



พัฒนาการเพาะเลี้ยง บี-ลิมโฟไซต์ เพื่อ การวินิจฉัยโครโมโซม ในผู้ป่วยมะเร็ง เม็ดโลหิตขาวเฉียบพลันลิมโฟยด์-บี Modified B Lymphocyte Culture For Cytogenetic Analysis of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia

สมพร เทียงทัศน์¹, พิมพ์ญา ปัทมสิริวัฒน์¹
ธิดารัตน์ โควสุวรรณ¹

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวเฉียบพลันลิมโฟยด์ชนิด บี (B ALL) ให้ได้เซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์โครโมโซม โดยเลือกใช้สารกระตุ้น pokeweed mitogen (PWM) และ tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกับการใช้ phytohemagglutinin (PHA) และการเลี้ยงเซลล์โดยไม่ใส่สารกระตุ้นใดเลย โดยศึกษาตัวอย่างเลือดคนปกติ 12 ราย ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย B ALL 14 ราย และตัวอย่างไขกระดูกของ ผู้ป่วย B ALL 16 ราย การเตรียมโครโมโซมทำโดยวิธีมาตรฐาน ภายหลังกระตุ้นการแบ่งเซลล์ด้วยสารกระตุ้นต่างชนิดกันดังกล่าวในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทำการวัดประสิทธิภาพของสารกระตุ้นด้วยการวัดค่า mitotic index (MI) ผลการวิจัยพบว่า TPA และ PHA สามารถกระตุ้นลิมโฟไซต์จากเลือดคนปกติให้เจริญสู่ระยะ metaphase ได้ดีใกล้เคียงกัน โดยมีค่า 14.97 และ 15.85 cells/1000 mononuclear cells ตามลำดับ ในขณะที่ PWM ให้ค่า MI ในเลือดคนปกติเฉลี่ย 5.66 cells/1000 mononuclear cells เมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นเซลล์จากเลือดผู้ป่วย B ALL 14 ราย ด้วยสาร PWM, PHA, TPA

¹ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กทม. 10700

และไม่ได้สารกระตุ้นใดเลย พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย PWM ให้ค่า MI เฉลี่ยสูงสุด คือ 2.91 cells/1000 mononuclear cells รองลงมา คือ PHA ในการศึกษาจากเซลล์ไขกระดูกจากผู้ป่วย B ALL 16 ราย พบว่า PWM ให้ค่าเฉลี่ยของ MI สูงสุดเช่นกัน

จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่ยังไม่ทราบ immunophenotype ของ ALL ว่าเป็นเซลล์ชนิด บี หรือ ที สมควรจะกระตุ้นเซลล์มะเร็งด้วย PHA และ PWM ควบคู่กันไป และเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมโครโมโซมในกรณีที่ทราบ immunophenotype ว่าเป็นเซลล์ชนิด บี ควรเลือกใช้ PWM เป็นสารกระตุ้น

คำรหัส : มะเร็งเม็ดโลหิตขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์-บี ● Pokeweed mitogen
● Phytohemagglutinin

Abstract

Modified B Lymphocyte Culture For Cytogenetic Analysis of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Somporn Teingtat¹, Pimpicha Patmasiriwat¹
Thidarat Koesuwan¹

Phytohaemagglutinin (PHA) is normally used as a mitotic stimulant in standard lymphocyte culture for cytogenetic analysis of non - malignant chromosomal disorders. PHA effectively stimulates a majority of circulating T lymphocytes while much less effective for B lymphocytes. Regardless of mixed T/B lineages leukemia, 65-70 % of acute lymphoblastic leukemias in children are of B cell types (Early B-precursor, Common ALL, Pre B ALL, Mature B ALL). Accordingly, cytogenetic culture in childhood B cell leukemia is problematic. This work was designed to improve effectiveness of the B cell leukemic culture in liquid medium used in cytogenetic laboratory. Two other mitotic stimulants, pokeweed mitogen (PWM) and tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) were used in parallel to the sets of cultures with PHA and non mitogenic baseline control. The study includes blood samples from 14 B cell ALL patients, bone marrow samples from 16 B - ALL patients and blood samples from 12 normal individuals. Effectiveness of the leukemic and normal control cultures when using different mitogens were measured in terms of mitotic index (MI). We found an equal ability of TPA and

