

ย่อวารสาร

Key Markers of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

Min Xia, MD, Hong Zhang, MD, Zhenghua Lu, BSc, Yuan Gao, BSc, Xuelian Liao, MD, and Hong Li, MD, J Pediatr Hematol Oncol 2016;38:422-18.

ผู้ป่วย ALL มีพยากรณ์โรคที่ดีขึ้นในทศวรรษที่ผ่านมา อัตราการปลอดโรคใน 5 ปีแรกอยู่ที่ประมาณร้อยละ 80 โดยขึ้นอยู่กับยาเคมีบำบัดที่ได้รับและ biological factors เช่น translocation และ cytogenetics อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีผู้ป่วยบางกลุ่มได้รับการรักษาที่มากขึ้น ในขณะที่บางกลุ่มอาจจะต้องการเคมีบำบัดที่มากขึ้น ดังนั้นควรเพิ่ม cure rate โดยใช้ยาเคมีบำบัดให้น้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาที่ไม่จำเป็น ซึ่งที่ผ่านมาเราใช้ minimal residual disease (MRD) ในการคาดคะเนผลการรักษาและประเมินการตอบสนองต่อการรักษาอีกด้วย

การตรวจ MRD โดยใช้วิธี flow cytometry (FCM) ขึ้นอยู่กับ antibodies ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งนั้นๆ เพื่อที่จะแยกเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์ปกติ ถึงแม้จะเป็นวิธีที่เร็วและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ markers ของ FCM สำหรับ MRD ยังไม่ได้รับการทำให้เป็นมาตรฐาน ซึ่งอุปสรรคที่สำคัญคือ ความซับซ้อน ราคาที่สูง และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญในการแปลผล การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ expression markers ที่หาง่ายและราคาไม่แพงในการทำ flow cytometric assay โดยขึ้นกับการแสดงออกของ CD19, CD10 และ CD34 จากเซลล์ใน bone marrow ร่วมกับ key markers อื่นๆ เช่น terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT), CD38, CD45, และ CD58

ส่วนมาก TdT จะพบได้สูงใน ALL และส่วนน้อยใน AML ดังนั้นจึงถือว่าเป็นตัวชี้วัดที่ดี ส่วน CD38 เป็น transmembrane glycoprotein ที่พบได้ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดและไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือด แต่ CD38 expression ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นมีความสัมพันธ์กับ disease progression ด้วย ทำให้เป็น target ที่น่าสนใจของ Ab-based therapeutics จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือการระบุ key markers สำหรับ MRD ในผู้ป่วยเด็กโรค ALL ซึ่งอาจช่วยให้การพยากรณ์โรคดีขึ้น

การศึกษานี้ได้เก็บเซลล์ไขกระดูกจากผู้ป่วยใหม่ B-lineage ALL ทั้งหมด 139 ราย อายุระหว่าง 2 เดือนถึง 15 ปี โดยผู้ป่วยทุกรายได้รับยาเคมีบำบัดที่ประกอบด้วย vincristine, daunorubicin, L-asparaginase และ prednisolone เกณฑ์การคัดออกคือผู้ป่วย Down syndrome และ testicular leukemia ตัวอย่างเซลล์ไขกระดูกจะถูกส่งคัดกรองสำหรับ MRD โดยการ

Table 1. Four-color marker combinations currently used in our laboratory for MRD studies in B-lineage ALL

FITC	PE	PerCP	APC
TdT	CD10	CD34	CD19
CD38	CD10	CD34	CD19
CD45	CD10	CD34	CD19
CD58	CD10	CD34	CD19
CD66C	CD10	CD34	CD19
CD22	CD10	CD34	CD19
CD56	CD10	CD34	CD19
CD33	CD10	CD34	CD19
CD21	CD10	CD34	CD19
TdT	CyIg	CD34	CD19

ศึกษาที่ใช้ 4-color FCM ที่ประกอบไปด้วย antibody ใน Table 1 ในการพิสูจน์หา leukemia-associated immunophenotypes (LAIPs)

