

ความชุกของการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ในเด็กไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันชนิด B - lineage ด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์อินไซโตไฮบริไดเซชัน

กันยารัตน์ แคนตะ¹, สุระเดช ทองสีทอง², สุนทรี อภิบาล¹, สามารถ ภคกษมา²,
บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค¹, สะการะ หัสภาค^{3*}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้นำเอาเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินไซโตไฮบริไดเซชัน มาใช้ในการตรวจหายีนลูกผสมชนิด TEL/AML1 (translocation ets leukemia/ acute myeloid leukemia 1) ในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันชนิด B-lineage โดยศึกษาจากตัวอย่างไขกระดูกจำนวน 31 ราย พบว่า 10 ราย (ร้อยละ 32.3) เกิดยีนลูกผสมระหว่างยีน TEL กับ ยีน AML1 นอกจากนี้พบการเกิดยีนลูกผสมร่วมกับการเพิ่มจำนวนของยีน AML1 จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 6.4) ส่วนการเกิดยีนลูกผสมร่วมกับการขาดหายไปของยีน TEL พบถึง 5 ราย (ร้อยละ 16.1) และยังพบการขาดหายไปของยีน TEL ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของยีน AML1 โดยไม่พบการเกิดยีนลูกผสมอีก 1 ราย (ร้อยละ 3.2) เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินไซโตไฮบริไดเซชันซึ่งสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากและพบความผิดปกติได้หลายแบบ จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์มากในการวินิจฉัย รักษา และติดตามผลการรักษาได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: ฟลูออเรสเซนซ์อินไซโตไฮบริไดเซชัน, มะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันชนิด B-lineage, ยีนลูกผสม TEL/AML1, ผู้ป่วยเด็ก

¹ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก และ ²ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

³ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

* ผู้รับผิดชอบบทความ



Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Thai children with B-cell precursor ALL using FISH technique

Kanyarat Kanta ¹, Suradej Hongeng ², Suntaree Apibal ¹, Samart Pakakasama ²,
Budsaba Rerkamnuaychoke ¹, Sakara Hutspardol ^{3*}

Abstract

The prevalence of TEL/AML1 fusion (translocation ets leukemia/ acute myeloid leukemia 1) in Thai children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL), fluorescence in situ hybridization (FISH) was determined in 31 patients. TEL/AML1 translocation was detected in 10 patients (32.3 %). Other co-existing aberrations with TEL/AML1 were found including multiple copies of AML1 gene in 2 patients (6.4 %), TEL gene deletion in 5 patients (16.1 %). TEL gene deletion was observed in association with extra copies of AML1 in 1 case (3.2 %). DNA probe specific FISH revealed as a high-performance tool to exhibit TEL/AML1 fusion in B-cell precursor childhood ALL patients. With high incidence of TEL/AML1 fusion translocation detected by FISH in this study, further areas of chromosome alterations may be revealed using FISH technique. This should be beneficial in diagnostics and planning of treatment for the ALL patients.

Keywords: FISH, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, TEL/AML1 fusion translocation, child patients

¹Department of Clinical Pathology and ²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University

³Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University

* Corresponding author (email: sakara4695@yahoo.com)

บทนำ

มะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดในเด็ก ในสหรัฐอเมริกาพบอุบัติการณ์ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก ประมาณร้อยละ 30 ในเด็กช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 15 ปี มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่สำคัญแบ่งออกได้เป็นแบบเฉียบพลัน (acute leukemia) และแบบเรื้อรัง (chronic leukemia) ชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด คือ acute lymphoblastic leukemia (ALL) ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 75 และพบบ่อยที่สุดในช่วงอายุ ระหว่าง 2-5 ปี⁽¹⁻³⁾ สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวมักเกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรม ทำให้เซลล์เม็ดเลือด ขาดการ differentiation และ maturation ได้เหมือน เซลล์ปกติ เซลล์ที่ผิดปกติเหล่านี้จะแบ่งตัวได้อย่างไม่จำกัด และเข้าไปแทนที่เซลล์ปกติชนิดอื่นในไขกระดูก ปัจจุบันพบว่า ประมาณร้อยละ 75 ของเด็กที่เป็น ALL มีความผิดปกติของ ยีนหรือโครโมโซม โดยร้อยละ 20-25 พบเป็น translocation ชนิด t (12;21) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเป็น ALL ชนิด B-lineage⁽⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยเด็กที่มี t(12;21) มีการพยากรณ์ โรคที่ดี⁽⁶⁾ แต่ยังมีผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งที่เสียชีวิตจากโรคนี้นี้ ดังนั้นการรักษาให้ได้ผลสัมฤทธิ์จึงต้องประกอบไปด้วยปัจจัย หลายประการ เช่น การวินิจฉัยโรคให้ได้อย่างถูกต้องและความสามารถในการแยกชนิดย่อยของความผิดปกติทาง พันธุกรรม เพื่อเลือกใช้วิธีการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วย แต่ละกลุ่ม ตลอดจนการพัฒนาวิธีตรวจหาเซลล์มะเร็งจำนวน น้อยที่ปะปนอยู่ในกลุ่มเซลล์ปกติ เพื่อทำการรักษาก่อนที่จะ เกิดโรคกลับหรือ relapse^(4, 7)

