

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

หรือ

การแสดงออกของโมเลกุลคล้ายคลึงเฮพาราแรน ซัลเฟต
โปรติโอไกลัยแคนของตับมนุษย์บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
ในสายมัยลอยด์

Expression of human liver heparan sulfate proteoglycans-like
molecules on myeloid leukemic cells

โดย

ผศ. ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี 2549

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
รายการตารางประกอบ	จ
รายการภาพประกอบ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วัสดุและวิธีการวิจัย	11
3. ผลการค้นคว้าวิจัย	15
4. อภิปรายผลการวิจัย	24
5. บทสรุป	25
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	27
ประวัติการศึกษาและประสบการณ์	30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวไม่ได้พบในผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น AML ทั้งนี้อาจเกิดจากมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ liver HSPG บนผิวเซลล์มะเร็งด้วย เช่น AML ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ stem cell และส่งผลให้มีการพัฒนาของเซลล์มะเร็งในลักษณะแตกต่างกัน รวมถึงการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับระยะของมะเร็ง และการวินิจฉัยของแพทย์ซึ่งอาศัยการย้อมไขกระดูก แทนการดูจากสเมียร์ของเลือด ผลการทดลองกล่าวได้ว่ามีการแสดงออกของโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อ liver HSPGs ซึ่งผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้เป็นโมเลกุลร่วมในการตรวจวินิจฉัยแยก AML นอกเหนือจากการดูกล้องซึ่งเป็นวิธีที่ต้องการผู้ตรวจสอบที่มีความชำนาญ นอกจากนี้ยังเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการพัฒนาแอนติบอดี เพื่อใช้ในการศึกษา เพื่อการจำแนก และพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นชุดน้ำยาสำหรับตรวจแยกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML ที่มีความจำเพาะ

The logo of Chiang Mai University is a circular emblem. In the center is a detailed illustration of an elephant standing and facing left. The elephant is surrounded by a circular border containing the text "CHIANG MAI UNIVERSITY 1964". On either side of the elephant, there is a decorative floral or sun-like symbol.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

ชื่อโครงการวิจัย Expression of human liver proteoglycans-like molecules on myeloid leukemic cells

ผู้ทำการวิจัย ผศ. ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) express on membrane and matrix of many cell types. HSPGs significantly involve in fundamental cell activities, act as the co-receptor of many certain molecules with heparin binding region and are related to adhesion, invasion and metastasis of cancer. Previous study showed that normal peripheral blood leukocytes did not express human liver HSPGs as well as hematopoietic cell lines in lymphoid lineage. However, it was interesting that cell lines in myeloid lineage (HL-60 and K562) showed significant expression of such molecules. The result suggested that these cells may express liver HSPGs or HSPGs-like molecule(s). To study the expression of the newly molecule(s) that can be used as co-marker for differentiation of leukemia by a novel monoclonal antibody specific to liver HSPGs, we studied the expression of HSPGs on various leukemic cells from 33 patients (16 AML, 5 ALL, 1 CML, 1 HD and 10 NHL) by indirect immunofluorescent technique using MAbs specific to liver HSPGs (1E4-1C2 and 4E6-1E1) and analyzed by flow cytometry. The interesting AML cell population was confirmed by PE conjugated anti-CD33. The result showed that non of nor mal peripheral blood leukocytes expressed liver HSPGs as well as ALL, CML, HD, NHL and cell in normal born marrow. More interesting, 9 AML samples showed positive reaction (7 of them reacted only with 1E4-1C2 and 2 reacted with both MAbs). It was suggested that AML may express new molecules and this was not observed in other lineages. The newly molecule(s) may be liver HSPGs or HSPGs-like molecule(s) because it can be detected by specific MAbs. However, the expression of molecule(s) was not found in every AML. It might be explained that AML is the abnormality of stem cells which can be differentiated and express different membrane molecules. Moreover, differences in stages of AML could be concerned together with the observation of hematologist who diagnoses cells from bone marrow smears. This study developed the new leukemic co-marker for the differentiation of AML and however, it needs more characterization.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณสำหรับการทำวิจัยนี้ให้สำเร็จด้วยดี มีคุณค่าทางการศึกษา เป็นประโยชน์ต่อการศึกษา การเรียนการสอนแก่นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ และเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในขั้นสูงต่อไปเพื่อผลิตนํ้ายาสำหรับการช่วยวินิจฉัยแยกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย เดชตรีรัตน์ ที่กรุณาอนุเคราะห์ anti-24, HIV สำหรับใช้ในการศึกษาค้างนี้

ขอขอบพระคุณ นพ.วีระศักดิ์ นาวารวงศ์ และคุณรุ่งเรือง กาวีแวง ห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณบางส่วนจากโครงการ IRPUS (I4801001) ประจำปีการศึกษา 2548 และได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เอกสารเลขที่ 283/2548

ผศ. ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายการตารางประกอบ

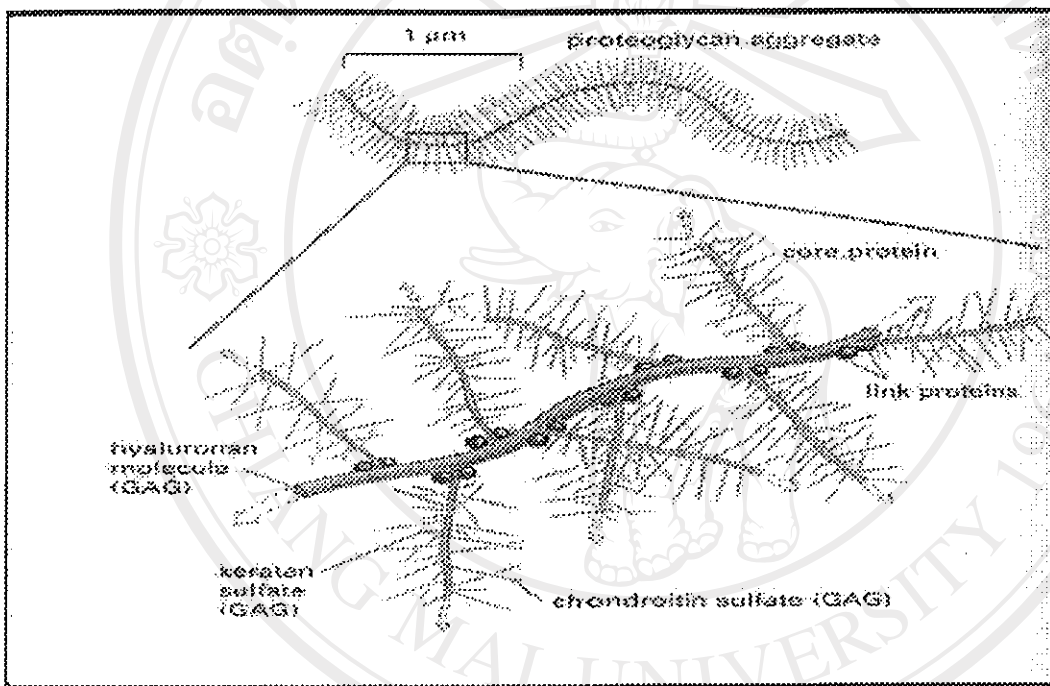
ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	ความแตกต่างในชนิดของ GAG ใน HSPGs ที่พบในเนื้อเยื่อต่างกัน	3
ตารางที่ 2	การแสดงออกของ proteoglycans ชนิดต่างๆ บนผิวเซลล์	3
ตารางที่ 3	ชนิดของ heparan sulfate และ heparin-binding proteins	5
ตารางที่ 4	แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทาง morphology ของ M0-M7 ตาม FAB classification	8
ตารางที่ 5	แสดงการตรวจแยกประเภทของ AML โดยวิธี Cytochemistry และ Immunophenotyping	9
ตารางที่ 6	แสดงผลการศึกษาที่ 1 การศึกษาโดยใช้การกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง	16
ตารางที่ 7	ผลการยืนยันการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยใช้ PE conjugated anti-CD33 เปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วย AML	20

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	แบบจำลองของ proteoglycans	1
รูปที่ 2	พันธะและชนิดของน้ำตาลใน disaccharides แบบต่างๆ	2
รูปที่ 3	แบบจำลอง secretory proteoglycans และ Transmembrane proteoglycans	2
รูปที่ 4	กระบวนการสร้างและการสลาย proteoglycans	4
รูปที่ 5	แสดงการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก	7
รูปที่ 6	แสดงตัวอย่างของเซลล์ผู้ป่วยโรค NHL, HD, ALL และ CML ที่ให้ผลลบเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2	17
รูปที่ 7	แสดงตัวอย่างของเซลล์ผู้ป่วยโรค AML ที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 และ 4E6-1E1	18
รูปที่ 8	แสดงตัวอย่างของเซลล์ของคนปกติที่ให้ผลลบเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33, 1E4-1C2 และ 4E6-1E1	21
รูปที่ 9	แสดงตัวอย่างของเซลล์จากผู้ป่วยโรค AML ที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33 และ 1E4-1C2 (รายชื่อที่ 1)	22
รูปที่ 10	แสดงตัวอย่างของเซลล์จากผู้ป่วยโรค AML ที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33 และ 1E4-1C2 (รายชื่อที่ 2)	23

