

การใช้ flow cytometry ในงานวิจัยด้านการแพทย์และทางคลินิก

มงคล เหล่าอารยะ, พ.บ.

ภาควิชาการเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Flow cytometry เป็นเทคนิคในการวัดลักษณะที่หลากหลายของเซลล์แต่ละเซลล์ โดยใช้หลักการวัดความยาวคลื่นแสงที่เซลล์ปล่อยและกระจายออกมาหลังจากได้รับแสงกระตุ้นจากภายนอก เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ช่วงปีคริสต์ศักราช 1970 จนถึงปัจจุบันและได้กลายมาเป็นเครื่องมือสำคัญทางการแพทย์ในสาขาวิชาโลหิตวิทยา และวิทยาภูมิคุ้มกัน การพัฒนาร่วมกันกับเทคโนโลยีด้าน monoclonal antibody และความหลากหลายของสี fluorescence ทำให้มีการประยุกต์ใช้ flow cytometry เพื่อประโยชน์ทางคลินิกและงานวิจัยเพื่อเข้าใจความรู้เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันวิทยาอย่างมากมาย นับถึงปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ flow cytometry มากกว่า 200,000 ชิ้นในฐานข้อมูล medline บทความนี้จะเน้นถึงความรู้พื้นฐานเพื่อความเข้าใจข้อมูลที่ได้จาก flow cytometry และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยและทางคลินิก **เชียงใหม่เวชสาร 2557;53(2):99-109.**

คำสำคัญ: flow cytometry, FACS, immunophenotype, fluorochrome, monoclonal antibody, immunology

Flow cytometry เป็นเทคนิคการวัดลักษณะของเซลล์แต่ละเซลล์โดยใช้หลักการวัดรังสี photon ที่เซลล์กระจาย (scatter) และปล่อยแสง (emit) ออกมาภายหลังได้รับพลังงานแสงกระตุ้นจากภายนอก เทคนิคดังกล่าวได้รับการพัฒนามานานมากกว่า 40 ปี ในระยะแรกการใช้ยังมีข้อจำกัดอย่างมาก เนื่องจากตัวเครื่องมือมีขนาดใหญ่ การใช้ การดูแลรักษา ยาก และราคาแพง จึงถูกใช้เฉพาะงานวิจัยที่ซับซ้อนเท่านั้น แต่ปัจจุบันเทคนิค flow cytometry มีการพัฒนาก้าวหน้าขึ้นอย่างมาก ทำให้สามารถใช้ได้

สะดวกยิ่งขึ้น วัดคุณสมบัติของเซลล์ได้หลากหลาย^[1, 2] ซึ่งอาจมากถึง 13 ลักษณะพร้อม ๆ กัน และใช้เวลาในการวัดลดลงโดยวัดที่อัตราเร็วสูงถึง 100,000 เซลล์ต่อวินาที^[3] ทำให้ flow cytometry ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์หลากหลายสาขาวิชา โดยเฉพาะด้านโลหิตวิทยา และวิทยาภูมิคุ้มกัน จนถึงปัจจุบันมีงานวิจัยทางการแพทย์ที่ได้รับการตีพิมพ์และอยู่ในฐานข้อมูล medline เกือบ 200,000 ชิ้น ที่ใช้เทคนิค flow cytometry ในการรายงานผลและการวิเคราะห์ผลการวิจัย^[4] นอกจาก

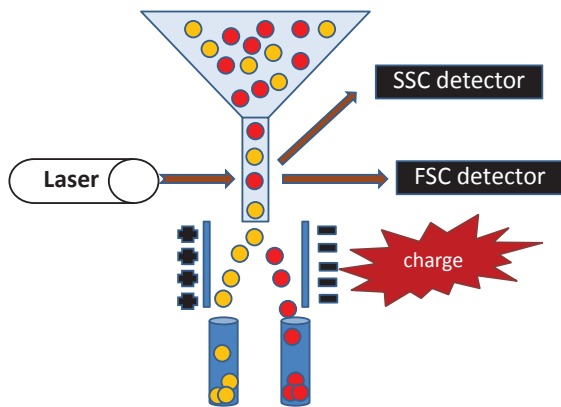
นั้น flow cytometry ยังถูกนำมาใช้ทางคลินิกเพื่อช่วยในการวินิจฉัยและติดตามการรักษาอย่างกว้างขวาง เช่น การวินิจฉัยชนิดของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด การติดตามผลการรักษาของการปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ ช่วยในการตัดสินใจให้ยาต้านไวรัสและติดตามการรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี การวินิจฉัยหาชนิดของสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นสาเหตุ โดยการตรวจ basophil activation test และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่กำเนิดที่มีความผิดปกติของ T และ B cell โดยการวัดปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte แต่ละชนิด และการตรวจการทำงานของ neutrophil เป็นต้น หลักการพื้นฐานและการประยุกต์ใช้ flow cytometry จึงเป็นเรื่องน่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับบุคลากรทางการแพทย์ บทความนี้มีจุดประสงค์เพื่อทบทวนความรู้พื้นฐานและความเข้าใจการทำงานของ flow cytometry การแปลผล การนำเสนอผล และการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกและงานวิจัยทางการแพทย์

หลักการพื้นฐาน

หลักการพื้นฐานของ flow cytometry คือเซลล์ที่ต้องการตรวจสอบจะต้องอยู่ในลักษณะแขวนลอยในสารละลาย (suspension) เครื่องมือจะผลักให้เซลล์ไหลผ่านท่อกรวยขนาดเล็ก ในลักษณะการเรียงตัวเดี่ยว ๆ ผ่านลำแสงเลเซอร์ที่ถูกยิงมาตกกระทบเซลล์ และมีตัวรับ (detector) แสงเลเซอร์ที่ผ่านหรือหักเหออกมา การวัดคุณสมบัติของเซลล์อาศัยการหักเหของแสง การกระจายและปล่อยแสงออกมา โดยแสงที่มีการหักเหเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 5 องศา) เรียกว่า forward scatter (FSC) เป็นตัวบอกขนาดของเซลล์ ส่วนแสงที่หักเหมากออกด้านข้างเรียกว่า side scatter (SSC) เป็นตัววัดคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น granularity, membrane roughness

ที่เรียกรวมว่า cell complexity นอกจากนี้หากเซลล์ถูกจับด้วย monoclonal antibody ต่อองค์ประกอบจำเพาะ (specific marker) ที่สนใจ และติดฉลากสี fluorochrome ที่แตกต่างกัน เมื่อเซลล์ผ่านแสงเลเซอร์จะมีการกระจายของ SSC ผ่านเลนส์และฟิลเตอร์ไปยังตัวรับ photomultiplier tube ซึ่งจะสามารถแยกความยาวคลื่นแสงเปลี่ยนเป็นสัญญาณดิจิทัล ประมวลผล นำมาแสดงและแปลผล ทำให้สามารถแยกลักษณะความแตกต่างของแต่ละเซลล์ที่มี specific marker ที่สนใจออกจากกันเซลล์อื่น ๆ บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ได้ นอกจากนี้ flow cytometer บางเครื่องยังสามารถใช้แยกเซลล์ที่สนใจออกมาต่างหาก โดยการปรับประจุบวกตามการปล่อยพลังงานแสงของเซลล์ ด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า โดยวิธีดังกล่าวเรียกว่า fluorescence-activated cell sorting (FACS) โดยเซลล์ที่แยกออกมาได้นี้จะยังมีชีวิต และมีคุณสมบัติที่ไม่เปลี่ยนแปลง สามารถนำไปเพาะเลี้ยง (culture) หรือใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไปได้^[1,2] (รูปที่ 1)

การเลือกชนิด fluorochrome ที่ติดอยู่กับ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ เพื่อแยกคุณสมบัติของเซลล์นั้น ขึ้นกับความสามารถตรวจวัดความยาวคลื่นของสี fluorochrome ของเครื่อง flow cytometer โดยจะต้องเลือกสีที่เครื่องสามารถตรวจจับในช่วงความยาวคลื่นนั้น ๆ และนำมาประมวลผลแยกความแตกต่างของเซลล์ได้ เรียกการแยกความแตกต่างของเซลล์นี้ว่า gating เครื่องพื้นฐานอาจแยกได้เพียง 2-3 สี ซึ่งเพียงพอกับการใช้งานทางคลินิกง่าย ๆ เช่น การวัดจำนวน T helper-cell ด้วยการย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยสี fluorochrome ที่ติดกับ monoclonal antibody ต่อ CD3, CD4 และ CD8 ในขณะที่เครื่องมือขั้นสูงจะตรวจวัดความยาวคลื่นได้หลายระยะ ทำให้ผู้ตรวจสามารถย้อมเซลล์ด้วยสี fluorochrome หลากหลายพร้อม



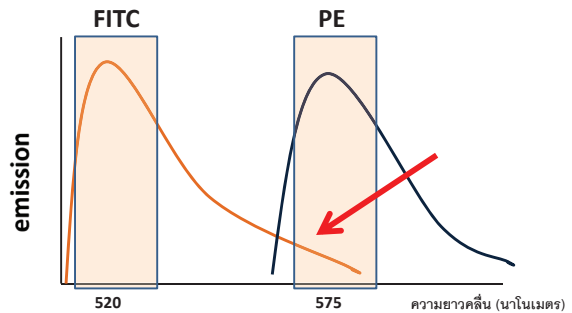
รูปที่ 1. หลักการทำงานของ flow cytometry โดยเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายไหลผ่านท่อกรวย และลำแสงเลเซอร์ยิงมาตกกระทบ จากนั้นจะมีตัวรับแสงที่ออกมาจากเซลล์ ทั้ง forward scatter (FSC) และ side scatter (SSC) แปลผลเป็นคุณสมบัติของเซลล์ ส่วน fluorescence-activated cell sorting (FACS) จะสามารถแยกเซลล์ที่สนใจออกมาโดยการปรับประจุบนผิวเซลล์

กัน ซึ่งอาจมากถึง 13 สี อย่างไรก็ตาม การวัดสีหลายสีพร้อมกันนี้ จะมีโอกาสที่สีเหล่านี้ให้ความยาวคลื่นที่ซ้อนทับกันได้ (spillover) ทำให้เกิดการแปลผลที่ผิดพลาด (รูปที่ 2) จึงต้องมีกระบวนการที่เรียกว่า compensation เพื่อให้การแปลผลในการแยกลักษณะของเซลล์ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น^[1-3]

การแปลและแสดงผล

ข้อควรคำนึงที่สำคัญของการใช้เทคนิค flow cytometry เพื่อการแปลผลที่แม่นยำ ถูกต้องมีดังนี้ คือ

1. การออกแบบการทดลองและการเลือก negative control นอกเหนือจากการเลือก monoclonal antibody ที่ใช้แล้ว การเลือกสี fluorochrome ที่ใช้ในการย้อมเซลล์มีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะเมื่อต้องย้อมหลาย ๆ สีพร้อมกัน ซึ่งหากเลือกสีไม่เหมาะสม อาจมีผลต่อการแปลผลได้โดยทำให้เกิดผลลบลง (false negative) เช่น การใช้สีที่มีความ



รูปที่ 2. กราฟแสดงตัวอย่างความยาวคลื่นแสงของสี fluoro-chrome สองชนิดคือ FITC และ PE ที่ตัวรับบนเครื่อง flow cytometry สามารถรับได้ (แสดงในกรอบสีเหลี่ยม) จะเห็นว่าช่วงที่ตัวรับความยาวคลื่นแสงของ PE ที่เครื่องวัดได้ มีช่วงความยาวคลื่นแสงของ FITC มาคร่อมอยู่ด้วย (ลูกศรสีแดง) เรียกว่า spillover ซึ่งหากไม่ได้รับการแก้ไขด้วย compensation ที่เหมาะสม จะทำให้การวัดเซลล์ที่ให้ผลบวกกับ PE ไม่ถูกต้อง

เข้ม (intensity) สูง มาย้อม surface marker ที่มีปริมาณมากบนเซลล์ พร้อมกับการใช้สีที่มีความเข้มน้อยมาย้อม surface marker ที่พบได้น้อย โอกาสที่จะตรวจพบ surface marker ที่พบได้น้อยจะลดลง เพราะสีที่มีความเข้มสูงอาจ spillover บดบังตัวรับความยาวคลื่นของสีที่มีความเข้มน้อยได้ หลักการเบื้องต้นที่สำคัญของการเลือกชนิดของสี fluoro-chrome คือ ใช้สีที่มีความเข้มสูงในการจับ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ marker ที่พบได้น้อย ส่วนสีที่ความเข้มน้อยควรใช้กับ marker ที่พบได้มากกว่า^[1]

อีกประเด็นที่สำคัญคือการแปลผลว่าเซลล์เป้าหมายย้อมติดสีหรือไม่ หรือติดสีที่จำเพาะต่อ marker หรือไม่ โดยเฉพาะเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสีหลายสีที่มีความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกันพร้อม ๆ กัน ควรมีการย้อม fluorescence minus one (FMO) เพื่อช่วยในการตัดสินใจว่าเมื่อใดจะแปลผลการย้อมสีนั้นว่าเป็นบวก^[1,2] เช่น หากต้องย้อมเซลล์ด้วยสี 7 สี หากต้องการตัดสินใจว่าเซลล์กลุ่มใดให้สี fluorescein

isothiocyanate conjugate (FITC) เป็นบวก ทำได้โดยการย้อม FMO คือย้อมสีอื่น ๆ อีก 6 สี ยกเว้นสีที่เราต้องการคือ FITC เทคนิคดังกล่าวจะช่วยทำให้การ gating เลือกกลุ่มเซลล์เป้าหมายมีความถูกต้องมากขึ้น และลดความผิดพลาดจากการ gating สีอื่น ๆ ที่มีความยาวคลื่นคร่อมกัน มา spillover ต่อช่วงความยาวคลื่นของ FITC ได้ การใช้ FMO ควรทำกับทุกสีที่มีการใช้ย้อม เช่น กรณีที่ย้อม 7 สี ก็ควรทำ FMO ที่ละสี จนครบทั้ง 7 สี เพื่อการ gating ที่ถูกต้อง นอกจากนั้นในบางการทดลอง การใช้ isotype control^[1,2,5] ก็ช่วยในการตัดสินใจ gating ได้ โดย isotype control เป็น monoclonal antibody ที่ไม่จำเพาะ แต่เป็น antibody ใน isotype เดียวกันกับ antibody ที่เราใช้ในการย้อม และติดฉลากด้วยสี fluorochrome ชนิดเดียวกัน ช่วยบอก background ของสีชนิดนั้น เซลล์ที่อยู่ในช่วงเดียวกับ isotype control คือ เซลล์ที่ให้ผลลบ ส่วนอยู่นอกช่วงนั้นก็จะเป็นเซลล์ที่ให้ผลบวก

ในการตีพิมพ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ flow cytometry โดยเฉพาะเพื่อหาเซลล์กลุ่มที่พบได้ยาก (rare population) ผู้วิจัยควรแสดงชนิดของสี fluorochrome ทั้งหมดที่ใช้ และแสดงวิธีการ gating กลุ่มเซลล์ที่สนใจ ซึ่งอาจต้องนำเสนอการใช้ FMO หรือ isotype control ด้วย เพื่อเป็นการยืนยันว่าเซลล์กลุ่มที่เลือกนั้นถูกต้องจริง

2. เลือกจำนวนเซลล์ที่วัด (event number) ที่เหมาะสม เพื่อแสดงค่าที่ถูกต้องของข้อมูล ทั้งนี้ขึ้นกับค่าการกระจายของข้อมูลที่วัด (standard deviation; SD) ถ้าการกระจายน้อยการวัดนั้นก็ยิ่งแม่นยำ ซึ่งในกรณีเป็นการหาเซลล์กลุ่มที่พบได้ยาก การกระจายของข้อมูลจะเป็นแบบ poisson นั่นคือค่า SD จะเท่ากับรากที่สองของจำนวนประชากร^[6] ดังนั้นหาก event number เท่ากับ 100 ค่าสัมประสิทธิ์การแปรผัน (coefficient of variation;

CV) จะเท่ากับ 10% ($\sqrt{100}/100$) แต่ถ้าตรวจเพิ่มขึ้นเป็น 10,000 event ค่า CV ก็จะลดลงเหลือ 1% ($\sqrt{10,000}/10,000$) แสดงว่าหากต้องการหาเซลล์ที่สนใจให้ถูกต้องยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจำเป็นต้องตั้งค่า event number มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าหากตั้งค่า event number เพิ่มขึ้นเป็น 100,000 ค่า CV จะเท่ากับ 0.3% แต่ถ้าเพิ่มค่า event number เป็น 200,000 ค่า CV จะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คือเท่ากับ 0.22% ในทางปฏิบัติจริง event number มีข้อจำกัดตามปริมาณเซลล์ที่มีทั้งหมดในกลุ่มตัวอย่าง จึงเป็นการยากที่จะบอกค่าเท่าไรจึงจะเหมาะสม แต่อาจพิจารณาจาก event number ที่ทำให้ค่า CV ก่อนข้างคางที่และต่ำที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้^[2,6]

3. การแสดงผลข้อมูลที่ได้ ผลที่ได้จากการวัดโดย flow cytometry อาจแสดงได้ในสองรูปแบบ คือเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก (percentage positive) หรือค่าเฉลี่ยความเข้มสี (mean fluorescence intensity; MFI)^[1,2] การเลือกที่จะแสดงค่าใดนั้นขึ้นกับลักษณะข้อมูล เช่น กรณีที่วัดจำนวนเซลล์ที่แยกจากกันได้อย่างชัดเจน เป็นลักษณะ bimodal distribution เช่น ในการวัดจำนวนเซลล์ CD4 positive cell จาก T-cell ทั้งหมด ก็ควรแสดงเป็นร้อยละของ CD4 positive cell หรือจากตัวอย่างที่ได้จากการทำ basophil activation test หลังจาก que basophil ได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้จะแสดง CD63 บนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นการวัดการมีหรือไม่มีของ CD63 บนผิวเซลล์ก็ควรแสดงเป็นค่าร้อยละของ CD63 positive cell ซึ่งทำให้เห็นข้อมูลได้ชัดเจนกว่า ในทางตรงกันข้ามหากกลุ่มประชากรเป็นลักษณะ unimodal distribution เช่น การเปรียบเทียบการสร้าง IL-5 ที่อยู่ใน Th2 cell ระหว่างเซลล์กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น การแยกเซลล์กลุ่มที่มี IL-5 กับที่ไม่มี IL-5 อาจไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากขึ้นกับปริมาณ IL-5 มาก

น้อยที่แต่ละเซลล์สร้างขึ้นด้วย กรณีเช่นนี้ การแสดงด้วยค่า MFI เพื่อเปรียบเทียบความมายน้อย ก็อาจเหมาะสมกว่า

นอกจากการแสดงผลในรูปตัวเลขแล้ว การแสดงรูปภาพก็มีความสำคัญในการนำเสนอข้อมูล และสามารถทำให้ผู้อ่านงานวิจัย เข้าใจวิธีการ gating เลือกกลุ่มเซลล์ที่สนใจได้มากขึ้น ทำให้การนำเสนอผลดูน่าเชื่อถือ และผู้อ่านสามารถนำวิธีการ gating ไปทำการทดลองซ้ำได้ ซึ่งในปัจจุบันการนำเสนองานวิจัยที่ใช้ flow cytometry ในการหา marker บนเซลล์ชนิดใหม่ หรือในเซลล์กลุ่มที่หายากจำเป็นต้องแสดงรูปภาพด้วยเพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล โดยรูปแบบการนำเสนอหลัก ๆ มี 2 แบบ คือ

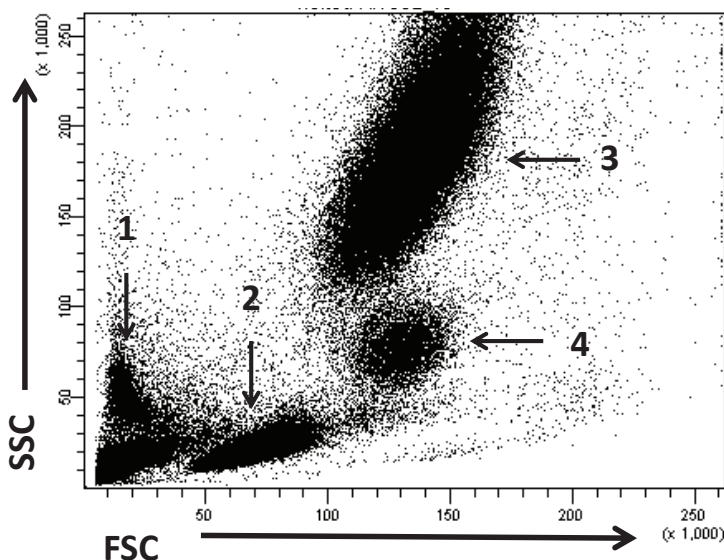
1) แบบแผนภูมิ (histogram) หากผู้วิจัยต้องการนำเสนอเพียงตัวแปรเดียว ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 4 ก ที่ต้องการนำเสนอเพียงกลุ่มเซลล์ที่ CD3 positive และกลุ่มที่ CD3 negative

2) แบบกราฟ (graph plot) เมื่อผู้วิจัยต้องการนำเสนอ 2 ตัวแปรร่วมกัน (bivariate plot) แบ่งเป็นการนำเสนอแบบ dot plot ซึ่งจะแสดงทุกเซลล์

ที่วัด (all event) (รูปที่ 3 และ 4 ข) และการนำเสนอแบบ smooth contour plot เป็นการนำเสนอเฉพาะตำแหน่งที่มีเซลล์อยู่อย่างหนาแน่น โดยสนใจบริเวณที่อยู่นอกเหนือนี้น้อยลง (รูปที่ 4 ค และ ง) การเลือกที่จะนำเสนอในรูปแบบใดนั้นขึ้นกับความเหมาะสมของแต่ละข้อมูล ซึ่งควรเป็นการนำเสนอที่แสดงให้ผู้อ่านงานวิจัยสามารถเข้าใจได้ง่ายเป็นหลัก^[1, 2]

การประยุกต์ใช้ flow cytometry

1. การวัดจำนวนเซลล์ (enumeration) เป็นการวัดพื้นฐานที่นำมาใช้บ่อยที่สุดในทางคลินิกและงานวิจัย เช่น การใช้ FSC และ SSC ในการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวว่าเป็น lymphocyte, monocyte หรือ granulocyte (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นหลักการในการตรวจ automated complete blood count (CBC) ในปัจจุบัน และนอกจากนี้หากใช้การย้อมด้วย fluorochrome ก็สามารถนำมาใช้แยกจำนวนเซลล์ที่สนใจ เช่น lymphocyte ชนิด T-cell, B-cell และ natural killer cell ซึ่งไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการ



รูปที่ 3. Dot plot จาก peripheral blood โดยเซลล์กลุ่มที่ 1 เป็นซากเซลล์ที่ตายแล้ว (debris) เซลล์กลุ่มที่ 2 เป็น lymphocyte เซลล์กลุ่มที่ 3 เป็น granulocyte และเซลล์กลุ่มที่ 4 เป็น monocyte (SSC คือ side scatter; FSC คือ forward scatter)

มองผ่านกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้

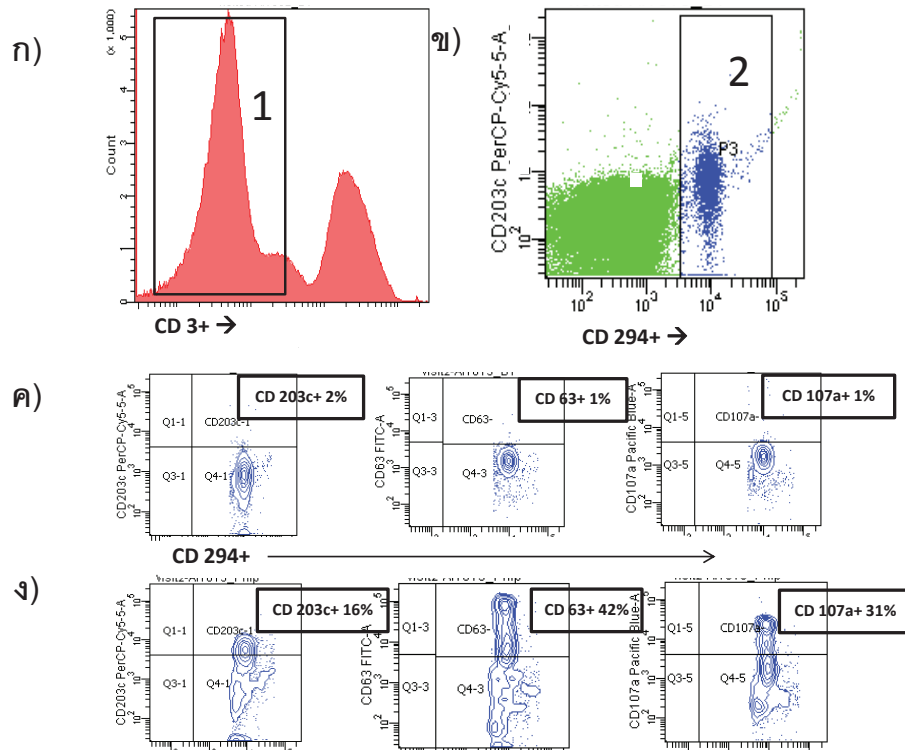
2. การย้อมลักษณะบนผิวเซลล์ (surface staining) ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ surface marker ที่ติดฉลากด้วยสี fluorochrome เป็นการประยุกต์ใช้เครื่อง flow cytometry ทางการแพทย์ที่ใช้บ่อยที่สุด เช่น การตรวจวัดปริมาณ T-helper cell (CD3+CD4+CD8-) ก่อนเริ่มยาต้านไวรัส และติดตามการรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี การตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดขาว lymphocyte ชนิด B-cell (CD19, CD20 และ CD22) และ T-cell (CD2, CD3, CD4 และ CD8) ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-cell [7] การวินิจฉัยและแยกชนิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ด้วยการย้อม monoclonal antibody ต่อ common leukocyte antigen (CD45) ซึ่งเซลล์ตัวอ่อน (blast) จะติดสีน้อยกว่าปกติ (dim) การย้อมด้วย CD34 และ HLA-DR antigen ซึ่งพบบนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และติดตามการรักษาหลังการปลูกถ่ายสเต็มเซลล์ [8] การแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิด myeloid (AML) [9] โดยชนิด monocytic จะพบ CD4, CD11b, CD11c, CD14, CD36, CD64 หรือ CD68 ชนิด megakaryocytic จะพบ CD41 และ CD61 ส่วนชนิด erythrocytic จะพบ CD235 (glycophorin-A) เป็นต้น

นอกจากนี้ การย้อม surface marker ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ surface marker ภายหลังการกระตุ้น เช่น การตรวจ basophil activation test [10,11] ซึ่งช่วยการวินิจฉัยโรคภูมิแพ้โดยเฉพาะแพ้ยาลา และแพ้พิษแมลง ที่ใช้อย่างแพร่หลายทางคลินิกในต่างประเทศ แต่ในประเทศไทยยังมีการใช้จำกัดเฉพาะในงานวิจัยเท่านั้น หลักการคือ เมื่อ basophil ได้รับการกระตุ้นจากสารก่อภูมิแพ้ที่เป็นสาเหตุใน

บุคคลที่แพ้ จะมีการเพิ่มขึ้นของ surface marker ที่แสดงว่าเกิด degranulation ของ basophil โดย marker ที่นิยมใช้คือ CD63, CD203c, CD107a และนำมาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นและที่ไม่ได้รับการกระตุ้นได้ (รูปที่ 4)

3. การวัดการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) เทคนิคนี้ยังถูกจำกัดการใช้เพื่อประโยชน์ในการวิจัยเท่านั้น โดยใช้ดูการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์ ภายหลังการกระตุ้น เช่น การวัดการเพิ่มจำนวนของ antigen-specific T-cell ภายหลังการกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ที่เคยพบมาก่อน ในอดีตการวัดการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้สารต้นกำเนิด nucleotide ที่ติดด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น 3H-tritiated thymidine และวัดการเปลี่ยนแปลงของสารกัมมันตรังสีดังกล่าวภายหลังเซลล์มีการแบ่งตัว แต่เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายจากการได้รับสารกัมมันตรังสี จึงมีการประยุกต์ใช้ carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) แทน [12] โดยในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัว เซลล์จะนำสารดังกล่าวเข้าไปในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็น cytoplasmic protein เซลล์ใหม่ที่เกิดแบ่งตัวออกมาจะมีปริมาณความเข้มข้นของสารดังกล่าวภายในเซลล์ลดลงไปเรื่อยๆ หากทำการวัดด้วยวิธี flow cytometry ก็จะสามารถวัดความเข้มข้นของแสงที่ลดลงเป็นสัดส่วนกับการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์ นอกเหนือจาก CFSE แล้ว ก็ยังมีการใช้สารอื่น ๆ เช่น PKH26 ที่สามารถติดบนผิวของเซลล์ที่มีชีวิตและติดตามการแบ่งตัวได้ [13]

4. การย้อมการสร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining) เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการวิจัยในปัจจุบัน โดยเริ่มแรกใช้ในการแยกชนิดของ CD4 T-helper cell ในงานวิจัย [14] คือการแยก Th1 และ Th2 ออกจากกันด้วยการย้อมลักษณะไซโตไคน์ที่สร้างภายในเซลล์ โดยพบว่า Th1 จะสร้าง interferon-gamma ในขณะที่ Th2



รูปที่ 4. ผล basophil activation test ก) histogram ของเซลล์ที่ย้อมด้วย CD3 monoclonal antibody ข) dot plot ของ CD203c และ CD294 โดยการเลือก basophil ทำโดย gating เซลล์ที่ CD3 negative (ภายในสี่เหลี่ยมที่ 1) และเซลล์ที่ CD294 positive (ภายในสี่เหลี่ยมที่ 2) ซึ่งเมื่อได้กลุ่มเซลล์ basophil ที่ต้องการแล้ว จึงดู surface marker ที่แสดงถึงการ degranulation ของเซลล์ ได้แก่ CD63, CD107a และ CD203c ตามลำดับ โดย ค) smooth contour plot ของ basophil ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ และ ง) basophil ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ จะเห็นได้ว่าการแสดงของ CD63, CD107a และ CD203c เพิ่มขึ้น

จะสร้าง IL-4, IL-5 และ IL-13 ภายหลังมีการนำมาประยุกต์ใช้ย้อมไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ ในเซลล์หลากหลายชนิด จุดสำคัญประการหนึ่งของเทคนิคนี้คือ ไซโตไคน์ต่างถูกสร้างและอยู่ภายในเซลล์ ผู้วิจัยจึงต้องใช้วิธีที่แตกต่างจากการย้อม surface marker โดยเซลล์ที่สนใจจะต้องได้รับสารเพื่อกระตุ้นการสร้างและยับยั้งการหลั่งของไซโตไคน์ออกไปนอกเซลล์ เช่น การให้ monensin หรือ brefeldin A ก่อนการย้อม 4-12 ชั่วโมง และเซลล์จะต้องถูก fixation และ permeabilization เพื่อให้สีสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปย้อมติดไซโตไคน์ภายในเซลล์ได้ แต่ข้อเสียคือการย้อมดังกล่าวจะทำให้เซลล์ตายไม่สามารถนำมา

culture ต่อได้อีก^[2]

5. การวัดไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (multiplex bead assay) ในอดีตการวัดไซโตไคน์ที่ออกมาในสารคัดหลั่ง หรือใน supernatant ของ cell culture อาจวัดได้ด้วย วิธี ELISA หรือ western blot เท่านั้น แต่ปัจจุบันมีการทำให้การวัดง่ายขึ้นและสามารถวัดปริมาณไซโตไคน์หลาย ๆ ชนิดได้พร้อมกัน เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในงานวิจัยที่มีปริมาณสารละลายตัวอย่างจำกัด แต่ต้องวัดไซโตไคน์หลายชนิด โดยการใช้ monoclonal antibody ที่ติดกับเม็ด bead มาจับกับไซโตไคน์แบบจำเพาะ และนำมาจับอีกครั้งด้วย complementary mono-

clonal antibody ที่ติดฉลากด้วยสี fluorochrome แล้วจึงนำมาวัดความเข้มของสีที่ติดบนเม็ด bead อีกครั้งด้วยหลักการของ flow cytometry แปลผลเป็นความเข้มข้นของไซโตไคน์ที่อยู่ในสารละลายได้ การวัดโดยหลักการดังกล่าวมีการทำเป็นชุดเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น Luminex, BD cytokine bead assay เป็นต้น^[15]

6. การย้อมดูสารตัวกลางภายในเซลล์ (intracellular target staining) การย้อมดูสารภายในเซลล์ไม่จำกัดเฉพาะไซโตไคน์ที่อยู่ใน cytoplasm เท่านั้น ผู้วิจัยสามารถย้อมดูสารตัวกลางอื่น ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ได้ เช่น signaling molecule และ transcription factor เช่นตัวอย่างที่ใช้บ่อยในงานวิจัยด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน คือ การย้อม transcription factor Foxp3 ในการแยก regulatory T-cell¹⁶ การย้อม phosphoprotein ที่จำเพาะซึ่งเป็นสารตัวกลางที่แสดงภายหลังเซลล์ได้รับการกระตุ้น เช่น การวัด ปริมาณ p38 MAPK phosphorylation^[17] ใน basophil หลังการกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ ใช้เป็นตัววัดอย่างหนึ่งใน basophil activation test เป็นต้น