การตรวจหาความผิดปกติของยีนหรือโครโมโซมใน ALL สามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิคทางด้าน cytogenetic, Southern blot hybridization⁽⁸⁾, Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)⁽⁹⁾ และเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินไซตูลิเซชัน (Fluorescence in situ hybridization, FISH)⁽¹⁰⁾ ในส่วนของยีน ลูกผสม t(12;21) เป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันระหว่างยีน TEL บริเวณโครโมโซมที่ 12 ตำแหน่ง p13 กับยีน AML1 บริเวณโครโมโซม 21 ตำแหน่ง q22 ยีนลูกผสมชนิดนี้ไม่สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคทาง cytogenetic^(11, 12) ดังนั้นจึง

ต้องอาศัยเทคนิคอื่นช่วย FISH เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวกและ รวดเร็ว เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนของเลี้ยงเซลล์หรือขั้นตอน ในการเตรียม DNA หรือ Ribonucleic acid (RNA) ข้อมูล ที่ได้จึงมีความถูกต้องน่าเชื่อถือเนื่องจากลดความผิดพลาดใน ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้ออกไป⁽¹³⁾ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาใน ครั้งนี้คาดว่าจะจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในการนำ FISH ไปใช้ ในการวินิจฉัย การพยากรณ์โรคและติดตามการรักษาได้เป็น อย่างดี