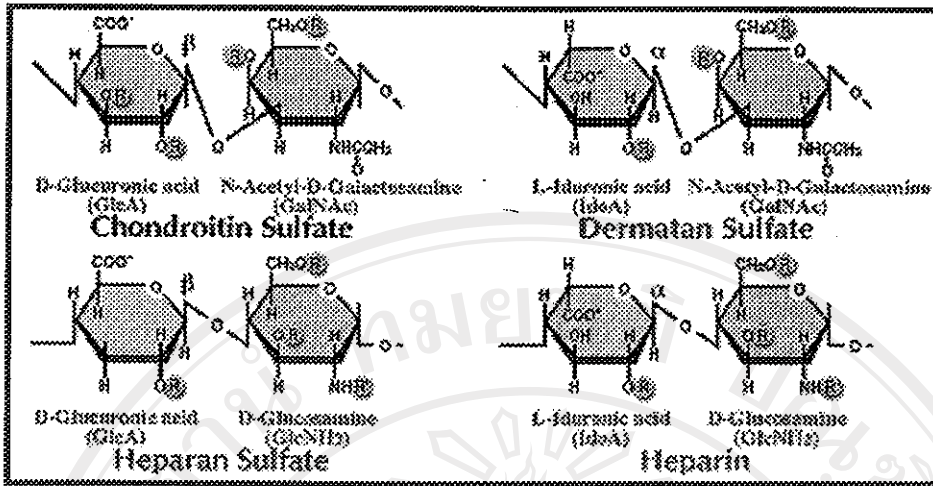
บทที่ 1
บทนำ

Proteoglycan คือ glycoprotein ที่ประกอบด้วยส่วนของโปรตีนแกนกลาง (core protein) และ ส่วนของ glycosaminoglycans ซึ่งมีลักษณะเป็น sulfated polysaccharide¹ (รูปที่ 1) ที่ประกอบขึ้นด้วย repeating disaccharide² ของ uronic acid และ galactosamine (รูปที่ 2) จำนวน 40-100 repeating โดยความแตกต่างของชนิด disaccharide ทำให้ glycosaminoglycans มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป³ เช่น chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, heparin หรือ heparan sulfate



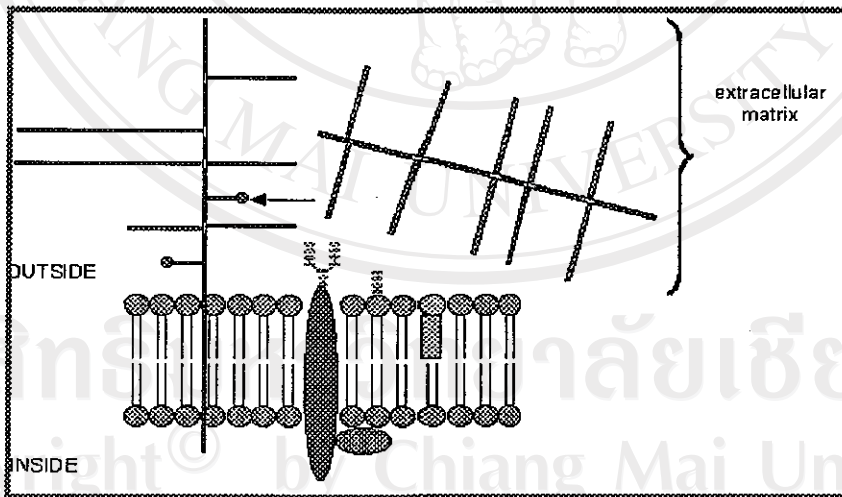
รูปที่ 1 แบบจำลองของ Proteoglycans

(แหล่งที่มา <http://www.target.com/common/catalog/product.jhtml>)



รูปที่ 2 พันธะและชนิดของน้ำตาลใน Disaccharide แบบต่าง ๆ
 (แหล่งที่มา <http://www.target.com/common/catalog/product.jhtml>)

Proteoglycan แต่ละชนิดนั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุล และชนิดของ glycosaminoglycans ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถแบ่ง Proteoglycan ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ syndecans, glypicans เป็นต้น³ และสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามการสร้างและการแสดงออก ได้แก่ secretory proteoglycan และ transmembrane proteoglycan (รูปที่ 3) ดังแสดงในตารางที่ 1⁴



รูปที่ 3 แบบจำลองของ secretory proteoglycan และ transmembrane proteoglycan
 (แหล่งที่มา <http://www.target.com/common/catalog/product.jhtml>)

ตารางที่ 1 ความแตกต่างในชนิดของ GAG ใน HSPGs ที่พบในเนื้อเยื่อต่างกัน

Proteoglycan	Major GAG	Tissue
Secretory proteoglycan		
Versican	Chondroitin sulfate	Brain, mesenchyme
Testican	Heparan sulfate	Brain, testis
Perlecan	Heparan sulfate	Basement membrane
Transmembrane Proteoglycan		
N-syndecan	Heparan sulfate	Brain
Glypican	Heparan sulfate	Brain, muscle
Appican	Chondroitin sulfate	Brain, connective tissue

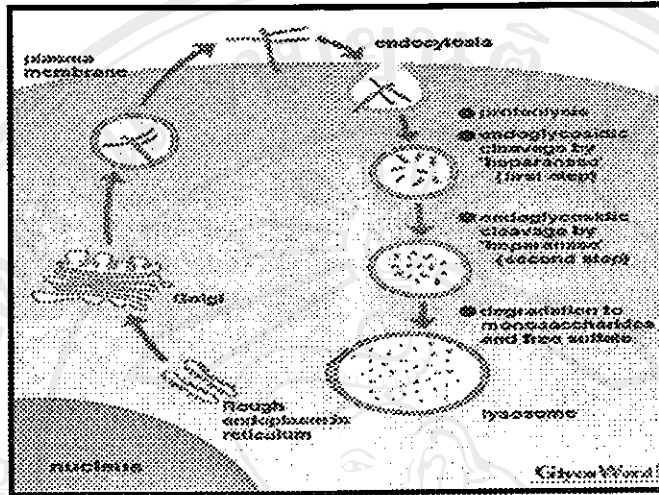
จากการศึกษาการแสดงออกของ proteoglycan บางชนิดเช่น syndecans และ glypican พบว่ามี syndecans และ glypican อยู่บนผิวเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2⁵

ตารางที่ 2 การแสดงออกของ proteoglycan ชนิดต่างๆ บนผิวเซลล์

Proteoglycan	Expression	Proteoglycan	Expression
Syndecan	Epithelia, plasma cell	Glypican	CNS
Fibroglycan	Fibroblast	Cerebroglycan	CNS
N-syndecan	CNS	OCI-5	CNS
Amphiglycan	Adherent cells		

Heparan sulfate (HS) ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ golgi apparatus โดยเอนไซม์ heparan sulfate synthase ได้เป็น tetrasaccharide [GlcA-Gal-Gal-Xyl-(ser)] บน core protein ของ proteoglycan สามารถ พบการกระจายตัวของ HS ทั่วไปบนผิวเซลล์และมีส่วน repeating disaccharide ของ GlcA-GlcNAc จำนวน 40-100 ครั้ง การย่อยสลาย heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) เกิดขึ้นภายใน

เซลล์ โดย proteolytic และ endoglycosidic enzyme ได้เป็น heparan sulfate fragment และถูกย่อยต่อไปด้วย exoglycosidase และ sulfatase ในถุง lysosome⁵(รูปที่ 4)



รูปที่ 4 กระบวนการสร้างและการสลาย proteoglycan
(แหล่งที่มา <http://www.target.com/common/catalog/product.jhtml>)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพื้นฐานต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ cell adhesion, migration, differentiation และ cell proliferation ทั้งยังเป็น co-receptor ให้กับหลายโมเลกุลที่มี heparin binding region อยู่ เช่น cytokine, Apo E และ growth factor ซึ่งต้องจับกับ HSPGs ร่วมด้วยเพื่อทำงาน หรือส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ได้ ดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 3⁶ ที่สำคัญคือ HSPGs เป็นตัวรับจำเพาะโดยตรงสำหรับพาหะก่อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อมาลาเรีย และไวรัสไข้เลือดออก ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่อวัยวะหรือเซลล์เป้าหมายเพื่อก่อเกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะหรือเซลล์นั้นได้⁵

จากความสำคัญของ HSPGs ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การศึกษาการกระจายตัวของ HSPGs บนผิวเซลล์ชนิดต่างๆ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อศึกษาถึงหน้าที่ บทบาท และการทำงานของ HSPGs ต่อกระบวนการพื้นฐานต่างๆ ภายในเซลล์ และโมเลกุลที่มี heparin binding region อยู่

ตารางที่ 3 ชนิดของ heparan sulfate และ heparin-binding proteins

Functions	Molecules
Growth Factors	FGF-1-9
	HGF (Hepatocyte Growth Factor)
	HBEGF (Heparin Binding Epidermal Factor)
	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
Adhesive Matrix Proteins	Fibronectin
	Vitronectin
	Laminin
	Collagens
	Thrombospondin
Enzymes Involved in Lipid Metabolism	Lipoprotein Lipase
	Hepatic Lipase
	Phospholipase
	ApoB, ApoE
Serine Protease Inhibitors	Antithrombin III
	Heparin Co-factor II
	Protease Nexins
Other Proteins	Superoxide Dismutase
	Elastase
	Platelet Factor 4
	N-CAM
	Transcription Factors
	RNA Polymerase DNA Topoisomerase
	Tumor Necrosis Factor

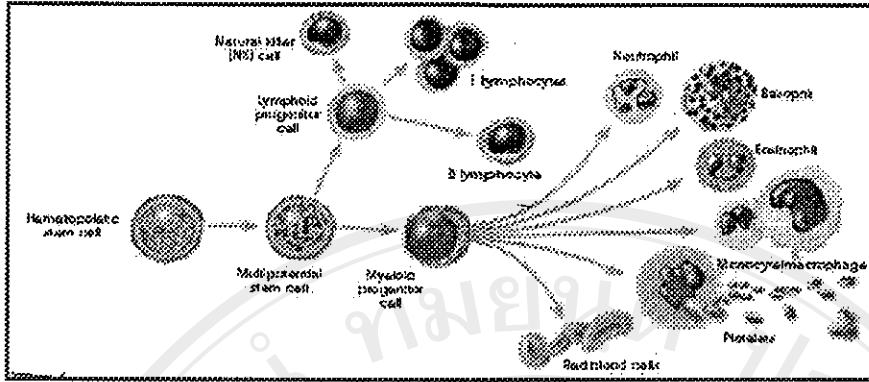
เนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลัก และเป็นแหล่งรวมของการก่อโรคและพยาธิสภาพต่างๆ มากมาย เช่น มาลาเรีย และไข้เลือดออก จากการศึกษาพบว่าเซลล์ตับเป็นแหล่งใหญ่ของการแบ่งตัวของไวรัสในร่างกาย โดยมี HSPGs บนผิวเซลล์ตับเป็นโมเลกุลรับจำเพาะบนผิวเซลล์เป้าหมายสำหรับไวรัส นอกจากนี้ยังมี รายงานพบว่าการนำไวรัสเข้าสู่เซลล์สามารถทำได้โดยผ่านกระบวนการ endocytosis ของ membrane HSPGs ร่วมด้วย¹