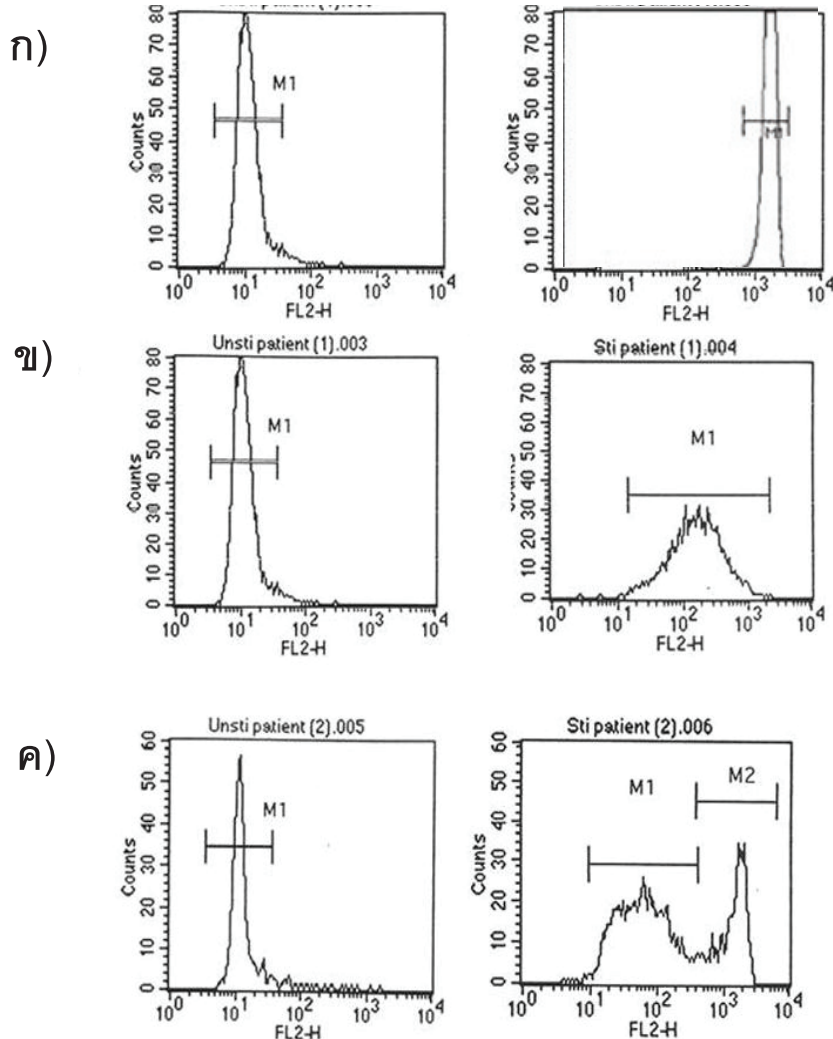
7. การดูการทำงานของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ (physiologic response and kinetic assays) เป็นการใช้หลักการ intracellular staining ในการย้อมการทำงานของเซลล์ในเวลาที่แตกต่างกัน^[18] เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเซลล์ นั้น ๆ เช่น การตรวจ tyrosine phosphorylation, calcium influx, cell proliferation หรือ oxidative metabolism ตัวอย่างที่ชัดเจนในการประยุกต์ใช้ทางคลินิก ได้แก่ การตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค chronic granulomatous disease ที่มีการทำงานของ neutrophil oxidative burst ผิดปกติ โดยการให้สีที่ปกติเป็น non-fluorescence คือ 123-dihydrorhodamine เข้าไปใน neutrophil ที่

ปกติ สีนี้จะถูก oxidized เป็น สี fluorescence ที่เข้ม คือ 123-rhodamine^[19] ทำให้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ได้ด้วย flow cytometry แต่ในผู้ที่เป็โรคหรือเป็นพาหะโรคดังกล่าว ความเข้มของสีจะน้อยกว่าปกติ (ดังรูปที่ 5)

8. การวินิจฉัยทาง molecular biology การใช้ flow cytometry มาช่วยในการวินิจฉัยร่วมกับการตรวจในระดับสารพันธุกรรม เช่น การตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP) เพื่อหาความหลากหลายของ allele หมู่เลือดชนิดต่าง ๆ ของเม็ดเลือดแดง ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มจำนวน DNA ที่สนใจในเบื้องต้น และทำการตรวจวัดให้ง่ายขึ้นด้วยการให้จับกับ microarray bead ที่ถูกติดฉลากด้วย fluorochrome แล้ววัดแสงที่ออกมาโดยหลักการของ flow cytometry เช่นเดียวกับการวัดไซโตไคน์ด้วย multiplex bead assay ซึ่งในปัจจุบันการตรวจดังกล่าวมีเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อการค้าเช่นกัน^[20]

ข้อจำกัดของ flow cytometry

ข้อดีที่สำคัญของ flow cytometry คือการที่สามารถวัด marker หลาย ๆ อย่างบนเซลล์เดียว ๆ ได้ ซึ่งต่างจากการย้อม immunohistochemistry ที่ย้อมสีได้อย่างจำกัด แต่การเตรียมเซลล์เพื่อวัดด้วย flow cytometry นั้นเซลล์จำเป็นต้องอยู่ในรูปแขวนลอยในสารละลายเป็นข้อจำกัดที่สำคัญเช่นกัน หากต้องการวัดเซลล์ในเนื้อเยื่อด้วย flow cytometry ก็ต้องทำการแยกเซลล์ที่รวมตัวกันเป็นเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยว ๆ แขวนลอยในสารละลายเสียก่อน ปัจจุบันมีความพยายามในการพัฒนาเทคโนโลยีที่เรียกว่า laser scanning cytometry^[21] เพื่อวัดลักษณะเซลล์ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ (in situ) ได้