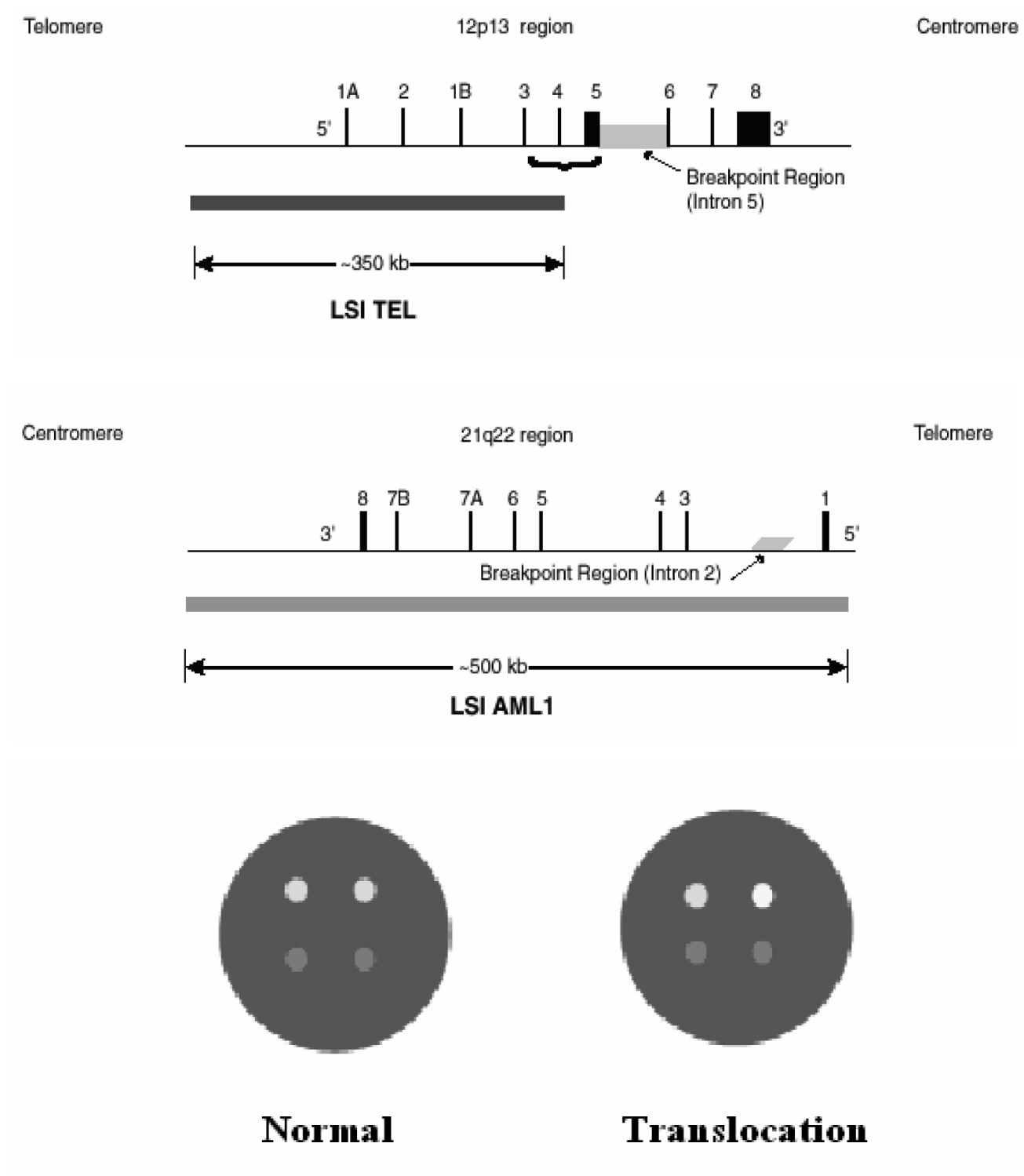
วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นไขกระดูกจากผู้ป่วยเด็ก มะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลัน ชนิด B-lineage จำนวน 31 ราย ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย แสดงไว้ใน ตารางที่ 1 ประกอบไปด้วย อายุ เพศ และชนิดของ immunophenotype การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรม การวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

DNA Probe

การศึกษานี้ได้ใช้ DNA probe ที่มีความจำเพาะ ต่อ ยีน TEL/ AML1 (VYSIS, USA) ประกอบด้วยการติด ฉลากสีส้ม (O: orange) ที่ยีน AML1 ขนาด 500 kb และ ติดฉลากสีเขียว (G: green) ที่ยีน TEL ขนาด 350 kb รูปแบบของสัญญาณในเซลล์ของคนปกติจะเห็นสัญญาณเป็น 2O2G นั้นหมายถึง ส่วนที่ติดฉลากสีส้มบนโครโมโซม 21 มี 2 สัญญาณ (2O) และที่ติดฉลากสีเขียวบนโครโมโซม 12 อีก 2 สัญญาณ (2G) ในส่วนของผู้ป่วยที่เกิดการแลกเปลี่ยน ยีนระหว่างโครโมโซมที่ 12 และ 21 จะเกิดยีนลูกผสมของ ทั้งสองยีนขึ้น ให้สีเหลือง (F: fusion ให้สีเหลืองเกิดจากการ เหลื่อมล้ำกันระหว่างสีเขียวกับสีส้ม) เกิดรูปแบบสัญญาณที่ จำเพาะเป็น 2O1G1F ในส่วน 2O นั้นเกิดจาก ยีน AML1 ปกติ 1 สัญญาณ และที่เหลืออีก 1 สัญญาณเกิดจากส่วนที่ เหลือจากการเกิดยีนลูกผสม ส่วน 1G คือยีน TEL ปกติ และ ในส่วนของ 1F คือ ส่วนที่เกิดยีนลูกผสมระหว่างยีน TEL และ AML1 รายละเอียดแสดงไว้ดัง รูปที่ 1



รูปที่ 1 รายละเอียดของยีน ตำแหน่งของ probe ที่ติดฉลาก และวิธีการอ่านผล

การควบคุมคุณภาพ

ทำการตรวจหารูปแบบที่จำเพาะของการเกิดยีนลูกผสมในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีและไม่เคยมีประวัติการเจ็บป่วยเกี่ยวกับโรคทางโลหิตวิทยามาเป็นเวลาอย่างน้อย 5 ปี เป็นจำนวน 5 ราย คำนวณออกมาเป็นค่า cut off ซึ่งค่า cut off ที่แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะพบรูปแบบของความผิดปกติที่จำเพาะกับการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ในคนปกติ ซึ่งเงื่อนไขในการวินิจฉัยดังกล่าวอ้างอิงตามมาตรฐานของ American College of Medical Genetics (ACMG) ⁽¹⁴⁾ ดังนั้นหากพบว่าผู้ป่วยรายใดที่พบความผิดปกติมากกว่าค่า cut off จะถือว่าผู้ป่วยรายนั้นมียีนลูกผสมที่กำลังศึกษา และนอกจากนี้หากพบว่ามีความผิดปกติของสียหายไปหรือเพิ่มขึ้นมากก็บ่งบอกถึงการขาดหายไปหรือเพิ่มจำนวนขึ้นของยีนนั้นๆ ซึ่งการรายงานผลดังกล่าวอ้างอิงตามการศึกษาของ Wolff และคณะ ⁽¹⁵⁾

วิธีการศึกษา ⁽¹⁵⁾

1. การเตรียมเซลล์

นำตัวอย่างไขกระดูกมาปั่นแยกเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวออก โดยใช้ความเร็วรอบ 1,300 rpm เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำส่วนของ buffy coat มาล้างด้วย 10 ml phosphate buffered saline 1 ครั้ง และทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกด้วย 7 ml ของ 0.56 % KCl ซึ่งเป็นสาร hypotonic solution จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 5 ml ของ fixative (methanol : acetic acid, 3:1) ปั่นที่ความเร็ว 1,300 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้งและเก็บเซลล์ไว้ใน fixative ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปย้อมเซลล์

2. การตรึงเซลล์

นำเซลล์ที่เก็บไว้ใน fixative ออกมาล้างด้วย fixative อีก 1 ครั้ง แล้วหยดลงบนสไลด์ ตากไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท

3. การเตรียมสไลด์ก่อนย้อม

นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาจุ่มใน 2X SSC (saline-sodium citrate buffer) ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที 1 ครั้ง จากนั้นเติม RNase ลงในสไลด์และอุ่นไว้ที่ 37 °C (ใส่ใน moisture box และอุ่นไว้ใน hot air oven) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาจุ่มใน 2X SSC ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นย้ายมาใส่ในสารละลาย pepsin ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายออกมาแช่ใน phosphate buffered saline 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย 1 %

formaldehyde fixation อีก 12 นาที แล้วตามด้วย phosphate buffered saline 5 นาที จากนั้นล้างน้ำออกด้วย 70 %, 85 % และ 100 % ethanol อย่างละ 3 นาที ตามลำดับ ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4. DNA probe และการทำ hybridization

ใช้ probe 1 µl, น้ำกลั่น 2 µl และ hybridization buffer 7 µl ผสมให้เข้ากัน และนำไปอุ่นที่ 73 °C เป็นเวลา 5 นาที นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาทำการแยกสาย DNA (denaturation) ที่ 73 °C ด้วย denaturizing solution (70 % formamide / 2X SSC) จากนั้นล้างน้ำออกด้วย 70 %, 85 % และ 100 % ethanol ที่แช่ไว้ -20 °C อย่างละ 3 นาที แล้วตากสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนแห้งแล้วนำ probe ที่เตรียมไว้มาหยดลงบนสไลด์ จากนั้นปิด cover slip แล้ว seal ด้วย rubber cement แล้วนำสไลด์ไปเข้าเครื่อง thermobrite (Vysis, USA) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนใช้เวลาประมาณ 16-24 ชั่วโมง วิธีการทำทั้งหมดอ้างอิงตามเอกสารแจกแจงรายละเอียดขั้นตอนและวิธีการตรวจ Dual color probe FISH ของบริษัท Vysis (USA) และ Dako (Denmark)

5. การตรวจหาสัญญาณ (ทุกขั้นตอนทำในที่มืด)

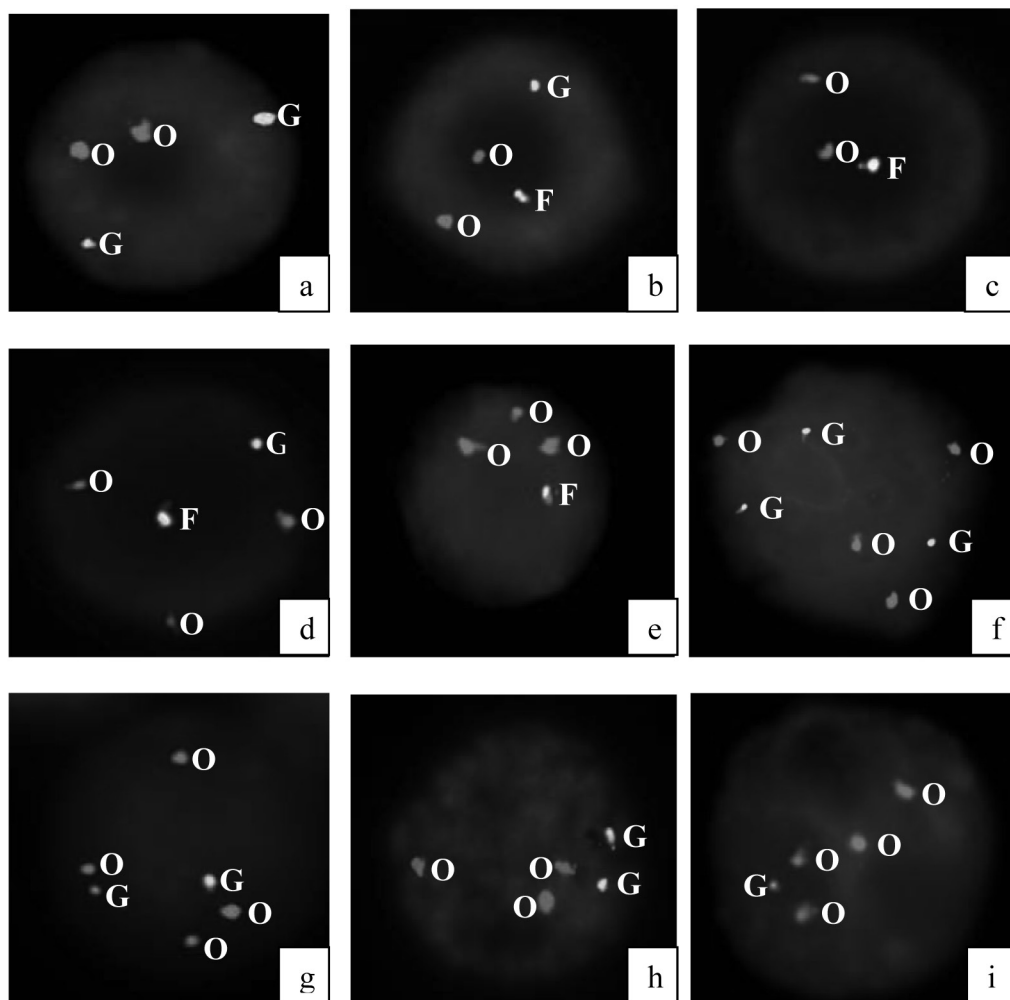
หลังจากอุ่นไว้ข้ามคืน จากนั้นนำสไลด์มาล้างด้วย 0.4 X SSC / 0.3 % NP-40 (nonidet P-40) ที่ 73 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย 2 X SSC / 0.1 % NP-40 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างน้ำออกด้วย 70 %, 85 % และ 100 % ethanol อย่างละ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ แล้วย้อมเซลล์ด้วยสี DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) และ mount สไลด์ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บ ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์เพื่อดูสัญญาณ (Olympus optical Co.,Ltd, Tokyo, Japan)