ตับเป็นอวัยวะที่ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เซลล์ที่พบมากที่สุดคือ hepatocytes ซึ่งพบว่าบนผิวเซลล์มี HSPGs เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถสร้างและหลั่ง heparan sulfate ที่ตรวจพบได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เซลล์อื่นๆ ที่แม้ว่าพบได้น้อย เช่น parenchymal cells พบว่ามีการสร้าง HSPGs เช่นกัน แต่สร้าง proteoglycan ชนิดอื่นๆ ร่วมด้วยได้แก่ chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan ด้วยเหตุที่เซลล์ตับมีการสร้าง HSPGs ที่จำเพาะ ดังนั้นความเกี่ยวข้องระหว่างโมเลกุลดังกล่าวกับพยาธิสภาพที่เกิดแก่เซลล์ตับ จึงเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยจำนวนมากที่จะศึกษา เพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นในกลไกการก่อโรคจากไวรัสหรือปรสิตหรือโมเลกุลใดๆ

การที่จะสามารถศึกษาและพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวได้ จำเป็นต้องใช้เครื่องมือสำคัญ คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุล HSPGs และ/หรือ GAG ที่เกิดจากการแตกทำลายของเซลล์ตับ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้ศึกษาคุณสมบัติยับยั้งการฝังตัวและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ด้วย ผู้วิจัยได้สกัด heparan sulfate proteoglycan จากตับมนุษย์ และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSPGs ได้โคลนจำนวนมาก และพบว่าบางโคลนมีความจำเพาะต่อส่วน GAGs ซึ่งเป็นที่น่าสนใจและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี

สำหรับการศึกษาค้นคว้านี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ จึงขอกล่าวถึงการสร้างเม็ดเลือดและโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดมัยลอยด์ (Acute myeloblastic leukemia: AML) ดังนี้

ไขกระดูกเป็นอวัยวะหนึ่งของร่างกายที่ค่อนข้างสลับซับซ้อนกระจายอยู่ตามกระดูกของร่างกาย ประมาณว่าในคนปกติที่มีน้ำหนัก 70 กิโลกรัม จะมีเนื้อเยื่อของไขกระดูกประมาณ 1.5 กิโลกรัม ไขกระดูกมีหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ซึ่งมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวมาจากเซลล์ต้นกำเนิดที่เรียก pluripotent hematopoietic stem cell เดียวกัน เซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง และสามารถเจริญกลายเป็นเซลล์ progenitor 2 ชนิด ได้แก่ Myeloid progenitor cell และ Lymphoid progenitor cell จากนั้น Myeloid progenitor cell จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ในสาย Monomyeloid series และ Erythroid series ส่วน Lymphoid progenitor cell ก็พัฒนาไปเป็นเซลล์ในสาย Lymphoid series⁷ รูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงการสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก

เซลล์ในสาย Monomyeloid series ประกอบไปด้วย โมโนไซด์ เบโซฟิล ฮีโชนินฟิลและนิวโตรฟิล ซึ่งมีจำนวนมากที่สุด สำหรับแอนติเจนเริ่มแรกที่ปรากฏในสายนี้ได้แก่ CD33 (MY9), CD34 (MY10), CD13 (MY7), MY8, CD11 (Mo1) และ CD14 (MY4, Mo2) อย่างไรก็ตาม CD33 และ CD13 เป็นแอนติเจนร่วมที่พบได้ในกลุ่มเซลล์ myeloblast, promyelocyte, myelocyte, metamyelocyte, monoblast และ monocyte จึงใช้เป็น marker เริ่มแรกที่แยกเซลล์ในสาย Monomyeloid series ออกจากเซลล์ในสายอื่นๆ⁷

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดมัยลอยด์ (AML) เกิดจากความผิดปกติของ multipotential stem cell ในไขกระดูกส่งผลให้ Stem cell มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วผิดปกติและเซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวล้วนแต่เป็นเซลล์ตัวอ่อน (blast cell) ที่ไม่สามารถ differentiate ไปเป็นตัวแก่แต่กลับมีการ proliferation อยู่ตลอดเวลาทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ blast cell เป็นจำนวนมากและมีผลทำให้เกิดการสะสมแทนที่โดยเซลล์เหล่านี้ในไขกระดูก ในกระแสเลือดและในอวัยวะต่างๆ ยังผลให้ร่างกายทำงานผิดปกติไป สาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเกิดเนื่องจากสาเหตุต่อไปนี้ คือ พันธุกรรม สารรังสี สารเคมี เช่น Benzene, ยาฆ่าแมลง เป็นต้น ยาเคมีบำบัด เช่น Etoposide เป็นต้น ไวรัส และอื่นๆ เช่น นุหรี การตรวจพบร่องรอยของความผิดปกติในระยะแรกจะตรวจพบในไขกระดูก ต่อมาจึงพบในกระแสเลือด เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ⁸

เนื่องจาก stem cells ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของ AML มีคุณสมบัติที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์หลายประเภท ดังนั้นเมื่อเกิดโรคขึ้นจึงพบลักษณะเซลล์ในผู้ป่วยแต่ละรายมีความแตกต่างกันทั้งในด้านรูปร่าง (morphology) ลักษณะการติดสีเมื่อย้อมพิเศษ (cytochemical reaction) การแสดงออกของ marker ต่างๆ และความผิดปกติของโครโมโซม ดังนั้นถ้าอาศัยการจัดแบ่งชนิดของ AML ตาม FAB classification จะแบ่งได้เป็น 8 กลุ่มย่อย คือ M0 - M7⁹ โดยวิธีที่นิยมใช้ในการจัดแบ่งชนิดของ AML ได้แก่

1. **Morphology** เป็นการดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นการดูลักษณะที่แตกต่างกันของ blast cell จากไขกระดูก (Bone marrow) ซึ่งตัวอย่างแสดงไว้ตามตารางที่ 4
2. **Cytochemistry** เป็นการย้อมพิเศษเพื่อใช้ตรวจสอบสารเคมี (chemical molecules) ของเซลล์ โดยอาศัยหลักการที่เซลล์แต่ละประเภทมีสารเคมีที่แตกต่างกันถึงแม้เซลล์บางชนิดจะประกอบด้วยสารเคมีที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ก็จะมีในปริมาณไม่เท่ากัน ตัวอย่างของสารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ Enzyme, Lipid, Carbohydrate, DNA, RNA, Iron, และ Biological molecules ต่างๆ ตัวอย่างแสดงไว้ตามตารางที่ 5
3. **Immunophenotyping** เป็นเทคนิคการวินิจฉัยชนิดของเซลล์โดยใช้สีหรือสิ่งที่มองเห็นได้ (Visible indicator) ผ่านทางแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ ซึ่งแอนติเจนหลักๆ ที่มักใช้แยกเซลล์ในสายมัยลอยด์ได้แก่ HLA-DR, CD33, CD13, MY8, CD11 และ CD14 ตัวอย่างแสดงไว้ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างทาง Morphology ของ M0-M7 ตาม FAB classification

Group	Characterization
M0	Blast >90%, CD7/13/33 or MPO or SBB positive
M1	Blast >90% , Promyelocyte <10%
M2	Blast 30-89%, Promyelocyte >10%
M3	Immature myeloid cell >50% และมี hypergranular
M3 variant	Immature myeloid cell >50% , Promyelocyte มี granule ขนาดเล็ก
M4	Myeloblast ถึง polymorphonuclear cells 30-80% และ Monocytic cells >20%
M4eo	เช่นเดียวกับ M4 แต่มี eosinophilia ร่วมด้วย
M4baso	เช่นเดียวกับ M4 แต่มี basophilic maturation ร่วมด้วย
M5a	Monoblast <80%
M5b	Monoblast <80%
M6	Megaloblastic erythroid precursors
M7	Megakaryoblast >30%

ตารางที่ 5 แสดงการตรวจแยกประเภทของ AML โดยวิธี Cytochemistry และ Immunophenotyping

AML subtype	Cytochemistry					Immunophenotyping						% of AML
	MPO	SB	CAE	NSE	PAS	HLA-DR (IA)	My9 (CD33)	My7 (CD13)	My8	Mol (CD11)	My4 (CD14)	
M0	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
M1	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	17
M2	++	++	++	+/-	-	+	+	+	-	-	-	30
M3	+++	++++	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	10
M4	++	++	++	++	-	+	+	+	+	+	+	25
M4eo	+	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	< 1
M5a	+/-	-	-	+++	-	+	+	-	+	+	+	4
M6	-	-	-	+++	+/-	+	+	-	+	+	+	6
M6	-	-	-	+/-	+++	-	+	+	-	-	-	4
M7	-	-	-	-	++	Platelet-specific cell surface markers						1

