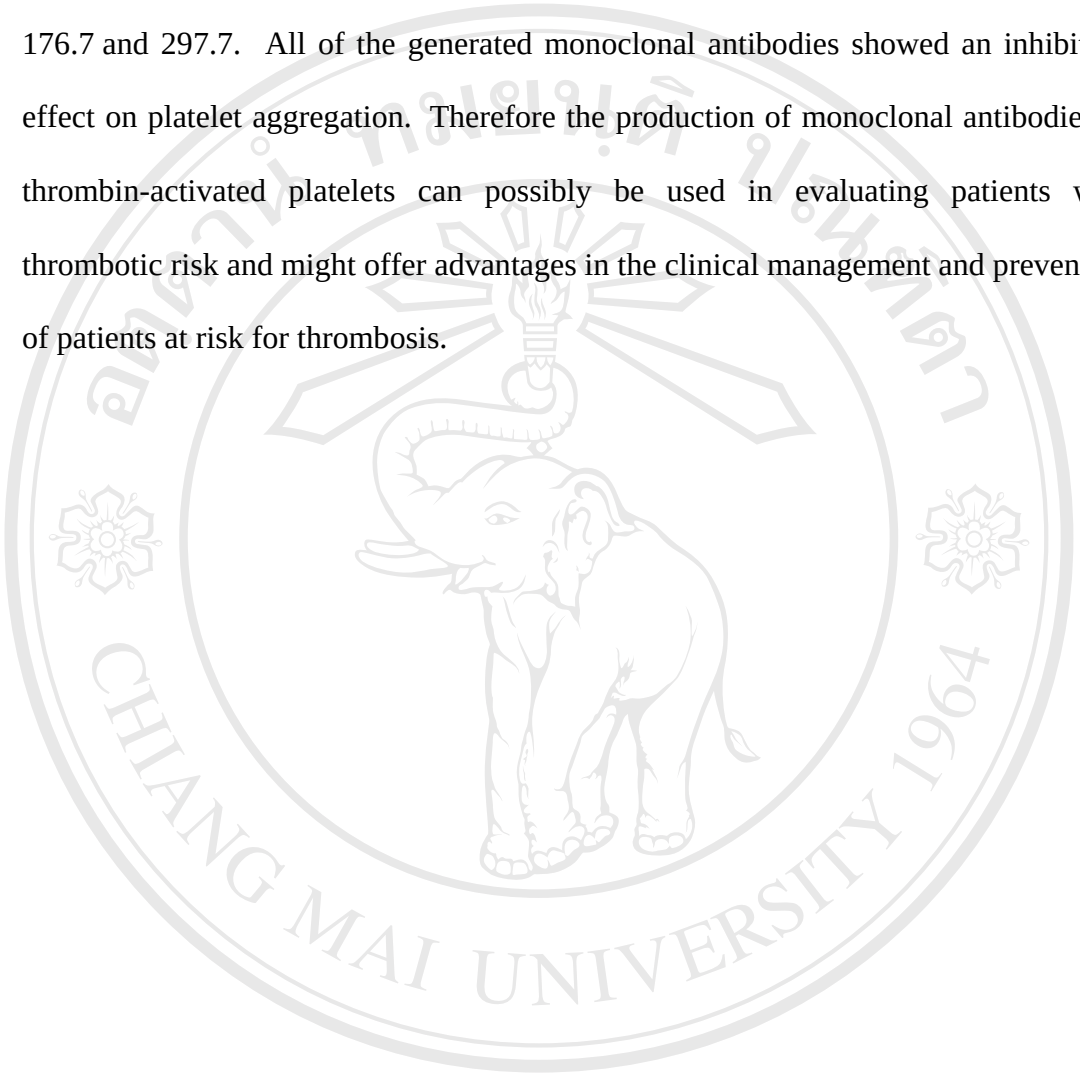
Platelets play a major role in primary hemostasis and blood clotting at sites of vascular injury (thrombogenesis). Indeed, inappropriate platelet activation is common in a variety of clinical diseases especially cardiovascular diseases. As indicated in previous studies, platelet activation occurs and shows pathophysiologic significance in patients with diabetes mellitus, thalassemia and malignancies. Therefore, the detection of activated platelets might facilitate identifying certain patients with a thrombotic risk. Monoclonal antibody (mAb) represents a possible tool in the evaluation of platelet activation. Thus, the objective of this study is to produce and characterize the monoclonal antibodies to membrane molecules on thrombin-activated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