¹ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, 10700

PHA in stimulating normal circulating lymphocytes (majority are T cells) to enter metaphase stage of mitotic division with the average MI of 14.97 and 15.85 cells/1000 mononuclear cells and respectively, whereas MI from PWM stimulation was only 5.66 cells/1000 mononuclear cells. Interestingly, PWM stimulation showed the highest MI (2.91 cells/1000 mononuclear cells) followed by PHA (1.84 cells/1000 mononuclear cells), TPA (1.27 cells/1000 mononuclear cells) and non stimulant (0.79 cells/1000 mononuclear cells) in the cultivation of peripheral blood cells from 14 B cell ALL patients. Similar results were observed in 16 bone marrow samples of the same disease, with the highest MI in PWM stimulation (4.70 cells/1000 mononuclear cells) followed by PHA (2.46 cells/1000 mononuclear cells), TPA (2.04 cells/1000 mononuclear cells) and non stimulant (1.68 cells/1000 mononuclear cells) respectively. This result implies that PWM should be the most suitable mitotic stimulation for B cell leukemic culture.

Key Words: B - ALL ● Pokeweed mitogen ● Phytohemagglutinin

บทนำ

มะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) เป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในเด็ก ในอดีตเด็กที่ป่วยเป็นโรคนี้อาจเสียชีวิต ภายในเวลาเพียง 3-6 เดือน แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาการรักษา มะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลันในเด็กเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด acute lymphoblastic leukemia ผู้ป่วยจะมีโอกาสรอดชีวิตโดยปราศจากโรคเกิน 5 ปี ถึงร้อยละ 60-70 และส่วนใหญ่ของผู้ป่วยเหล่านี้จะหายขาด ภายหลังจากหยุดการรักษา ความสำเร็จในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลันในเด็กเป็นผลจากความก้าวหน้าของการค้นคว้าวิจัย เช่น การค้นพบยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ หรือการใช้ยาต้านมะเร็งหลายๆ ชนิดร่วมกัน การป้องกันการเกิดมะเร็งเม็ดโลหิตขาวในระบบประสาทกลาง การค้นพบปัจจัยที่บ่งชี้ถึงการพยากรณ์โรค การดัดแปลงการรักษาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละรายซึ่งมีการพยากรณ์โรคไม่เหมือนกัน เป็นต้น ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ เพื่อตรวจวิเคราะห์ทาง

ชีววิทยาของเซลล์ อิมมูโนวิทยา genetics และ molecular biology มาช่วยปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยโดยละเอียด เพื่อใช้เป็นแนวทางการรักษาโรคนี้อีกขึ้น¹ มะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดเฉียบพลันในเด็กแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ Acute lymphoblastic leukemia (ALL) ซึ่งพบได้บ่อยประมาณร้อยละ 70-75 และ Acute non-lymphoblastic leukemia พบได้ประมาณร้อยละ 25-30 ในการแยกชนิดต่างๆ ของมะเร็งเม็ดโลหิตขาวอาศัยการศึกษาลักษณะรูปร่าง และคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วย ได้แก่ cytochemistry, immunologic markers และ cytogenetics ซึ่งมีความสำคัญในการวางแผนการรักษา และการพยากรณ์โรค การวินิจฉัยจำแนก ALL โดยอาศัยรูปร่างของเซลล์ยึดถือตาม FAB morphological classification ในปี 1976² ซึ่งจำแนก ALL ออกเป็น 3 ชนิดย่อย คือ L1, L2, L3 70-85 % ของ ALL ที่พบในเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี มักเป็นชนิด L1 อีก 15-25 % เป็น L2 และ 1-3 % เป็น L3 ส่วนในผู้ใหญ่ (อายุมากกว่า 15 ปี) ที่เป็น ALL มักเป็นชนิด L2 65 % ที่เหลือเป็น L1