เนื่องจาก HSPGs มีบทบาทสำคัญอย่างหนึ่งที่น่าสนใจคือ เป็นตัวรับจำเพาะร่วมของ growth factor ผู้วิจัยได้ศึกษาเบื้องต้นถึงการกระจายของโมเลกุลดังกล่าวในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ของคนปกติ ด้วยเทคนิค indirect immunofluorescence โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีสองโคลนที่ผลิตได้คือ 1E4-1C2 และ 4E6-1E1 พบว่าเม็ดเลือดขาวของคนปกติจำนวน 10 รายที่ทำการศึกษาไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวบนผิวเซลล์ แต่เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงในสายมัยลอยด์ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะต่อ liver HSPGs ในขณะที่เซลล์ในสายอื่นให้ผลลบ⁹ จากผลการศึกษาเบื้องต้นจะกล่าวได้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวในสายมัยลอยด์ เมื่อเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง อาจมีการสร้างโมเลกุลชนิดใหม่ให้ปรากฏบนผิวเซลล์ โดยที่โมเลกุลใหม่นี้อาจมีโครงสร้างคล้ายหรือเหมือนกับ liver HSPGs จึงสามารถทำปฏิกิริยาและตรวจพบได้ด้วยเทคนิค indirect immunofluorescence อย่างไรก็ตามการศึกษาเบื้องต้นเป็นการศึกษาในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง ดังนั้นหากได้มีการนำพื้นฐานความรู้ดังกล่าวไปศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ในผู้ป่วยจริง และหากพบว่าในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยสามารถแยกวิเคราะห์ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ได้จริง ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ liver HSPGs นับว่าเป็นมิติใหม่ของการศึกษาที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการตรวจวินิจฉัยแยก

ชนิดของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้จำเพาะ เพิ่มเติมจากวิธีเดิมที่อาศัยการย้อมเซลล์เม็ดเลือดและดู
สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้อง ซึ่งต้องใช้แพทย์เฉพาะทางที่มีทักษะ ความชำนาญและศักยภาพสูง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

วัสดุและวิธีการวิจัย

ขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วย

1. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดี
2. การทดสอบในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิค Indirect immunofluorescence และวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมโมโนโคลนอล แอนติบอดี

เลี้ยงเซลล์ลูกผสมโคลน 1E4-1C2 และ 4E6-1E1 จำนวน 2 โคลนซึ่งผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และพิสูจน์แล้วด้วยเทคนิค indirect immunofluorescence ว่าให้ผลลบต่อเซลล์เม็ดเลือดปกติทุกชนิด รวมถึงเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงในสาย lymphoid และ monocytoid แต่ให้ผลบวกต่อเซลล์มะเร็งเฉพาะเลี้ยงในสาย myeloid เท่านั้น โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ CSDMEM (10%FCS/DMEMHg/OPI) ที่ 37 °C, 5 % CO₂ เลี้ยงให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวน และ สร้างแอนติบอดีออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ รอจนเซลล์ทั้งหมดตาย เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติบอดีมากที่สุด จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (cell culture supernatant) ที่มีแอนติบอดีไว้ใช้ในการทดสอบกับตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป

2. การทดสอบในตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว

2.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างเลือดและไขกระดูกที่ตรวจวินิจฉัยแล้วและรอการกำจัด จากหอผู้ป่วยอายุรกรรม โรงพยาบาลมหาสารคาม เชียงใหม่ โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง
2. นำไปปั่นเบาที่ 800 g นาน 10 นาที เพื่อให้ได้ส่วนของ buffy coat
3. ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย cold 1% BSA-PBS-Na₂SO₄ ในที่เย็น
4. นับจำนวนเม็ดเลือดขาว โดยใช้ Turk's solution
5. ปรับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดให้ได้ 1×10^7 cells/mL ด้วย cold 1% BSA-PBS-Na₂SO₄

2.2 การย้อมเม็ดเลือดขาว

2.2.1 การวิเคราะห์กลุ่มเซลล์มะเร็งโดยการกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง

หลักการ

อาศัยหลักการ Indirect immunofluorescence ในการศึกษาถึงโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ถ้าโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ liver HSPGs ได้ก็จะจับกันเป็น Ag-Ab complex จากนั้นทำการตรวจหา Ag-Ab complex โดยการเติม rabbit anti-mouse Igs conjugated FITC ลงไป ตรวจวิเคราะห์การเรืองแสงโดยใช้ Flow cytometer โดยในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์นั้นจะอาศัยการกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง ที่ว่ากลุ่มเซลล์มะเร็งส่วนใหญ่นั้นจะมีลักษณะเป็น blast cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่และมี granularity น้อย

วิธีการ

1. เติม AB serum ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% ของ diluted buffy coat suspension ผสมแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที เพื่อ block Fc receptor บนผิวเซลล์
2. เติมน้ำยา และ/หรือ monoclonal antibodies ชนิดต่างๆ ลงใน microcentrifuge tube เพื่อทำ reaction ดังแสดง ผสมแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที

Condition	Master mix
Cell control	Buffy coat 50 μ L
Negative control	Buffy coat 50 μ L + CSDMEM 50 μ L
Isotype control	Buffy coat 50 μ L + anti-P24
Conjugate control	Buffy coat 50 μ L + 1% BSA-PBS -NaN ₃
Test	Buffy coat 50 μ L + cell supernatant 50 μ L (2 clones)

3. ครบเวลายับล้างด้วย cold 1% BSA-PBS -NaN₃ ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
4. resuspend กลับด้วย 50 μ L 1% BSA-PBS -NaN₃
5. เติม rabbit anti-mouse Igs conjugated FITC (1:25) 50 μ L ผสมแล้วแช่ในน้ำแข็งในที่มืดนาน 30 นาที

6. ครบเวลาปั่นล้างด้วย cold 1% BSA-PBS- NaN_3 ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
7. เติม OptiLyse B solution 50 μL ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ RT ในที่มีदनาน 10 นาที
8. ครบเวลาเติมน้ำกลั่น 2 mL โดยถ่ายใส่ flow cytometric tube ครั้งละ 1 mL จำนวน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่ RT ในที่มีदनาน 10 นาที
9. ครบเวลาปั่นที่ 2000 rpm นาน 10 นาที
10. เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม sheath fluid หลอดละ 300 μL
11. วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer

2.2.2 การยืนยันเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยใช้ PE conjugated anti-CD33

หลักการ

อาศัยหลักการ Indirect immunofluorescence ในการศึกษาถึงโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ถ้าโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ liver HSPGs ได้ก็จะจับกันเป็น Ag-Ab complex จากนั้นทำการตรวจหา Ag-Ab complex โดยการเติม rabbit anti-mouse Igs conjugated FITC ลงไป ตรวจวิเคราะห์การเรืองแสงโดยใช้ Flow cytometer และเลือกกลุ่มเซลล์โดยใช้ PE conjugate anti-CD33 ซึ่ง CD33 นี้เป็นแอนติเจนร่วมที่พบได้ในกลุ่มเซลล์ myeloblast, promyelocyte, myelocyte, metamyelocyte, monoblast และ monocyte จึงใช้เป็น marker เริ่มแรกที่แยกเซลล์ในสาย Monomyeloid series ออกจากเซลล์ในสายอื่นๆ ในการคัดเลือกรวมเซลล์นั้นจะเลือกกลุ่มเซลล์ที่ติด PE conjugate anti-CD33 ไปวิเคราะห์ต่อ ซึ่งหากถ้าโมเลกุลใหม่บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ liver HSPGs ได้ก็ต้องติดกับแอนติบอดีทั้งสองชนิดและตรวจวัดการเรืองแสงของสารเรืองแสงได้ทั้งสองสี

วิธีการ

1. เติม AB serum ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% ของ diluted buffy coat suspension ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C นาน 30 นาที เพื่อ block Fc receptor บนผิวเซลล์
2. เติมน้ำยา และ/หรือ monoclonal antibodies ชนิดต่างๆ ลงใน microcentrifuge tube เพื่อทำ reaction ดังแสดง ผสมแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 30 นาที

Condition	Master mix
Cell control	: Buffy coat 50 μ L
Negative control	: Buffy coat 50 μ L + CSDMEM 50 μ L
Isotype control	: Buffy coat 50 μ L + anti-P ₂₄
Conjugate control	: Buffy coat 50 μ L + 1% BSA-PBS -NaN ₃
Test	: Buffy coat 50 μ L + cell supernatant 50 μ L (2 clones)

3. ครบเวลาปั่นล้างด้วย cold 1% BSA-PBS -NaN₃ ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
4. Resuspend กลับด้วย 50 μ L 1% BSA-PBS -NaN₃
5. เติม rabbit anti-mouse Igs conjugated FITC (1:25) 50 μ L ผสมแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งในที่มืดนาน 30 นาที
6. ครบเวลาปั่นล้างด้วย 1% BSA-PBS -NaN₃ ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
7. เติม PE conjugated mouse anti-CD33 20 μ L ในชุดของ test, negative control และ conjugate control (Isotype control เติม PE conjugated IgG1) ผสมแล้วแช่ในน้ำแข็งในที่มืดนาน 30 นาที
8. ครบเวลาปั่นล้างด้วย 1% BSA-PBS -NaN₃ ที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง
9. เติม OptiLyse B solution 50 μ L ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ RT ในที่มืดนาน 10 นาที
10. ครบเวลาเติมน้ำกลั่น 2 mL โดยถ่ายใส่ flow cytometric tube ครั้งละ 1 mL จำนวน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่ RT ในที่มืดนาน 10 นาที
11. ครบเวลาปั่นที่ 2000 rpm นาน 10 นาที
12. เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม sheath fluid หลอดละ 300 μ L
13. นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง flow cytometer

บทที่ 3 ผลการค้นคว้าวิจัย

การศึกษาที่ 1 การศึกษาโดยใช้การกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาในผู้ป่วยทั้งสิ้น 25 รายซึ่งได้รับการวินิจฉัยด้วยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโดยวิธีสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ตัวอย่างไขกระดูก (Bone marrow) ได้แก่ ผู้ป่วยจากโรค
 - Non-Hodgkin lymphoma (NHL) จำนวน 10 ราย
 - Hodgkin disease (HD) จำนวน 1 ราย
2. ตัวอย่างเลือด (Peripheral blood)
 - Chronic myelocytic leukemia (CML) จำนวน 1 ราย
 - Acute lymphoblastic leukemia (ALL) จำนวน 5 ราย
 - Acute myeloblastic leukemia (AML) จำนวน 8 ราย

พบว่า control ทั้งหมดได้แก่ Cell control, Negative control, Conjugate control และ Isotype control ให้ผลลบทั้งหมด และเซลล์เม็ดเลือดขาวของ NHL จำนวน 10 ราย HD จำนวน 1 ราย CML จำนวน 1 ราย และ ALL จำนวน 5 ราย ให้ผลลบกับแอนติบอดีทั้ง 2 โคลน แสดงว่าไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลใหม่ที่เหมือนหรือคล้ายกับ liver HSPGs แสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 7 ตามลำดับ

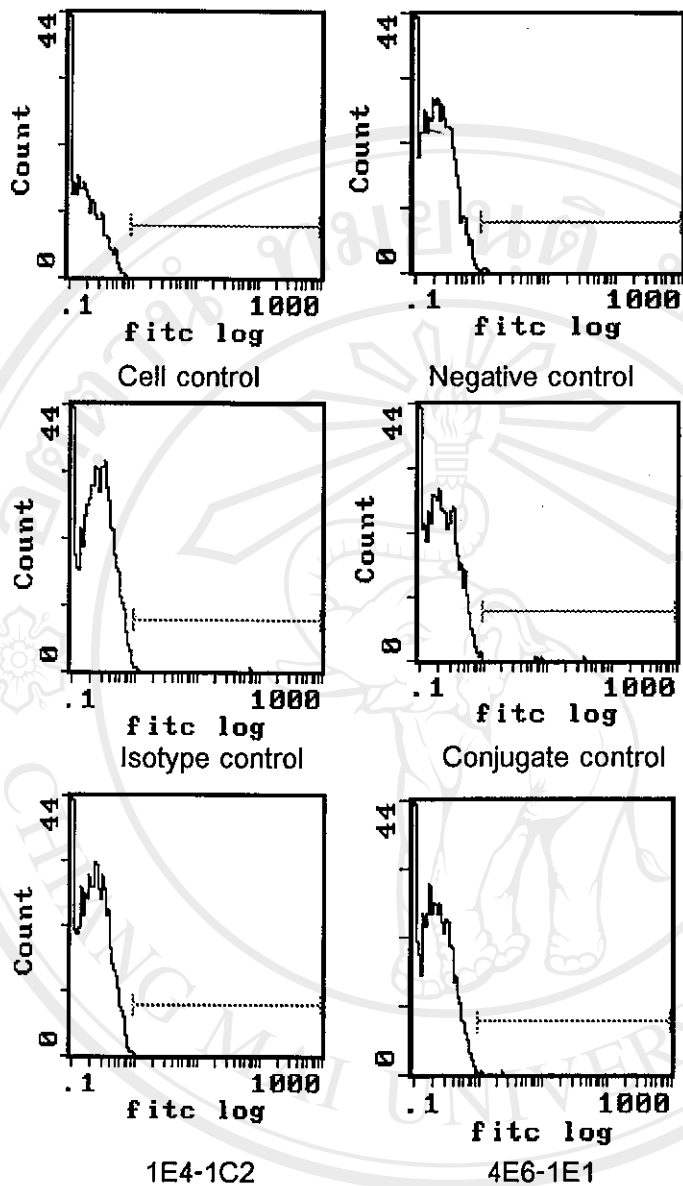
ในทางตรงข้ามเซลล์เม็ดเลือดขาวของ AML จำนวน 8 ราย เซลล์ซึ่งเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวในสลายมัยลอยด์ให้ผลบวกกับแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 จำนวน 4 ราย กับแอนติบอดีโคลน 4E6-1E1 จำนวน 2 ราย แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ใหม่ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ liver HSPGs ซึ่งโมเลกุลใหม่นี้อาจเป็น liver HSPGs หรือมีโครงสร้างบางส่วนที่คล้ายกันจึงสามารถทำปฏิกิริยาและตรวจวัดได้ แสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 8 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวซึ่งตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีต่อ liver HSPGs นี้ ไม่ได้พบในทุกๆ รายที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น AML ในระยะแรกของการศึกษาใช้การกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง ต่อมาจึงได้ใช้ PE conjugated anti-CD33 ในการยืนยันกลุ่มเซลล์มะเร็งชนิดมัยลอยด์ร่วมด้วย เพราะ CD33 เป็น marker ร่วมที่สามารถตรวจพบได้ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ดังกล่าวไว้แล้วในข้างต้น

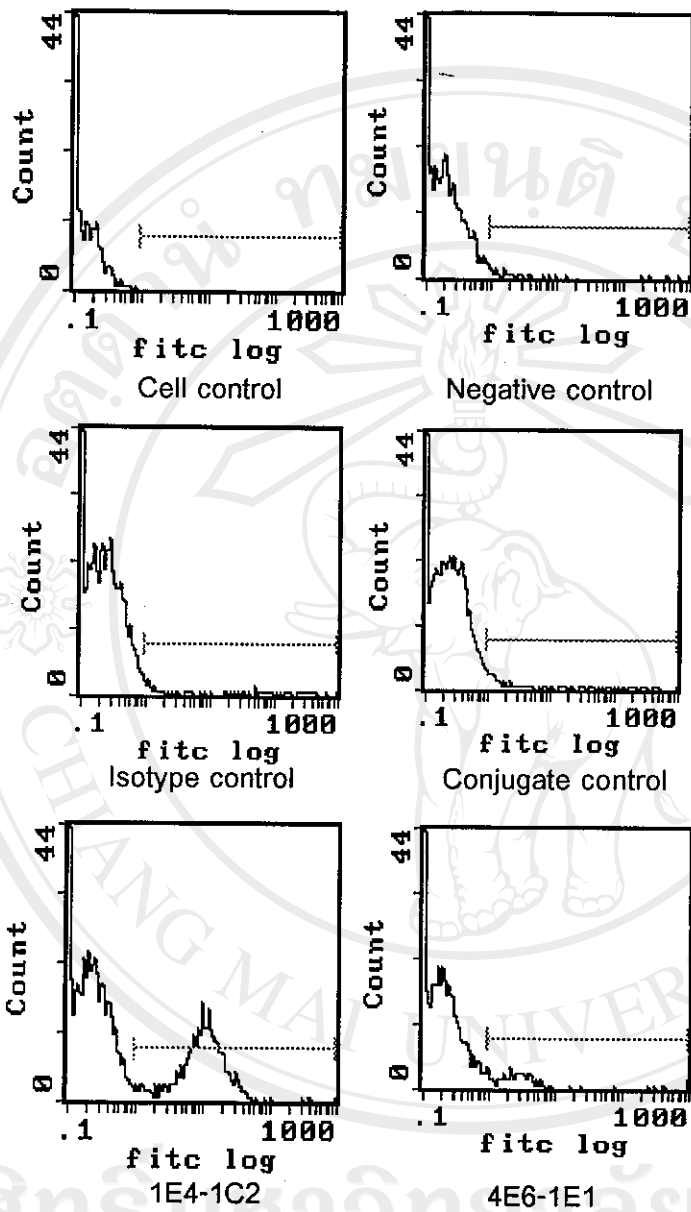
ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาที่ 1 การศึกษาโดยใช้การกำหนดขนาดและ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง

วินิจฉัย	จำนวน	ให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วย		ให้ผลลบเมื่อย้อมด้วย	
		1E4-1C2	4E6-1E1	1E4-1C2	4E6-1E1
NHL	10	-	-	10	10
HD	1	-	-	1	1
ALL	5	-	-	5	5
CML	1	-	-	1	1
AML	8	4	2	4	6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved



รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างของเซลล์จากผู้ป่วยโรค NHL, HD, ALL และ CML ที่ให้ผลลบเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี โคลน 1E4-1C2 และ 4E6-1E1



รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างเซลล์จากผู้ป่วย AML ที่ให้ผลบวกเมื่อ
ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 และ 4E6-1E1

การศึกษาที่ 2 การยืนยันเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยใช้ PE conjugated anti-CD33

สืบเนื่องจากผลการทดลองที่ 1 พบการแสดงออกของโมเลกุลได้ด้วยแอนติบอดีต่อ liver HSPGs แต่ไม่ได้พบในทุกรายที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น AML ในระยะแรกของการศึกษาซึ่งอาศัยการกำหนดขนาด และ granularity ของเซลล์ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็ง จึงได้ใช้ PE conjugated anti-CD33 ในการยืนยันกลุ่มเซลล์มะเร็งชนิดมัยลอยด์ร่วมด้วย เพราะ CD33 เป็น marker ร่วมที่สามารถตรวจพบได้ใน มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยลอยด์ได้

จากการศึกษาในคนปกติจำนวน 5 ราย และจากผู้ป่วย AML 7 รายซึ่งได้รับการวินิจฉัยด้วยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญโดยสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการแสดงออกของโมเลกุล HSPGs บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคนปกติ ต่อแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 และ 4E6-1E1 ทั้ง 5 ราย ถึงแม้จะมี เซลล์บางส่วนได้แก่ monocyte และ granulocyte บางส่วนที่ให้ผล positive กับ monoclonal antibody CD-33 conjugated PE ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 9 ตามลำดับ

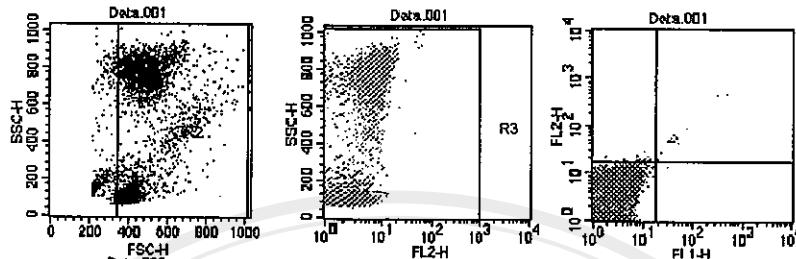
พบว่ามี การแสดงออกของโมเลกุล HSPGs บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วย AML ต่อแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 จำนวน 5 ราย โดยในทุกรายนั้นให้ผล positive กับ PE conjugated anti-CD33 ซึ่งมีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งในกลุ่ม AML จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงยืนยันผลการศึกษาแรก ได้ แสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 10-11 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ผลการยืนยันการคัดเลือกกลุ่มเซลล์มะเร็งโดยใช้ PE conjugated anti-CD33
เปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วย AML