รูปที่ 5. Histogram แสดงผลการตรวจการทำงานงานกระบวนการ oxidative burst ใน neutrophil โดยภาพ ก) ในคนปกติ การให้ 123-dihydrorhodamine เข้าไปใน neutrophil ภายหลังการกระตุ้น (รูปขวามือ) จะถูก oxidized เป็น 123-rhodamine ทำให้กราฟเลื่อนไปด้านขวามือ ข) ในผู้ป่วย chronic granulomatous disease กราฟเลื่อนไปเพียงเล็กน้อย แสดงว่า กระบวนการเกิด oxidative burst ผิดปกติ ค) ในผู้ที่ป่วยโรค จะเห็นได้ว่า neutrophil ภายหลังการกระตุ้น จะแบ่งเป็นสองกลุ่ม ส่วนหนึ่งปกติ คือ เลื่อนไปทางขวามือ แต่อีกส่วนหนึ่งผิดปกติ คือเกิด oxidative burst น้อย ผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการของโรคเนื่องจาก neutrophil กลุ่มที่ปกติยังมีปริมาณเพียงพอที่กำจัดเชื้อโรคได้

สรุป

Flow cytometry เป็นเทคนิคการวัดจำนวน คุณสมบัติ และการทำงานของเซลล์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้หลากหลาย และนำมาใช้งานวิจัยทางการแพทย์มากมาย การทราบความรู้พื้น

ฐาน การแปลผล และการนำเสนอผลของข้อมูล มีประโยชน์อย่างมากในการรักษาผู้ป่วย และที่สำคัญ ช่วยให้เข้าใจในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะด้านโลหิตวิทยา และวิทยาภูมิคุ้มกันมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

กิตติกรรมประกาศ ขอขอบคุณ ศ.พญ.มูทิตา ตระกูลทิวากร และ อ.นพ.สิระ นันทพิศาล สำหรับคำแนะนำในการแก้ไขบทความ

เอกสารอ้างอิง

1. Shapiro H. Practical Flow Cytometry. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2003.
2. Moloney M, Shreffler WG. Basic science for the practicing physician: flow cytometry and cell sorting. Ann Allergy Asthma Immunol 2008;101:544-9.
3. De Rosa SC, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. Nat Med 2001;7:245-8.
4. Flow cytometry. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. [Accessed March 5, 2014]
5. O'Gorman MR, Thomas J. Isotype controls-time to let go? Cytometry 1999;38:78-80.
6. Roederer M. How many events is enough? Are you positive? Cytometry A 2008;73:384-5.
7. de Vries E, Noordzij JG, Kuijpers TW, van Dongen JJ. Flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and follow-up of immunodeficient children. Eur J Pediatr 2001;160:583-91.
8. Riley RS, Massey D, Jackson-Cook C, Idowu M, Romagnoli G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2002;16:245-99, v.
9. Todd WM. Acute myeloid leukemia and related conditions. Hematol Oncol Clin North Am 2002;16:301-19.
10. MacGlashan DW, Jr. Basophil activation testing. J Allergy Clin Immunol 2013;132:777-87.
11. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. J Allergy Clin Immunol 1991;88:328-38.
12. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 1994;171:131-7.
13. Wallace PK, Palmer LD, Perry-Lalley D, et al. Mechanisms of adoptive immunotherapy: improved methods for in vivo tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells. Cancer Res 1993;53:2358-67.
14. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J Immunol Methods 1995;188:117-28.
15. Earley MC, Vogt RF, Jr., Shapiro HM, et al. Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. Cytometry 2002;50:239-42.
16. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet 2001;27:68-73.
17. Ebo DG, Dombrecht EJ, Bridts CH, Aerts NE, de Clerck LS, Stevens WJ. Combined analysis of intracellular signalling and immunophenotype of human peripheral blood basophils by flow cytometry: a proof of concept. Clin Exp Allergy 2007;37:1668-75.
18. Shapiro HM, Natale PJ, Kametsky LA. Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry. Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76:5728-30.
19. Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, et al. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. J Allergy Clin Immunol 2003;111:374-9.
20. Drago F, Karpasitou K, Poli F. Microarray Beads for Identifying Blood Group Single Nucleotide Polymorphisms. Transfus Med Hemother 2009;36:157-60.
21. Harnett MM. Laser scanning cytometry: understanding the immune system in situ. Nat Rev Immunol 2007;7:897-904.

Flow cytometry in medical research and clinical applications

Mongkol Lao-araya, M.D.

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Flow cytometry is a technique used to evaluate multiple parameters of individual cell by measuring the light wavelength they scatter or emit as they stream individually through a light source. The flow cytometer has been developed since the 1970's and rapidly became an essential instrument for medical sciences especially in hematology and immunology. This technique has evolved together with technology in monoclonal antibody and the fluorescent molecules, leading to many clinical applications and transforming our understanding of immunology. Presently, almost 200,000 research articles in Medline referencing flow cytometry have been published. This review focuses primarily on basic background information for evaluation of flow cytometry data and its applications in research and clinical practice. **Chiang Mai Medical Journal 2014;53(2):99-109.**

Keywords: flow cytometry, FACS, immunophenotype, fluorochrome, monoclonal antibody, immunology