30-35 % และ L3 1-3 % การจำแนกชนิดย่อยของ ALL โดยอาศัยการศึกษารูปร่างลักษณะยังมีประโยชน์ในด้านการพยากรณ์โรค^{2,3} เช่น ผู้ป่วย ALL-L2 มักเข้าสู่ระยะพื้นตัวหรือ remission ได้ยากกว่า และมีอัตราการกำเริบของโรค (relapse) สูงกว่า ALL-L1 ส่วน ALL-L3 โดยทั่วไปมักมีการดำเนินโรคที่รุนแรง การพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิต monoclonal antibodies ทำให้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของมะเร็งต่างๆ รวมทั้งมะเร็งเม็ดโลหิตขาว⁴⁻⁶ โดยอาศัยความแตกต่างของ antigenic cell markers ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่ไม่เหมือนกัน ซึ่ง marker แต่ละชนิดจะทำปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะกับ monoclonal antibodies เท่านั้น โดยอาศัยหลักการทางภูมิคุ้มกันเพื่อจำแนกชนิดมะเร็งเม็ดโลหิตขาว ALL สามารถจำแนกออกเป็น ALL ชนิด early T-precursor ALL, T cell ALL, early B-precursor ALL, common - ALL, pre - B ALL และ mature B ALL เป็นต้น การศึกษาวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยเหล่านี้มีประโยชน์ทั้งด้านช่วยให้การวินิจฉัยถูกต้องแม่นยำ และช่วยการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยแต่ละราย เพราะผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของโครโมโซมบางชนิด เช่น t (4 ; 11) หรือ t (2 ; 8) จะมีการดำเนินโรครุนแรงกว่าผู้ที่ไม่มีความผิดปกติชนิดดังกล่าว^{7,8} ในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวจากเลือดและไขกระดูกของผู้ป่วย แต่ผู้ป่วยที่เป็น ALL ชนิด B cell type มักจะเพาะเลี้ยงไม่ได้ผลด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ Phytohemagglutinin (PHA) เป็นสารกระตุ้น ร้อยละของการเป็นโรค ALL ในเด็กพบชนิด B-cell type มากกว่า T-cell type ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจะต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้เมตาเฟสที่เพียงพอ สาร PHA กระตุ้น T-cell ได้ดีกว่า B-cell ดังนั้นในผู้ป่วยที่เป็น T-ALL ควรใช้ PHA เป็นสารกระตุ้น ส่วนใน B-ALL เมื่อกระตุ้นด้วย

PHA จะมีการแบ่งตัวน้อยมาก ทำให้ได้เมตาเฟสไม่เพียงพอในการวิเคราะห์โครโมโซม ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำ Pokeweed mitogen (PWM) และ Tetradececanoylphorbol-13-acetate (TPA) มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในโรค ALL โดยมีรายงานว่าทั้ง PWM และ TPA มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นได้ทั้ง T และ B ลิมโฟไซต์(9) การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยโรค Acute Lymphoblastic Leukemia ชนิด B cell type เพื่อใช้ในการเตรียมโครโมโซมในผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเลือกใช้สารกระตุ้น (Mitogen) ที่เหมาะสม

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือดคนปกติ ได้รับจากผู้บริจาคโลหิตธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราช จำนวนทั้งสิ้น 12 ราย อายุระหว่าง 20-30 ปี เป็นเพศชาย 7 ราย เพศหญิง 5 ราย

ตัวอย่างเลือดและไขกระดูกผู้ป่วย ALL เลือดและไขกระดูกของผู้ป่วย ALL ประกอบด้วยเลือด ผู้ป่วยเด็ก อายุระหว่าง 1-11 ปี จำนวน 14 ราย เป็นเพศชาย 8 ราย และเพศหญิง 6 ราย ไขกระดูกผู้ป่วยเด็กอายุระหว่าง 2-10 ปี จำนวน 16 ราย เป็นเพศชาย 8 ราย และเพศหญิง 8 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มารับการตรวจ ณ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช และได้รับการวินิจฉัยจำแนกในขั้นต้นโดยหลักการของ FAB classification และวินิจฉัยทาง Immunophenotype แล้วว่าเป็น B-cell type ได้แก่ early pre - B ALL, pre-B ALL และ mature B ALL