ผลการศึกษา

ค่า cut-off จากอาสาสมัคร หาได้จากการย้อมเซลล์ด้วย probe ที่เลือกมา แล้วนับจำนวนเซลล์ 200 เซลล์ต่อ 1 ตัวอย่างเพื่อหาผลบวกกลาง และคำนวณ ค่า cut-off ออกมาเป็นร้อยละโดยใช้ค่า 3 X SD ในที่นี้ได้เท่ากับ ร้อยละ 2.5 ผลจากการย้อมของผู้ป่วยจำนวน 31 ราย และร้อยละของเซลล์ที่พบสัญญาณในแบบต่างๆ แสดงไว้ใน ตารางที่ 1 ตรวจพบความผิดปกติจากการย้อม 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 58.1 โดยพบว่ามี 10 ราย (ร้อยละ 32.3) เกิดยีนลูกผสมระหว่าง

ยีน TEL กับ ยีน AML1 โดยแยกเป็นการเกิดยีนลูกผสม แต่เพียงอย่างเดียว 4 ราย (ร้อยละ 12.9) ที่เหลือเกิดยีนลูกผสมร่วมกับการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของยีน ได้แก่ เกิดยีนลูกผสมร่วมกับการเพิ่มจำนวนของ AML1 ยีน 2 ราย (ร้อยละ 6.4) เกิดยีนลูกผสมร่วมกับการขาดหายไปของยีน TEL 5 ราย (ร้อยละ 16.1) ดังที่ได้แจกแจงไว้ใน ตารางที่ 2 การเพิ่มจำนวนยีนโดยไม่พบการเกิดยีนลูกผสมพบทั้งสิ้น

8 ราย (ร้อยละ 25.8) และในจำนวนนี้พบการเพิ่มขึ้นส่วนยีน AML1 ร่วมกับการขาดหายไปของ TEL gene 1 ราย (ร้อยละ 3.2) ส่วนการขาดหายไปของยีน TEL อย่างเดียวพบเพียง 1 รายเท่านั้น (ร้อยละ 3.2) รูปแบบของสัญญาณและจำนวนร้อยละของความผิดปกติที่พบ แสดงไว้ใน รูปที่ 2 และ ตารางที่ 2



รูปที่ 2 การเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ที่ตรวจพบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินไซโตไฮบริไดเซชัน

- a: Interphase cell ที่ปกติซึ่งมีสัญญาณ 2O (AML1) และ 2G (TEL)
- b: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 2O1G1F ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของยีนลูกผสม TEL/AML1
- c: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 2O1F แสดงให้เห็นการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ร่วมกับการขาดหายไปของยีน TEL
- d: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 3O1G1F แสดงให้เห็นการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของยีน AML1
- e: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 3O1F แสดงให้เห็นการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ร่วมกับการขาดหายไปของยีน TEL
- f: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 4O3G แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นยีน AML1 จำนวน 3 ยีน
- g: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 4O2G แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นยีน AML1 จำนวน 4 ยีน
- h: f: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 3O2G แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นยีน AML1 จำนวน 2 ยีน
- i: Interphase cell ที่พบสัญญาณ 4O1G แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นยีน AML1 จำนวน 4 ยีนและการขาดหายไปของยีน TEL

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางคลินิกและผลจากการย้อมด้วยเทคนิค FISH ในผู้ป่วยทั้ง 31 ราย

Case	Sex/Age (yr.)	Cell lineage	Results of signal patterns (%)
1	M/10	Early precursor B ALL	4O2G (98)
2	F/11	Precursor B ALL (relapse)	3O2G (15)
3	M/11	B ALL (L3)	2O2G (100)
4	F/3	Precursor B ALL	2O2G (100)
5	F/2	Early precursor B ALL	2O1G1F (16)* 2O1F (60)*
6	F/9	Early precursor B ALL (relapse)	2O2G (100)
7	M/1	Early precursor B ALL	4O3G (72)
8	M/7	Precursor B ALL (relapse)	4O1G (41)
9	M/5	Early precursor B ALL (relapse)	2O2G (100)
10	M/2	Precursor B ALL	3O2G (81)
11	M/4	Early precursor B ALL	4O2G (96)
12	M/2	Precursor B ALL	2O1G1F (5)* 2O1F (25)*
13	M/12	Early precursor B ALL	2O2G (100)
14	M/10	Early precursor B ALL	2O2G (100)
15	M/5	Early precursor B ALL	2O1F (56)*
16	M/12	Early precursor B ALL	2O2G (100)
17	M/2	Early precursor B ALL	4O2G (71)
18	F/4	B lineage ALL	2O2G (100)
19	M/4	Early precursor B ALL	2O2G (100)
20	F/2	Precursor B ALL	2O2G (100)
21	M/4	Early precursor B ALL	3O1F (80)*
22	M/3	Early precursor B ALL	2O1G1F (25)* 3O1G1F (10)*
23	F/6	Early precursor B ALL	2O1G1F (57)*
24	F/4	Precursor B ALL	2O1F (84)*
25	F/7	B lineage ALL	2O2G (100)
26	F/13	Precursor B ALL	2O2G (100)
27	F/3	B lineage ALL	2O1G1F (85)*
28	F/0.1	Early precursor B ALL	2O2G (100)
29	F/5	Early precursor B ALL	2O1G1F (78)*
30	M/3	Precursor B ALL	2O1G1F (65)*
31	M/2	Early precursor B ALL	4O2G (83)