ผู้ป่วยใหม่ทุกรายได้รับการตรวจหา immunophenotype และ MRD screening ก่อนเริ่มการรักษา โดยการคัดกรองนี้ใช้ monoclonal antibodies ที่สามารถระบุ LAIPs ได้ เซลล์ไขกระดูกจะถูกระบุว่าเป็น phenotype ที่ผิดปกติสำหรับการ monitor โดย cell marking จะขึ้นกับ antigen บนเซลล์ไขกระดูกที่แสดง CD19, CD10 และ CD34 การศึกษานี้แปลผล MRD ว่ามีประสิทธิภาพถ้ามี antigen expression ดังนี้ weak expression ของ CD38 และ CD45, strong expression ของ TdT, CD53, CD21, CD56 และ CD22

ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วย 119 ราย จากทั้งหมด 139 ราย (85.6%) มี markers ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการ monitor ต่อไปข้างหน้า ≥ 1 LAIPs โดย Ab combination ที่สามารถนำไปปรับใช้ได้มากที่สุดคือ TdT/CD10/CD34/CD19 คิดเป็นร้อยละ 62.6 (Table 2)

การหา MRD ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายประกอบไปด้วย FISH, FCM และ PCR แต่ ณ ปัจจุบันไม่มีวิธีการไหนที่สามารถนำไปปรับใช้ได้ร้อยละ 100 ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะหา MRD ถ้าใช้

Table 2 The coverage rate of leukemia-associated immunophenotype (LAIP) for FCM MRD monitoring

Antibody combinations	Effective cases	Relative frequency (%)	Frequency in Chinese Journals (%)	Frequency in Foreign Journals (%)
TdT/CD10/CD34/CD19	87	62.6*	53	30-50
CD38/CD10/CD34/CD19	85	61.2*	52	30-50
CD45/CD10/CD34/CD19	58	41.7*	45	30-50
CD66c/CD10/CD34/CD19	28	20.1	31	10-20
CD58/CD10/CD34/CD19	6	4.3	32	33.3
TdT/Cy1g/CD34/CD19	3	2.0	8	10-20

* $\chi^2 = 0.023$, $p < 0.0001$; FCM, indicates flow cytometry; MRD, minimal residual disease

เพียงวิธีการเดียว การใช้วิธี FCM เพื่อหา MRD จะอ้างอิงจาก immunophenotype ของเซลล์มะเร็งซึ่งมีข้อได้เปรียบมากกว่า molecular method อยู่หลายประการ ได้แก่ ความเร็ว, high sensitivity และ high specificity และยังมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธี PCR คือสามารถจดจำและแยก immunophenotype ของ cell ที่มีขนาดเล็กและแยก nuclear material จากเซลล์ที่ตายแล้ว

วิธี FCM อาศัย antibodies ในการแจกแจง immunophenotype ที่จำเพาะของเซลล์มะเร็งซึ่งต้องแยกเซลล์มะเร็งตัวอ่อนและเซลล์ตัวอ่อนปกติออกจากกัน (CD19, CD10 lymphoid progenitors จากไขกระดูก) และต้องตระหนักว่า early pre-B ส่วนมากที่มี low expression ของ CD10 ยังไม่มี MRD screening markers ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งเหล่านี้

นี้ไม่สามารถแยกออกจากเซลล์ปกติได้เนื่องจากมี low expression ของ CD10 ถ้า expression ของ CD10 มีมากขึ้นน่าจะสามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาพบว่าการทำ MRD ด้วยวิธี FCM ไม่สามารถครอบคลุม ALL-B ได้ทั้งหมดทุกราย เหตุผลที่สำคัญคือ MRD markers ที่ไม่เพียงพอ คณะผู้ศึกษาคาดหวังว่าในอนาคตควรมุ่งเน้นการพัฒนา marker ที่ specific ต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้นเพื่อที่จะสามารถแยกออกจาก normal B-cell precursor ได้

ไศลขวัญ พานิชคุณผล
สมใจ กาญจนนาพงศ์กุล