วิธีการศึกษา

1. การทดสอบสารกระตุ้นลิมโฟไซต์

ตัวอย่างตรวจแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้

ผู้ป่วย ALL และกลุ่มคนปกติ แต่ละกลุ่มตัวอย่าง ตรวจแบ่งเป็น 4 การทดสอบ ได้แก่ ทดสอบโดย ไม่ใช้สารกระตุ้นใดๆ ทดสอบโดยใช้ Phyto hemagglutinin (PHA), Pokeweed mitogen (PWM) และ Tetradeanoylphorbol-13-acetate (TPA) เป็นสารกระตุ้นและแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ทดสอบสำหรับคนปกติ ได้แก่ ทดสอบโดยใช้ PHA, PWM และ TPA เป็นสารกระตุ้น

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้กรรมวิธีปลอดเชื้อ โดยใช้ Heparin 1000 IU 0.1 ต่อเลือด 5 ml. เป็นสารกันเลือดแข็ง ก่อนทำการเพาะเลี้ยงจะเติม สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640 solution : Fetal bovine serum = 80:20 แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงขวดละ 10 มล.) โดยใช้สารกระตุ้นแต่ละขวดดังนี้ PHA (Final concentration 5 ไมโครกรัม/มล.), PWM (Final concentration 2.5 ไมโครกรัม/มล.), TPA (Final concentration 5 ไมโครกรัม/มล.) หลังจากนั้นหยดเลือดคนปกติลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 0.5 ml โดยให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดขาว ประมาณ 106/ml ส่วนเลือดและไขกระดูกของผู้ป่วย ALL ควรทำการปั่นล้างด้วย unsupplemented RPMI 1640 ก่อน 1 ครั้ง แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยง ต่อจากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C. ใน CO₂ incubator (5 % CO₂) เป็นเวลา 44-46 ชม. ในผู้ป่วย ALL สำหรับคนปกติใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 66-72 ชม. หลังจากได้เวลาเติม colchicine (ความเข้มข้น=10⁻⁵M) ลงไปในแต่ละขวดที่เพาะเลี้ยงของคนปกติ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม 37°C. นาน 30 นาที จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Harvesting) สำหรับตัวอย่าง ตรวจของผู้ป่วย ALL ก่อนครบเวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 2 ชม. ให้เติม Ethidium bromide solution (Final concentration 14 ไมโครกรัม/มล.) ลงในแต่ละขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปบ่ม

ในสภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชม. และก่อนครบเวลา ประมาณ 15 นาที นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละ ขวดมาเติม colcemid (Final concentration 250 ไมโครกรัม/มล.) แล้วนำไปบ่มสภาวะเดิมเป็นเวลา 10 นาที จึงเก็บเกี่ยวเซลล์ ขั้นตอนการเก็บเกี่ยว เซลล์ใช้วิธีมาตรฐาน¹⁰⁻¹² โดยสังเขปคือ นำขวด เพาะเลี้ยงถ่ายเซลล์ลงในหลอด centrifuge tube นำไปปั่น แล้วดูด supernatant ส่วนบนทิ้งไปให้ เหลือตะกอนเซลล์ นำมาเติม hypotonic KCl (0.075 M) ประมาณ 8 ml และนำไปบ่มที่ 37°C. เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย Carnoy Fixative (Methanol : Glacial acetic acid 3:1) 4-5 ครั้ง ครั้งสุดท้ายปรับความเข้มข้นของเซลล์ ให้พอเหมาะก่อนหยดลงบนสไลด์และย้อมสี จากนั้นนำมาทำการนับ

3. การวิเคราะห์ผล

นำสไลด์ที่ย้อมแล้วมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วย Objective 100 x โดยนับจำนวน เมตาเฟสที่พบต่อ mononuclear cell 1000 เซลล์ ซึ่งจำนวน mononuclear cell ที่มีการแบ่งตัวใน ระยะเมตาเฟสต่อ 100 mononuclear cells ในการวิจัยนี้จะหมายถึง Mitotic index (MI)

ผลการศึกษา

จากการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของสาร กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใน 3 กลุ่มทดสอบ คือ PHA, PWM และ TPA ในคนปกติ 12 รายพบว่า Mitotic index (MI) ในตัวอย่างเลือดจากคนปกติที่เพาะ เลี้ยงด้วยสารกระตุ้น PHA มีค่าเฉลี่ยสูงสุด คือ 15.85 cells/1000 mononuclear cells รองลงมา ได้แก่ TPA และ PWM ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 14.97 และ 5.66 cells/1000 mononuclear cells ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธีทางสถิติโดย ใช้ Mann Whitney U test พบความแตกต่าง ของค่า MI อย่างชัดเจนเมื่อใช้ PHA เปรียบเทียบกับ PWM (p<0.0001) และ TPA เปรียบเทียบกับ PWM

($p < 0.0001$) ดังนั้นจะเห็นว่าในคนปกติ PHA และ TPA ประสิทธิภาพในการกระตุ้นลิมโฟไซต์ได้ดีกว่า PWM สำหรับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่เป็น B lineage ALL ชนิดต่างๆ 14 ราย ใน 4 กลุ่มทดสอบ ได้แก่ PHA, PWM, TPA และไม่ได้สารกระตุ้นใด พบว่าการกระตุ้นเซลล์ด้วย PWM ให้ค่า MI เฉลี่ยสูงสุด (2.91 cells/1000 mononuclear cells) รองลงมาคือ กระตุ้นด้วย PHA (1.84 cells/1000 mononuclear cells), TPA (1.27 cells/1000 mononuclear cells) และไม่ได้สารกระตุ้นใดเลย (0.79 cells/1000 mononuclear cells) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อศึกษาการกระตุ้นเซลล์จากไขกระดูกของผู้ป่วย B-ALL 16 ราย พบว่า PWM ให้ค่า MI เฉลี่ยสูงสุดเช่นกัน โดยมีค่า MI เฉลี่ย 4.70 cells/1000 mononuclear cells รองลงมาได้แก่ PHA, TPA และไม่ได้สารกระตุ้นใดเลย (2.46, 2.64, 1.68 cells/1000 mononuclear cells) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง B-ALL ชนิดต่างๆ โดยใช้สารกระตุ้นที่แตกต่างกัน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 (การเพาะเลี้ยงจากเลือด) และตารางที่ 5 (การเพาะเลี้ยงจากไขกระดูก) ในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดผู้ป่วย B-ALL โดยการกระตุ้นด้วย PWM จะให้ค่า MI สูงสุด และ MI ที่ได้จากกลุ่ม PWM มีค่าสูงกว่า MI จากกลุ่มที่กระตุ้นโดย TPA และกลุ่มที่ไม่ได้ใส่ mitogen อย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า p เท่ากับ 0.024 และ 0.002 ตามลำดับ ส่วนการเปรียบเทียบ MI ระหว่างกลุ่ม PWM กับ PHA ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดของผู้ป่วย B-ALL ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถึงแม้จะสังเกตได้ว่าค่า MI ในกลุ่ม PWM ก่อนข้างสูงกว่าในกลุ่ม PHA ก็ตาม

การวิเคราะห์ค่า MI จากการเพาะเลี้ยงไขกระดูกของผู้ป่วย B-ALL ด้วยสารกระตุ้นต่างๆ ดังกล่าว ในตารางที่ 5 พบว่าได้ผลสอดคล้องกับ

การทดลองในเลือด คือการเลี้ยงเซลล์โดยกระตุ้นด้วย PWM ให้ค่า MI สูงสุด คือสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย PHA, TPA และกลุ่มที่ไม่ได้ใส่สารกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยค่า p value เท่ากับ 0.028, 0.007 และ 0.002 ตามลำดับ โดยสรุปจะเห็นว่า การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์โดย PWM เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตชนิด B-ALL เพื่อให้ได้ metaphase อย่างเพียงพอในการวิเคราะห์โครโมโซม

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ 3 ชนิดคือ PHA, PWM และ TPA ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ในโรคมะเร็งเม็ดโลหิตเฉียบพลัน ALL และในคนปกติ เพื่อประโยชน์ในการเลือกใช้สารกระตุ้นที่เหมาะสมกับโรค ALL ซึ่งจะทำได้จำนวนเมตาเฟสมากพอสำหรับการวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วย ALL ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยง B cell leukemia จะมีปัญหาในการเพาะเลี้ยงมากกว่า T cell leukemia จากการศึกษาศามารถในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์จากเลือดผู้ป่วย ALL 14 ราย ไขกระดูกผู้ป่วย ALL 16 ราย เทียบกับคนปกติ 12 ราย ด้วยสารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด คือ PHA, PWM, TPA และไม่ได้สารกระตุ้นใดเลย (สำหรับผู้ป่วย ALL) ผู้วิจัยพบว่า PHA และ TPA เป็นสารกระตุ้นที่ดีสำหรับคนปกติ ส่วนในผู้ป่วย B-cell ALL คณะผู้วิจัยพบว่า PWM เป็นสารกระตุ้นที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเปรียบเทียบ PHA และ TPA ทั้งในตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดและไขกระดูก จะเห็นว่า PHA สามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ให้อยู่ในระยะเมตาเฟสได้จำนวนมากในคนปกติ สาเหตุเนื่องจาก PHA มีคุณสมบัติในการกระตุ้น T cell มากกว่า B cell ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นจริงที่ลิมโฟไซต์ในเลือดคนปกติเป็นชนิด T cell มากกว่า

B cell (ตารางที่ 6) การกระตุ้นด้วย PHA จึงให้ประสิทธิภาพดีกว่า ในทางตรงข้ามเมื่อใช้ PHA เป็นสารกระตุ้นในผู้ป่วย B - ALL พบว่าไม่ได้ผลดีเท่ากับเมื่อกระตุ้นด้วย PWM ทั้งนี้เนื่องจาก PWM มีคุณสมบัติกระตุ้น B - lymphocyte ได้ดีกว่า T - lymphocyte⁹ ส่วนกรณีที่ไม่ใช้สารกระตุ้นใดเลยยังสามารถพบเซลล์ในระยะเมตาเฟสได้ก็เนื่องจากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยบางรายสามารถแบ่งตัวได้โดยอัตโนมัติในขวดเพาะเลี้ยงโดยไม่ต้องการสารกระตุ้นเพิ่มเติม แต่จะพบกรณีเช่นนี้น้อยกว่ากรณีที่เซลล์ต้องการสารกระตุ้น

งานวิจัยนี้เป็นแนวทางในการเลือกใช้สารกระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะเมตาเฟสให้ได้มากที่สุด สำหรับการวินิจฉัยโครโมโซมในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดโลหิตเฉียบพลัน (ALL) ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น ผู้วิจัยเสนอความเห็นว่าการเลือกใช้สารกระตุ้น ควรพิจารณาจาก immunophenotype ของ ALL ด้วย หากกรณี

ที่ไม่ทราบ immunophenotype ของ ALL ว่าเป็นชนิด B หรือ T ALL ควรใช้ PHA และ PWM เป็นสารกระตุ้นควบคู่กันในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมโครโมโซมเสมอ กรณีที่ทราบว่าเป็น T cell type ควรเลือกใช้ PHA เป็นสารกระตุ้น ในทำนองเดียวกันหากทราบว่าเป็น B cell type ควรเลือกใช้ PWM เป็นสารกระตุ้น เพราะส่วนใหญ่ให้ผลดีกว่า ทั้งในเลือดและไขกระดูก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2540 ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงกวิวัฒน์ วิรุณ และคุณยอดสวัสดิ์ เทพธารานนท์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการคัดเลือกผู้ป่วยมะเร็งเม็ดโลหิตขาวเฉียบพลัน เพื่อศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 1 แสดงค่า Mitotic index ในตัวอย่างเลือดจากคนปกติที่เพาะเลี้ยงด้วยสารกระตุ้นต่างๆ กัน (12 ราย)