*: เป็นรูปแบบที่มีความจำเพาะในการเกิดขึ้นลูกผสม โดยเทียบกับค่า cut-off = 2.5 %

ตารางที่ 2 ความถี่และชนิดของความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ตรวจพบในผู้ป่วย 18 ราย ด้วยเทคนิค FISH

Features of abnormal signal patterns (n)	Gene rearrangement	%
2O1G1F (4)	TEL/ AML1 translocation	12.9
2O1F(4)	TEL/ AML1 translocation with TEL gene deletion	12.9
3O1G1F(1)	TEL/ AML1 translocation with multiple copies of AML1 gene	3.2
3O1F(1)	TEL/ AML1 translocation with multiple copies of AML1 gene and TEL gene deletion	3.2
4O3G(1), 3O2G (2), 4O2G(4)	Multiple copies TEL and/or AML1 gene	22.6
4O1G(1)	Multiple copies of AML1 gene with TEL gene deletion	3.2

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผู้ป่วยทั้งหมด 31 คน พบความผิดปกติทั้งหมดร้อยละ 58.1 ซึ่งเป็นความชุกที่สูงมากในผู้ป่วยเด็กไทยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-lineage ซึ่งสูงกว่าการศึกษาของ Zhang และคณะที่เคยศึกษาไว้ในคนอเมริกันซึ่งพบเพียงร้อยละ 41⁽¹³⁾ ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลุ่มผู้ป่วยที่ Zhang และคณะนำมาศึกษามีทั้งเด็กและผู้ใหญ่ อีกทั้งยังศึกษาทั้งใน B และ T-lineage อาจทำให้ความจำเพาะเจาะจงน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยเด็กที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด B-lineage เนื่องจาก TEL/AML1 translocation เป็นความผิดปกติของยีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วย⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะการเกิดยีนลูกผสมด้วยเทคนิค FISH ทั้งคู่ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ พบร้อยละ 31 ในคนอเมริกัน และ ร้อยละ 32.3 ในเด็กไทย แต่เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีผู้ทำการศึกษาและรวบรวมอุบัติการณ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษาด้วยเทคนิคนี้อย่างชัดเจน จึงนำข้อมูลนี้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาด้วยวิธีอื่นๆ ในผู้ป่วยเด็กกลุ่มอายุเดียวกันที่เป็น ALL พบว่าการศึกษาด้วยวิธี multiplex RT-PCR ของ Pakakasama และคณะ พบการเกิดยีนลูกผสม TEL/AML1 ร้อยละ 25.4⁽⁹⁾ เห็นได้ว่าค่าความชุกแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับการศึกษานี้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการศึกษาด้วยเทคนิค FISH สามารถพบ