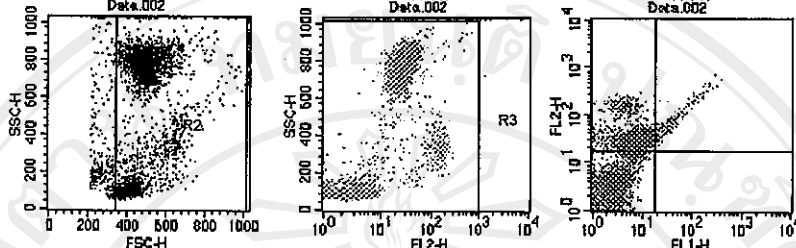
วินิจฉัย	จำนวน	ให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วย		ให้ผลลบเมื่อย้อมด้วย	
		1E4-1C2	4E6-1E1	1E4-1C2	4E6-1E1
Normal	5	-	-	5	5
AML	7	4	0	3	7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

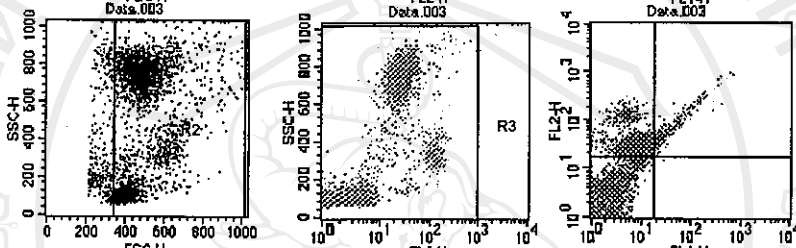
Cell control



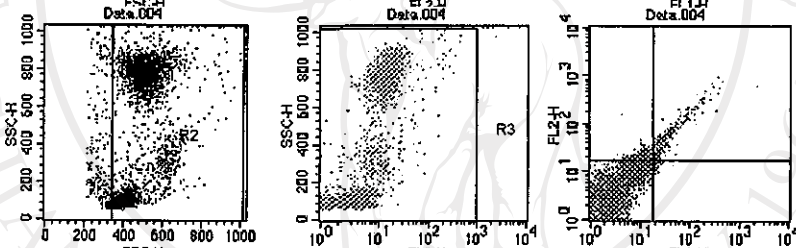
Negative control



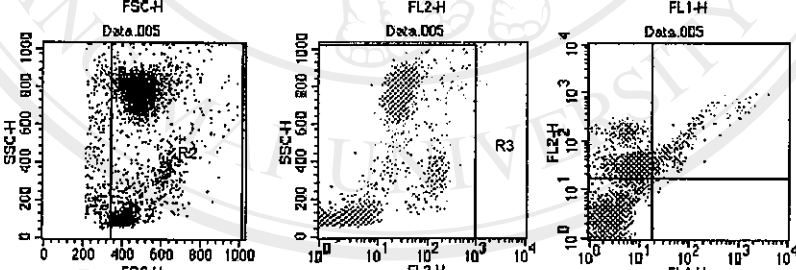
Conjugate control



Isotype control



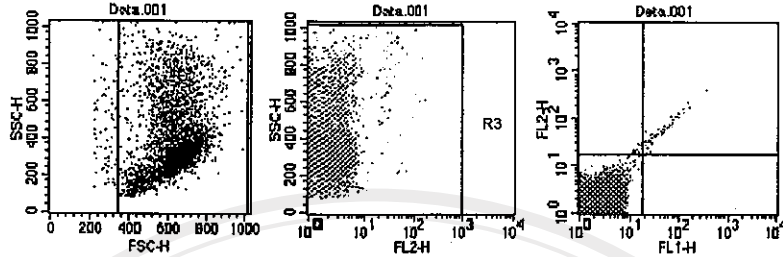
1E4-1C2



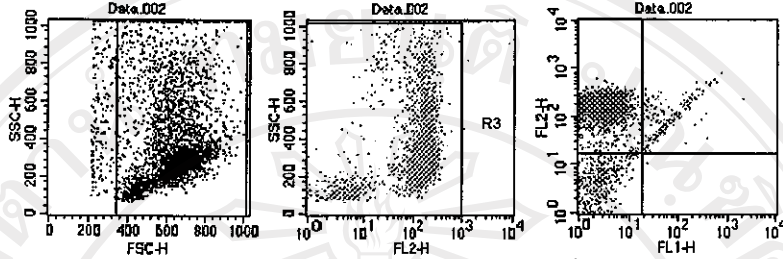
รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างของเซลล์คนปกติ ที่ให้ผลลบเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33,

1E4-1C2 และ 4E6-1E1

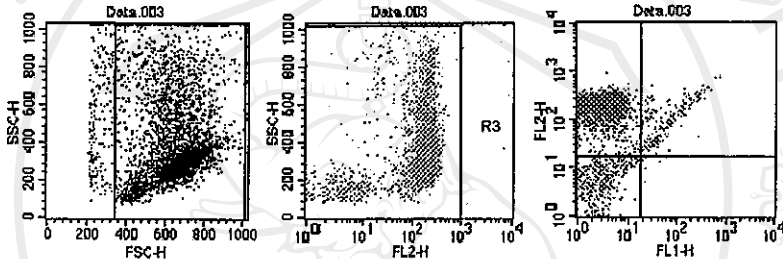
Cell control



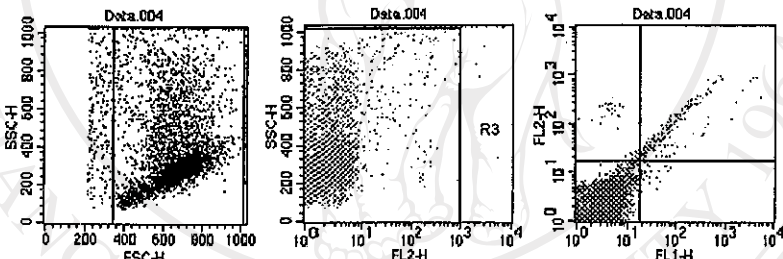
Negative control



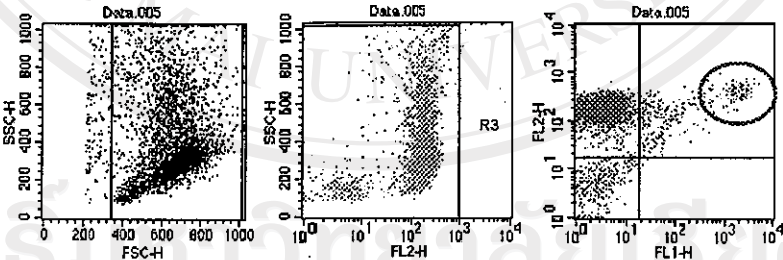
Conjugate control



Isotype control



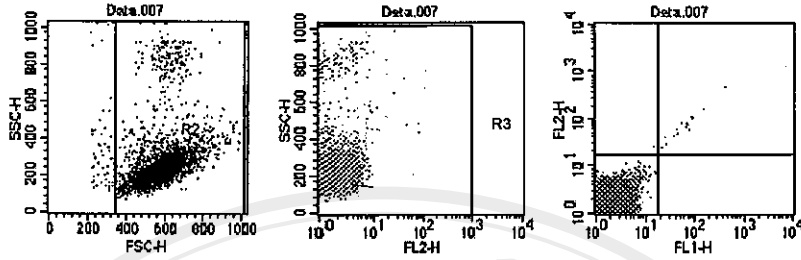
1E4-1C2



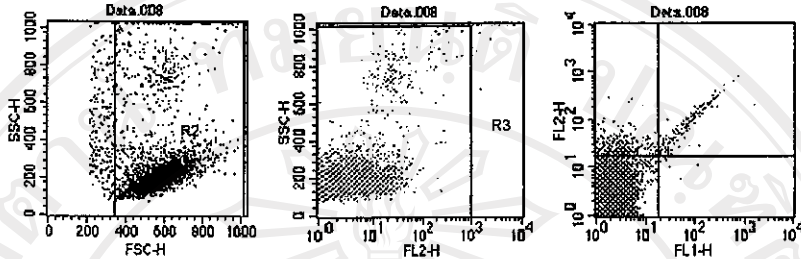
รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างของเซลล์ของผู้ป่วยจากโรค AML ที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33 และ 1E4-1C2 (รายชื่อ 1)

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

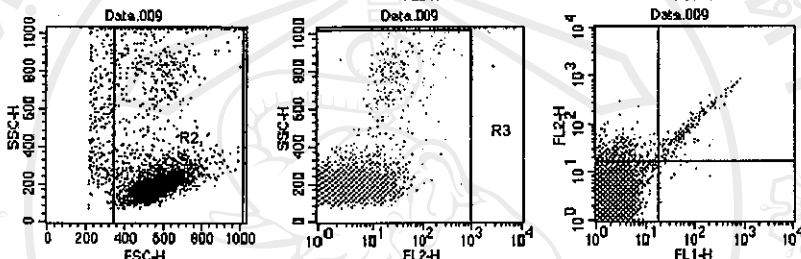
Cell control



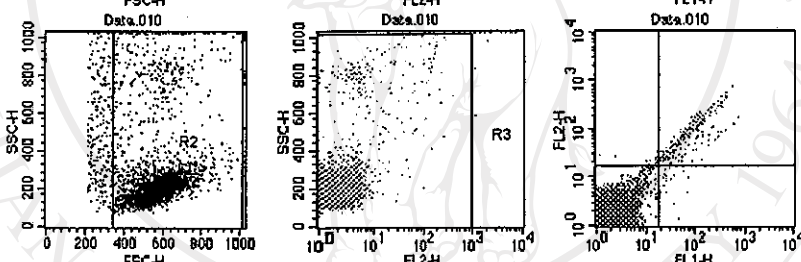
Negative control



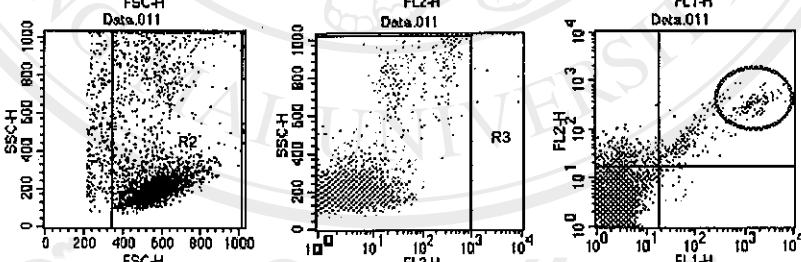
Conjugate control



Isotype control



1E4-1C2



รูปที่ 11 แสดงตัวอย่างของเซลล์ของผู้ป่วยจากโรค AML ที่ให้ผลบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับ anti-CD33 และ 1E4-1C2 (ภายใต้ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ ผู้ป่วยมะเร็งชนิด ALL, CML, HD, NHL และไขกระดูกของคนปกติ ไม่พบการแสดงออกของโมเลกุลที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับ human liver HSPGs จึงให้ผลลบเมื่อทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะ (1E4-1C2 และ 4E6-1E1) แต่พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของมะเร็งชนิด AML มีทั้งที่ให้ผลบวกและผลลบ และผลบวกที่เกิดขึ้นมีทั้งที่ให้ผลบวกต่อทั้งสองโคลน หรือโคลนใดโคลนหนึ่ง แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดน่าจะจำเพาะต่อตำแหน่งจำเพาะใดๆ ที่ต่างกันบนโมเลกุลดังกล่าว นอกจากนี้ยังกล่าวได้ว่าเซลล์มะเร็งชนิด AML มีการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวได้แตกต่างกัน เพราะไม่ได้ให้ผลบวกในทุกสายที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ด้วยฐานวิทยาว่าเป็น AML แต่มีข้อสังเกตว่าทุกสายที่ให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วยแอนติบอดีโคลนใดโคลนหนึ่ง ผลการวินิจฉัยจะเป็น AML ในทุกสาย อธิบายได้ว่า AML ซึ่งเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นจึงสามารถพัฒนาไปได้หลายลักษณะ ซึ่งรวมถึงการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยนอกจากนี้ยังน่าจะเกี่ยวข้องกับระยะของมะเร็งร่วมด้วยที่มีผลต่อการแสดงออกของโมเลกุลต่างๆ บนผิวเซลล์ และอีกเหตุผลหนึ่งที่อธิบายได้คือการระบุชนิดของเซลล์มะเร็งของแพทย์เป็นการวินิจฉัยโดยใช้ฐานวิทยาจากการอ่านสเมียร์ไขกระดูก ไม่ใช่จากสเมียร์เลือด ซึ่งเป็นที่ทราบกันแล้วว่าโดยปกติจะสามารถตรวจพบเซลล์มะเร็งได้ในไขกระดูกก่อนที่เซลล์มะเร็งจะออกสู่กระแสเลือด การตรวจวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจจากเลือดครบส่วนซึ่งเจาะเก็บในเวลาเดียวกับแพทย์อ่านฐานวิทยาจากไขกระดูก

อย่างไรก็ดีผลจากการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ชัดเจนว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสายมัยลอยด์มีการพัฒนา และสร้างโมเลกุลชนิดใหม่ที่เหมือน หรือคล้ายกับ HSPGs บนผิวเซลล์ต้นมนุษย์ จึงสามารถทำปฏิกิริยาได้กับโมโนโคลนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุลดังกล่าวได้ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์มะเร็งในสายอื่นๆ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นแนวทางการพัฒนาแอนติบอดี เพื่อใช้ช่วยวินิจฉัยร่วมกับมาร์กเกอร์อื่นๆ ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการพัฒนาแอนติบอดี เพื่อใช้ในการศึกษา เพื่อการจำหน่าย และพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นชุดน้ำยาสำหรับตรวจแยกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML ที่มีความจำเพาะ

บทที่ 5

บทสรุป

ผลการศึกษาเป็นไปตามที่ตั้งสมมุติฐาน มีการแสดงออกของโมเลกุลของ liver HSPGs หรือคล้ายคลึงกันบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในสายมัยล้อยด์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะที่ผลิตขึ้น อย่างไรก็ตามการแสดงผลออกนั้น มิได้พบในทุกสายที่วินิจฉัยว่าเป็น AML แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใดก็ตามที่ผลการตรวจวิเคราะห์เป็นบวก การวินิจฉัยของแพทย์จะเป็นชนิด AML ในทุกสาย น่าจะอธิบายได้ว่าอาจเป็นไปได้จากการวินิจฉัยโดยแพทย์ใช้สัณฐานวิทยาของเซลล์ในไขกระดูก ซึ่งสามารถพบเซลล์มะเร็งได้ก่อนที่จะออกสู่กระแสเลือดที่เป็นแหล่งของเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากเซลล์มะเร็งในสาย AML เป็นความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นจึงสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ผิดปกติได้หลายลักษณะซึ่งรวมถึงการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วย ทำให้การวิเคราะห์แตกต่างกันเมื่อใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกัน สุดท้ายน่าจะเกิดจากระยะของเซลล์มะเร็งด้วยที่ทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุลต่างกัน อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้ถือเป็นมิติใหม่ที่มีการศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลซึ่งพบบนผิวเซลล์ต้นกำเนิดบนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว จึงน่าจะต้องมีการศึกษาต่อไปถึงคุณลักษณะและบทบาททางชีวภาพของโมเลกุลดังกล่าวบนผิวเซลล์มะเร็ง

บรรณานุกรม

1. Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D.: Proteoglycans of the extracellular environment: Clues from the gene and protein side offer novel prespective in molecular diversity and function, FASEB J. 1996;10: 598-614
2. Buorden, MA, Extracellular Matrix Genes (eds. L.J. Sandell, C.D.Boyd) pp157-174, Academic Press, New York, 1990
3. Yanagishita, M., and Hascall V. C.: Cell surface Heparan Sulfate Proteoglycans. J. Biol. Chem. 1992; 267: 9451-4
4. Small, D. H, Mok, S. S, Williamson, T G, Nurcombe. V: role of proteoglycans in neural development and regeneration, and the again brain. J, Neurochem. 1996; 67: 889-899
5. สิริชัย พุกกะพันธุ์. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเฮพาราณ ซัลเฟต โปรติโอไกลัยแคนที่แยกได้จากตับของมนุษย์. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2546:1-4
6. Ishihara, M.: Biosynthesis, Structure, and Biological Activity of Basic FGF Binding Domain of Heparan Sulfate., Trends in Glycosci. Glycotech. 1993;5:343-5
7. Vongchan P, Warda M, Toyoda T, Mark RM and Linhardt RJ. Structure characterization of humanliver heparan sulfate. Bipchim et Biophys Acta. 2005;1721:1-8
8. โกวิท พัฒนาศัญญาสัตย์. โพลไซโทเมทรี. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 2539

ภาคผนวก

1. 10X Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (ปริมาตร 4 L)

NaCl	320.0	gm
KCL	8.0	gm
KH ₂ PO ₄	8.0	gm
Na ₂ HPO ₄	5.75	gm

ละลายสารต่างๆ ในน้ำกลั่นประมาณ 1,000 ml จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH แล้วเติม Distilled water ให้ครบ 4L

2. 1X Phosphate buffer saline (PBS) (ปริมาตร 500 ml)

10X (PBS) pH 7.2	50	mL
Distilled water	450	mL

3. 1N HCl (ปริมาตร 110 ml)

12N HCl	10	mL
Distilled water	110	mL

เติม Concentrate HCl 10 mL ลงใน Distilled water 110 mL ผสมให้เข้ากัน

4. 1N NaOH (ปริมาตร 100 ml)

NaOH	4.0	gm
Distilled water	100	mL

ละลาย NaOH ใน Distilled water ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL

5. 70% Alcohol (ปริมาตร 3L)

95% Alcohol	2,948	mL
Distilled water	1,052	mL

เติม Distilled water ลงใน 95% Alcohol แล้วผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 3 L

6. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ปริมาตร 1 L)

DMEM	1	saccher
NaHCO ₃	3.7	gm
Fungizone (5 mg/mL)	0.5	mL
Gentamicin (40 mg/mL)	1.0	mL

ละลาย DMEM ใน Distilled water 600 mL จากนั้นเติม NaHCO₃ ผสมให้เข้ากันตามด้วย Fungizone และ Gentamicin ลงไปตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 10% Acetic acid ปรับปริมาตรด้วย Distilled water ให้ครบ 1L นำไปกรองด้วย millipore 0.22 micron แบ่งใส่ขวดขวดละ 500 mL ใน laminar airflow และขวดทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ 0.5 mL เพื่อตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในตู้บ 37 °C, 5% CO₂ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% นาน 3 วันสำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ที่ 4°C

7. SDMEM (ปริมาตร 1L)

DMEM	1000	mL
OPI Supplement medium	1	vial

หลังจากเตรียม DMEM แล้วนำ OPI supplement medium มาละลายกลับด้วย DMEM ใน laminar airflow แล้วนำไปผสมกับ DMEM ในขวดเดิมจนหมด ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวดขวดละ 500 mL และขวดทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ 0.5 mL เพื่อตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในตู้บ 37 °C, 5% CO₂ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ที่ 4°C

8. CSDMEM (ปริมาตร 100 mL)

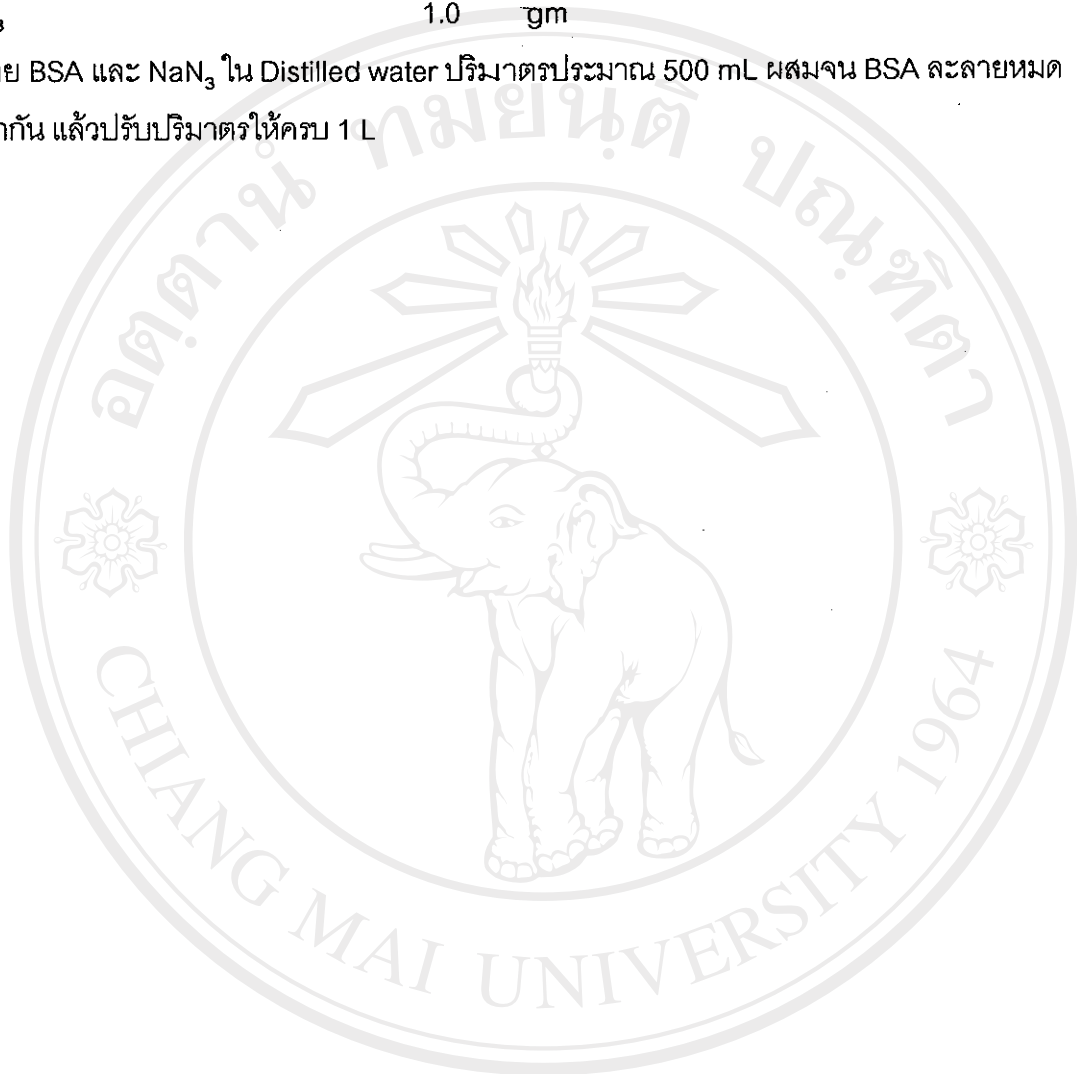
SDMEM	90	mL
Fetal calf serum	10	mL

นำ Fetal calf serum 10 mL ใส่ใน SDMEM 90 mL ใน laminar airflow ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ขวดทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ 0.5 mL เพื่อตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในตู้บ 37 °C, 5% CO₂ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ที่ 4°C

10. 1% BSA-PBS-Azide (ปริมาตร 1 L)

1X PBS	1.0	L
BSA	10	gm
NaN ₃	1.0	gm

ละลาย BSA และ NaN₃ ใน Distilled water ปริมาตรประมาณ 500 mL ผสมจน BSA ละลายหมด
ให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 L



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประวัติการศึกษาและประสบการณ์
Preeyanat Vongchan

Date of Birth April 15, 1958

Work address Department of Clinical Immunology
Faculty of Associated Medical Sciences
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Telephone 053-945080 Ext 17

Title Assistant Professor

Education

B.Sc. (Medical Technology) 1979,
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University
MS (Medical Technology) 1995,
Faculty of Associated Medical Sciences Chiang Mai University
Ph.D (Biochemistry) 2002,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Research experience

Visiting researcher at College of Pharmacy, the University of Iowa, Iowa, USA. Scholar provided by Professor Robert J. Linhardt. July 2002-January 2003.

Title: Isolation, Purification and Characterization of HSPG from human liver.

Field of interest

Blood banking: Platelet immunology and clinical laboratory investigation, Cord blood banking: Stem cell farming

Biochemistry: Heparin sulfate proteoglycan isolated from human liver: Distribution and characteristics, Production of monoclonal antibodies specific to HSPG.

Research in progress

1. Characterization of monoclonal antibodies specific to human liver heparan sulfate proteoglycans: The development of reagent kit for diagnosis of liver damage and the study of inhibition effects on tumor implantation and metastasis”
ทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2549 ต่อเนื่อง 3 ปี (2549-2551)
2. Expression of human liver HSPG on myeloid leukemic cells
ทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะเทคนิคการแพทย์ ประจำปีงบประมาณ 2549
3. Differentiation of myeloid leukemia by anti-human liver HSPG
ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการสนับสนุนการวิจัย โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2548
4. Production of anti-human globulin (polyspecific) for blood banking use
ทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการสนับสนุนการวิจัย โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2547
5. Detection of anti-platelet antibodies in patients multiple transfusion and multiparous women by indirect ELISA.

Publications

1. Pomprasert S, Vongchan P, Apichartpiyakul A and Dechtrirat S. Production of a monoclonal antibody against a yeast secreted antigen of *Penicillium marneffeii*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36(4):966-9.
2. Vongchan P. Expression of human liver HSPG on hematopoietic cancer cells. J Med Tech Assoc Thailand 2005; 33(2): 1065-1973.
3. Vongchan P. Production of anti-complement antibody for development of anti-human globulin serum for blood banking use. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38(3): 185-192
4. Vongchan P, Warda M, Toyoda H, Toiča T, Marks RM and Linhardt RJ. Structural Characterization of Human Liver Heparan Sulfate. Biochim Biophys Acta 2005; 1721:1-8
5. Vongchan P. Production of anti-thrombocyte antibodies for the detection of anti-platelet antibodies by SPRCA technique. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38(2): 102-110.

6. *Vongchan P.* Production of Monoclonal Antibodies Specific to Heparan Sulfate Proteoglycans Isolated from Human Liver, 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology , Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai, April 26 - 30 2004.
7. *Vongchan P.* Isolation and Purification of Human Heparin Sulfate Proteoglycan and Preliminary Studies of Its Characteristics, 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology, Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chiang Mai , April 26–30, 2004.
8. *Vongchan P.* Interaction of MIP-2 and Heparin immobilized BSA Studied by Indirect ELISA, AMS Annual Conference. January 20-22, 2004
9. *Vongchan, P.* Robert J Linhardt. Isolation and Purification of Heparan Sulfate Proteoglycan from Human Liver and Preliminary Study of its Characteristics. Poster presentation in The 2nd Asia pacific Organization of Cancer Prevention (APOCP) Kosa Hotel, Khonkaen, February 9-11, 2004
10. *Vongchan, P., Sajomsang W., Kasinrerak, W. Subyen D. and Kongtawelert, P.* Anticoagulant Activities of the Chitosan Polysulfate Synthesized from Marine Crab Shell by Semi-heterogeneous Conditions. *Science Asia* 2003; 29(2):115-120
11. *Vongchan, P., Kasinrerak, W. and Kongtawelert, P.* Chitosan polysulfate synthesized from marine crab shells inhibited PPD stimulated human PBMC proliferation. *Chiang Mai Medical Bulletin* 2002; 41(4):179-188
12. *Vongchan, P., Sajomsang, W., Subyen, D. and Kongtawelert, P.* Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. *Carbohydrate Research* 2002; 337: 1239-1242
13. Synthesis and Anticoagulant effect of Chitosan Polysulfate. Oral presentation in the 27th Congress on Science and Technology of Thailand. 16-18 October 2001, Lee garden Plaza Hotel, Hat Yai, Songkla, Thailand.
14. Structure and Anticoagulant Activity of Chemically Modified Chitosan derived from the Shell of Rice-Field Crab (*S. dugusti*). Oral presentation in 5th Asia pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition. 13-15 March, 2002. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.
15. *Vongchan P. and Fongmoon D.* Detection of Platelet Antibodies by Platelet Suspension Immunofluorescent Technique. *Thai Journal of Hematology and Transfusion Medicine.* 2001; 11 (2): 73-84.

16. Haslett PAJ., Klausner JD., Makonkawkeyoon S., Moreira A., Metatratip P., Boyle B., Kunachiwa W., Maneeakam N., *Vongchan P.* Corral LG., Elbeik T, Shen Z and Kaplan G. Thalidomide Stimulates T Cell Response and Interleukin 12 Production in HIV-1 Infected patients. AIDS RES HUM RETROVIRUSES. 1999;15(13):1169-1179.
17. Dettrairat S., *Vongchan P.*, Chomsook S., Yodsawat J. and Duangdee C. Preparation of Polyclonal and Monoclonal Antibodies Against HIV p24 Antigen and Development of Immunoassay for HIV p24 Antigen. Chiang Mai Medical Bulletin. 1999;38(suppl):83.
18. *Vongchan P.* Production of a Monoclonal Antibody Specific to GPIIb/IIIa Derived from Normal Human Platelets. -Poster presentation in 2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA). Bangkok. January 23-25,2000 - Poster presentation in the Symposium in Biochemistry , 30th Anniversary of the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai. October, 13-15,1999
19. Fongmoon D. and *Vongchan P.* Detection of Anti-Platelets in Pregnancy by PSIFT. Poster presentation in the Symposium in Biochemistry, 30th Anniversary of the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai. October, 13-15,1999