Mitogen	Mitotic index ^a Mean MI $\pm$ SEM ^b
1. Phytohemagglutinine (PHA)	15.85 $\pm$ 1.57
2. Pokeweed mitogen (PWM)	5.66 $\pm$ 0.90
3. Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)	14.97 $\pm$ 0.19

a : จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส ต่อการนับ mononuclear cell (MNC) ทั้งหมด 1000 เซลล์

b : SEM (standard error of the mean) = $S.D / \sqrt{n}$ (นิยมใช้วิเคราะห์กับการทดลองที่ตัวอย่างตรวจมาจากผู้ป่วยจริง ซึ่งมีค่าของ standard deviation สูง เนื่องจากมีปัจจัยต่างๆ เกี่ยวข้องมาก และไม่อยู่ในวิสัยที่ควบคุมได้)

ตารางที่ 2 แสดงค่า Mitotic index ในตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดในผู้ป่วย B cell - ALL ชนิดต่างๆ
ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารกระตุ้นต่างกัน

No	ALL-type	Mitotic index (per 1000 MNC)			
		PHA	PWM	TPA	non stimulated
1	early pre - B ALL	1	5	3	2
2	early pre - B ALL	0	1	0	0
3	early pre - B ALL	7	7	4	2
4	early pre - B ALL	7	6	2	1
5	early pre - B ALL	2	5	1	1
6	early pre - B ALL	1	2	0	0
7	early pre - B ALL	2	3	2	0
8	pre - B ALL	1	3	1	0
9	pre - B ALL	0.9	3.1	1.9	1.8
10	pre - B ALL	1.1	1.1	1.5	0.6
11	pre - B ALL	0.4	0.4	0.2	0
12	pre - B ALL	0.4	0.8	0	0.4
13	B - cell ALL	1	3	1	2
14	B - cell ALL	0.9	0.4	0.3	0.3
Mean (MI) $\pm$ SEM		1.84 $\pm$ 0.60	2.91 $\pm$ 0.57	1.27 $\pm$ 0.32	0.79 $\pm$ 0.22

MNC : mononuclear cells

ตารางที่ 3 แสดงค่า Mitotic index ในตัวอย่างไขกระดูกในผู้ป่วย B cell - ALL ชนิดต่างๆ
ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารกระตุ้นต่างกัน

No	ALL-type	Mitotic index (per 1000 MNC)			
		PHA	PWM	TPA	non stimulated
1	early pre-B ALL	2	12	4	4
2	early pre-B ALL	4	5	1	1
3	early pre-B ALL	5	6	3	1
4	early pre-B ALL	1	3	2	2
5	early pre-B ALL	3	4	1	0
6	early pre-B ALL	1	1	1	0
7	early pre-B ALL	0	1	1	1
8	early pre-B ALL	5	6	1	1
9	early pre-B ALL	1	3	1	0
10	early pre-B ALL	1	3	4	2
11	early pre-B ALL	1	2	2	2
12	pre - B ALL	6	7	4	6
13	pre - B ALL	6	13	5	5
14	pre - B ALL	1	2	0	0
15	pre - B ALL	1	2	1	0
16	B - cell ALL	1.4	5.2	1.6	1.9
Mean (MI) $\pm$ SEM		2.46 $\pm$ 0.54	4.70 $\pm$ 0.80	2.04 $\pm$ 0.37	1.68 $\pm$ 0.47

MNC : mononuclear cells

ตารางที่ 4 แสดงความแตกต่างทางสถิติของค่า MI ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดของผู้ป่วย B-ALL ด้วยสาร mitogens ได้แก่ PWM, PHA, TPA และ non-stimulant

Group of mitogen	p-value		
	Non-stimulant	PHA	TPA
PWM	0.002 ^a	0.121 ^b	0.024 ^a
PHA	0.130 ^b	ND	ND
TPA	0.326 ^b	0.728 ^b	ND

a : Significant difference ($p < 0.05$)

b : Not significant difference

ND : Not done

ตารางที่ 5 แสดงค่าความแตกต่างทางสถิติของค่า MI ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูกของผู้ป่วย B-ALL ด้วยสาร mitogens ได้แก่ PWM, PHA, TPA และ non-stimulant

Group of mitogen	p-value		
	Non-stimulant	PHA	TPA
PWM	0.002 ^a	0.028 ^a	0.007 ^a
PHA	0.238 ^b	-	-
TPA	0.363 ^b	0.693 ^b	-

a : Significant difference ($p < 0.05$)

b : Not significant difference

- แปลว่า ND ให้ใช้ ND = Not done

ตารางที่ 6 การกระจายของ T และ B ลิมโฟไซต์ อวัยวะต่างๆ ของคน⁹

Organ	% lymphocyte	
	T - cell	B - cell
Peripheral blood	55-75	15-30
Bone marrow	7	> 75
Lymph. Node	75	25
Spleen	50	50
Thymus	> 99	< 0.5

เอกสารอ้างอิง

1. วินัย สุวดี. ความก้าวหน้าในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก. สารศิริราช 2522 ; 31 : 584-594 และ 755-82.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposal for the classification of acute leukemias. (FAB cooperative group) Br J Hematol 1976 ; 33 : 451-8.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia : concordance among observers and clinical correlations. Br J Hematol 1981 ; 47 : 553-61.
4. First MIC cooperative study group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias cancer Gent Cytogenet 1986 ; 23 : 189-97.
5. Parcira A, Pombo de aliveira M5, Matutes. E. et al. Terminal deoxynucleotidyl transferrase positive acute myeloid leukemia : as association with immature myeloblastic leukemia. Br J Hematol 1988 ; 69 : 219-24.
6. Diamond BA, Yelton DE and Scharff MD. Monoclonal antibodies. N. Engl J Med 1981 ; 304 : 1344-9.
7. Arthur DC, Bloomfield CD, Lindquist LL and Nesbit ME. Translocation 4 ; 11 in acute lymphoblastic leukemia : clinical characteristics and prognostic significances. Blood 1982 ; 59 : 96-9.
8. Bloomfield CD, Coldman AI, Alimena, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk with acute lymphoblastic leukemia. Blood ; 69 : 415-20.

9. Jan Klein. Immunology. Great Britain: The Alden Press ; 1990 ; 30-31, 34, 289-91.
10. Billie RB, Fromcis TF : Basic laboratory techniques in cell culture, U.S. department of health and human services, 1981 ; 123-24.
11. Rooney DE, Ozepnlkowaki BH. Human cytogenetics, volume I, constitutional analysis, a practical approach 1992 ; 30-40.
12. บังอร ดัณฑ์เกยูร, ทศนีย์ เลื่อนาค และ กนกนาค ชูปัญญา. ปฏิบัติการ Cytogenetics ในทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : คณะเทคนิคการแพทย์, 2527 ; 17-20.



PROMED CO.,LTD.



The Vitros DT System is a compact clinical chemistry analyzer designed for fast, accurate, on-site tests with proven performance and reliability.

VITROS Systems
Chemistry



**THE WORLDWIDE SOURCE OF
HLA DIAGNOSTIC PRODUCTS**

Pel-Freez[®]
CLINICAL SYSTEMS



*Discovering New Worlds
of Typing Technologies*

บริษัท โปรเมด จำกัด

32/3 อาคารยูบี ซ.จันทิมา 11 ถ.ลาดพร้าว 80
แขวง/เขต วังทองหลาง กรุงเทพฯ
โทร.932-7933-4 แฟกซ์ 539-5951