ความผิดปกติได้มากกว่า นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของยีนที่นำมาศึกษาด้วยเทคนิค FISH ในขณะที่การทำ multiplex RT-PCR ตรวจพบเพียงการเกิดยีนลูกผสมที่มีความจำเพาะเท่านั้น เทคนิค FISH นี้ไม่มีข้อจำกัดของการเตรียม DNA หรือ RNA ทำให้ลดขั้นตอนของการเกิดความผิดพลาดออกไป ดังนั้นรายงานฉบับนี้จึงน่าจะเป็นรายงานแรกในประเทศไทย ที่นำเอาเทคนิค FISH มาศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันชนิด B-lineage ALL จากการศึกษาอื่นที่ผ่านมาพบว่า การพบยีนลูกผสม TEL/AML1 เพียงอย่างเดียวในผู้ป่วยจะมีการพยากรณ์โรคที่ดี^{(6),(16)} และยังพบอัตราการเกิดโรคกลับน้อยมากอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ซึ่งมียีนลูกผสม TEL/AML1⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้มาจากหลายโรงพยาบาลและเป็นการศึกษาที่เน้นในด้านการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบในไขกระดูกของผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาว B-lineage ALL ผู้วิจัยจึงไม่มีข้อมูลที่ครบถ้วนในด้านผลการรักษา ดังนั้นจึงไม่สามารถแสดงความเชื่อมโยงของการพบยีนลูกผสมหรือความผิดปกติทางพันธุกรรมอื่นๆต่อการพยากรณ์โรคภายในการศึกษานี้ได้ หากมีการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมในเรื่องการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดและอุบัติการณ์การเกิดโรคกลับในผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในนี้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมเบื้องต้นเพื่อศึกษาการเกิดยีนลูกผสมและการกลายพันธุ์กรรมชนิดอื่นของ TEL และ AML1 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการรักษา การติดตามการรักษาและวางแผนการรักษาในผู้ป่วยเด็กไทยในอนาคต และยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาในครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการนำเอาเทคนิค FISH มาใช้คัดกรองในผู้ป่วยเด็กมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันชนิด B-lineage ได้ผลอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถคัดเอาผู้ป่วยเด็กที่มีการกลายพันธุ์กรรมของยีนกลุ่มนี้เข้ามาได้เป็นจำนวนมาก สามารถลดข้อจำกัดของเทคนิคอื่นๆในปัจจุบัน อีกทั้งลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยโรค ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าควรนำเทคนิค FISH มาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วย B-lineage ALL

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโรงพยาบาลรามาริบัติ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลนครปฐม โรงพยาบาลสมเด็จพระปิ่นเกล้า โรงพยาบาลพระมงกุฎ โรงพยาบาลวิชัยยุทธ และโรงพยาบาลพระพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ที่เอื้อเฟื้อในการจัดเก็บตัวอย่างไขกระดูกจากผู้ป่วยเด็ก ขอขอบคุณภาควิชาการเวชศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนได้รับจากสมาคมศิษย์เก่าบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemia. *Science* 1997; 278:1059-64.
2. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1- year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 1995; 75: 2186-95.
3. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 639-49.
4. Rubnitz JE, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, et al. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance.

J Clin Oncol 1997; 15: 1150-7.

5. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86:4263-9.
6. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 88: 4252-8.
7. Rubnitz JE, Shuster JJ, Land VJ, Link MP, Pullen DJ, Camitta BM, et al. Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 1143-6.
8. Lo Coco F, Mandelli F, Breccia M, Annino L, Guglielmi C, Petti MC, et al. Southern blot analysis of ALL-1 rearrangements at chromosome 11q23 in acute leukemia. *Cancer Res* 1993; 53: 3800-3.
9. Pakakasama S, Kajanachumpol S, Kanjanapongkul S, Sirachainan N, Meekaewkunchorn A, Ningsanond V, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *Int J Lab Hematol* 2008; 30: 286-91.
10. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP, Beverloo HB, Smit EM, Vang-Nielsen K, et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 895-908.
11. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, et al. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol* 1997; 99: 101-6.
12. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes

- in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *Blood* 1997; 90:571-7.
13. Zhang L, Parkhurst JB, Kern WF, Scott KV, Niccum D, Mulvihill JJ, et al. Chromosomal changes detected by fluorescence in situ hybridization in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J* 2003; 116: 1298-303.
 14. American College of Medical Genetics (ACMG). Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2006 Edition. Clinical cytogenetics. Accessed Sept 9, 2008. Available at URL address: http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm
 15. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn* 2007; 9: 34-43.
 16. Kanerva J, Saarinen-Pihkala UM, Niini T, Riikonen P, Mottonen M, Makiperna A, et al. Favorable outcome in 20-year follow-up of children with very-low-risk ALL and minimal standard therapy, with special reference to TEL-AML1 fusion. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 42: 30-5.
 17. Zuna J, Hrusak O, Kalinova M, Muzikova K, Sary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? Czech Paediatric Haematology Working Group. *Leukemia* 1999; 13: 22-4.