platelets. A BALB/c mouse were immunized with thrombin-activated platelets. The splenocytes of the immunized mouse were then harvested and fused with myeloma cells using the standard hybridoma technique. After screening with indirect immunofluorescent staining followed by flow cytometry, 13 clones of hybridomas secreting mAbs against activated platelets were obtained and subjected to limiting dilution. After screening mAb from a single clone, three hybridomas with strong reactivity were selected and named 138.7, 176.7 and 297.7. Cellular distribution of proteins recognized by the generated mAbs on resting platelets, activated platelets, peripheral blood cells and various hematopoietic cell lines was determined using indirect immunofluorescent staining and flow cytometry. The results showed that mAb clone 297.7 positively reacted to membrane molecule on resting and activated platelets, whereas mAb clones 138.7 and 176.7 showed positive reactivity with activated platelets only. Biochemical characterization of produced mAbs was investigated by SDS-PAGE and Western blotting to determine the molecular weight of the molecules which reacted with interested mAbs. The results indicated that mAb clones 176.7 and 297.7 reacted to a protein band with the molecular weight of 120 kDa and 160 kDa respectively, while mAb clone 138.7 did not bind with any protein band under non-reducing condition. To study the role of these mAbs, the effect of produced mAbs on platelet aggregation was examined by platelet aggregometry and platelet adhesion by indirect ELISA. It was found that, mAb clones 138.7, 176.7 and 297.7 showed an inhibitory effect on ADP and collagen-induced platelet aggregation. However, all of generated mAbs had no effect on platelet adhesion on both immobilized fibrinogen and collagen.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In conclusion, monoclonal antibodies to membrane molecules on thrombin-activated platelets were produced from three hybridoma clones and named 138.7, 176.7 and 297.7. All of the generated monoclonal antibodies showed an inhibitory effect on platelet aggregation. Therefore the production of monoclonal antibodies to thrombin-activated platelets can possibly be used in evaluating patients with thrombotic risk and might offer advantages in the clinical management and prevention of patients at risk for thrombosis.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการหาลักษณะเฉพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยธรอมบิน

ผู้เขียน นางสาว หนึ่งฤทัย นิ่มนุช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล

บทคัดย่อ

เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือดในระยะแรกและการเกิดลิ่มเลือดบริเวณหลอดเลือดที่เกิดบาดแผล การกระตุ้นเกล็ดเลือดที่ไม่เหมาะสมสามารถพบได้ในหลายโรค โดยเฉพาะโรคหลอดเลือดหัวใจ จากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า มีการกระตุ้นเกล็ดเลือดเกิดขึ้นและแสดงถึงพยาธิสรีรวิทยาที่สำคัญในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ธาลัสซีเมียและมะเร็ง ดังนั้นการตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะสามารถใช้จำแนกผู้ป่วยดังกล่าวซึ่งมีภาวะเสี่ยงต่อลิ่มเลือดอุดตันได้และโมโนโคลนอล แอนติบอดีน่าจะใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยธรอมบิน โดยทำการฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c ด้วยเกล็ดเลือดที่กระตุ้นด้วยธรอมบินและทำการแยกเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นนี้มาเชื่อมต่อกับเซลล์ไมอีโลมาโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมามาตรฐาน หลังจากการคัดเลือกด้วยวิธีการย้อมแบบ indirect immunofluorescence และตรวจวิเคราะห์โดยโฟลไซโตเมตรี พบไฮบริโดมาจำนวน 13 โคลนที่ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นและถูกนำมาทำ limiting dilution หลังจากการคัดเลือกโมโนโคลนอล แอนติบอดีจากเซลล์เดี่ยว ไฮบริโดมาจำนวน 3 โคลนที่มีปฏิกิริยาแรงจะถูกคัดเลือกและตั้งชื่อเป็น 138.7, 176.7 และ 297.7 นำไฮบริโดมาทั้ง 3 โคลนมาศึกษาการกระจายตัวระดับเซลล์ของโปรตีนที่ถูกจดจำโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกล็ดเลือดระยะพัก เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น เซลล์เม็ดเลือดและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดเพาะเลี้ยงโดยวิธี indirect immunofluorescent staining และโฟลไซโตเมตรี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 297.7 ทำปฏิกิริยาบวกกับทั้งเกล็ดเลือดระยะพักและเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น ขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 138.7 และ 176.7 แสดงปฏิกิริยาบวกกับเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นเท่านั้น การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นโดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโมเลกุลที่ถูกจดจำโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สนใจ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 176.7 และ 297.7 ทำปฏิกิริยากับโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120 กิโลดาลตัน และ 160 กิโลดาลตันตามลำดับ ขณะที่โมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 138.7 ไม่จับกับโปรตีนใดๆ ภายใต้สภาวะ non-reducing condition และเพื่อศึกษาบทบาทของโมโนโคลนอล แอนติบอดีเหล่านี้ ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด จึงได้ศึกษาผลของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมาต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธี platelet aggregometry และ การเกาะติดของเกล็ดเลือดถูกศึกษาโดย indirect ELISA จากการศึกษาพบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 138.7, 176.7 และ 297.7 ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยเอดีพี และ คอลลาเจน อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอล แอนติบอดีทั้งหมดไม่มีผลต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดทั้งกับไฟบริโนเจนและคอลลาเจน

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยธรอมบินถูกผลิตได้จำนวน 3 โคลนและตั้งชื่อว่า 138.7, 176.7 และ 297.7 และ โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 3 โคลนนั้นสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นน่าจะนำไปใช้ในการประเมินและป้องกันผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved