

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสและเมทาเฟสด้วย เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

จรีพร คำพันธ์¹ รักวรรณ ตีโนนโพธิ์^{2*}

Received : April 13, 2020

Revised : April 25, 2020

Accepted : April 28, 2020

บทคัดย่อ

ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมที่มีขนาดเล็กกว่าระดับสายตามองเห็นจากวิธีการย้อมแถบสีบนโครโมโซม รวมถึงตรวจหาการพิวชันยีนในมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยตรวจได้ทั้งในเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสและเมทาเฟสจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันในการตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมเช่น กลุ่มอาการดัจอร์จ (การหลุดหายของโครโมโซมตำแหน่ง 22q11) มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (t(9; 22) (q34;q11.2)) และกลุ่มอาการพาหู (การมีโครโมโซมที่ 13 เกินมา) การเตรียมเซลล์ใช้ไขกระดูกและเลือดของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การเตรียมเซลล์ในระยะเมทาเฟส ทำได้โดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง ส่วนการเตรียมเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสไม่ต้องทำการเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำให้เซลล์บวมคงตัวและหยดลงบนสไลด์ แล้วนำไปย้อมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน ใช้เซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส ส่วนการตรวจหาการเกิดพิวชันของยีน BCR/ABL เนื่องมาจาก t(9;22)(q34;q11.2) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง ใช้เซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส ดังนั้นการใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน โดยใช้เซลล์ระยะอินเตอร์เฟส เหมาะกับการใช้ในงานดูพิวชันยีนในมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อออกผลเป็นร้อยละหรือการวินิจฉัยในกรณีเร่งด่วน ส่วนเซลล์ระยะเมทาเฟสใช้เวลารอคอยผลนานกว่า เหมาะสมในการวินิจฉัยความผิดปกติที่ต้องการเห็นรูปร่างโครโมโซมด้วย ทั้งนี้ การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันในปัจจุบัน สามารถใช้เซลล์ได้ทั้งจากระยะอินเตอร์เฟสและเมทาเฟส

คำสำคัญ: เซลล์ระยะอินเตอร์เฟส เซลล์ระยะเมทาเฟส เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

¹นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

อีเมล: jurkam@kku.ac.th

²อาจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น อีเมล: raksde@kku.ac.th

*ผู้รับผิดชอบหลัก อีเมล: raksde@kku.ac.th

ANALYSIS OF CHROMOSOME ABERRATION IN INTERPHASE AND METAPHASE CELLS USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION TECHNIQUE

Jureporn Kampan¹ Raksawan Deenonpoe^{2*}

Abstract

Fluorescent in situ hybridization technique (FISH) is developed to detect chromosomal abnormalities that are not observed by chromosome banding techniques such as microdeletion, microduplication, chromosome aneuploidy and also used to detect the fusion gene in leukemia. either in metaphase or interphase cells. The objective of this study is to apply FISH technique to detect chromosome aberrations in patients with genetic disease using both interphase and metaphases phases. DiGeorge syndrome (22q11 microdeletion), chronic leukemia (t(9; 22) (q34;q11.2)) and Patau's syndrome (trisomy 13) were used as case study to perform. Patient bone marrow or blood specimens were collected from Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University. The interphase and metaphase cells were prepared from bone marrow or blood by with and without cell culture at 37 °C for 72 hours, respectively. The interphase cells were used to detect BCR / ABL fusion gene due to t(9; 22) (q34;q11.2) using dual color dual fusion translocation probe and Patau's syndrome with trisomy 13 in using Vysis LSI 13 RB1 (13q14) probe respectively. The metaphase cells were used to detect microdeletion at 22q11 using amplification-deletion probe in DiGeorge syndrome patient. The achieve results were shown in this study. This demonstrated that the interphase cells without cell culture can be used to perform genetic testing. Especially, it is suitable for urgent diagnosis and monitor percentage of fusion gene in chronic leukemia patients. Whereas, the architecture of all chromosomes was demonstrated in the metaphase. In conclusion, FISH technique using interphase or metaphase cells as specimens can be used in a routine genetic testing of chromosomal abnormalities.

Keywords: Interphase, Metaphase, Fluorescent in situ hybridization technique

¹ Scientist, Professional Level, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon kaen University, Khon kaen, e-mail: jurkam@kku.ac.th

² Lecturer, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon kaen University, Khon kaen, e-mail: raksde@kku.ac.th

*Corresponding author, e-mail: raksde@kku.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันถึงแม้ว่าเทคนิคการย้อมแถบสีบนโครโมโซม (Banding technique) เป็นวิธีพื้นฐานสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์โครโมโซมทั้งการวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมในทารกก่อนคลอด (Prenatal diagnosis) และความผิดปกติของโครโมโซมหลังคลอด (Postnatal diagnosis) รวมถึงความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยมะเร็ง แต่ด้วยข้อจำกัดด้านความละเอียดของโครโมโซม ทำให้ไม่สามารถเห็นความผิดปกติบางอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าระดับสายตามองเห็นจากวิธีการย้อมดังกล่าวได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์อื่นๆ ร่วมด้วย เช่น คิว เอฟ พีซีอาร์ (QF-PCR) และฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน (Fluorescence in situ hybridization; FISH) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาครั้งแรกในปี 1969 (Gall and Pardue, 1969) และนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน โดยเทคนิคนี้เป็นการนำส่วนของ ดีเอ็นเอบริเวณที่เราสนใจศึกษา (DNA sequence) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ เรียกว่าดีเอ็นเอติดตาม (Probe) แล้วนำไปจับกับโครโมโซมตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง (Hybridization) เพื่อตรวจสอบหาส่วนของโครโมโซมที่ผิดปกติเป็นส่วนที่เราสงสัยหรือไม่ แทนการย้อมด้วยสีจีเอ็มม่า (G-banding) (Wolff et al., 2007; Yang et al., 2015) ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน เป็นเทคนิคพิเศษที่ใช้ในการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมได้แก่ 1) การขาดหายและเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (Microdeletion and microduplication) ส่วนใหญ่พบตั้งแต่กำเนิด ซึ่งการขาดหายไปบางส่วนของสารพันธุกรรมบนโครโมโซม ทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆในผู้ป่วย เช่น DiGeorge syndrome (del22q11.2) Prader-Willi syndrome/Angelman (del15q13.3) และ Williams syndrome (del7q11.23) เป็นต้น หรือการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก (Microduplication) เช่น Autism/MR (dup15q11-13) เป็นต้น 2) ภาวะมีจำนวนโครโมโซมผิดปกติแบบไม่เป็นชุด (Aneuploidy) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีโครโมโซมเกินไป 1 แท่ง (Trisomy) เช่น การเพิ่มจำนวนของแท่งโครโมโซม 13,18,21 (Trisomy 13,18,21) นอกจากนี้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันสามารถตรวจหาการรวมกัน (Fusion) ของยีนที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม (Translocation) ได้แก่ การรวมกันของยีน BCR/ABL ที่เกิดจาก t(9;22)(q34;q11) และการรวมกันของยีน PML/RARA ที่เกิดจาก t(15;17)(q24;q21) ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเรื้อรังและเฉียบพลันได้ ตามลำดับ การวินิจฉัยโครโมโซมโดย เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันนั้น สามารถตรวจได้จากตัวอย่างเลือด น้ำคร่ำ และไขกระดูก โดยสามารถศึกษาได้ทั้งเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส (Interphase) และระยะเมทาเฟส (Metaphase) (Wolff et al., 2007) แต่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแตกต่างกันไป และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์หรือจำนวนของเซลล์ปกติและผิดปกติได้ โดยการศึกษาในระยะอินเตอร์เฟสนั้นสามารถทราบผลการวินิจฉัยได้รวดเร็วกว่าในระยะเมทาเฟส เนื่องจากในระยะอินเตอร์เฟส สามารถเตรียมเซลล์ได้เลยโดยไม่ต้องเลี้ยงเซลล์ ช่วยลดระยะเวลาการรอคอยผล (Turn around time) ซึ่งช่วยในการตัดสินใจของแพทย์ที่ต้องทำการรักษาอย่างเร่งด่วนได้ทันที่ (Philip et al., 1994) และยังช่วยแก้ปัญหาการวิเคราะห์โครโมโซมในกรณีที่โครโมโซมระยะเมทาเฟส มีจำนวนไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย หรือคุณภาพของโครโมโซมไม่ดีพอที่จะทำการวิเคราะห์ความผิดปกติด้วยเทคนิคย้อมแถบสีบนโครโมโซม และยังใช้ในการช่วยติดตามการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีโครโมโซมที่ผิดปกติได้ (Bishop, 2010; Wolff et al., 2007) ซึ่งในปัจจุบันหน่วยเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เปิดให้บริการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากเลือดในผู้ป่วยที่สงสัยความผิดปกติในโรคที่

เกี่ยวกับการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงเซลล์ให้ได้โครโมโซมในระยะเมทาเฟส และยังให้บริการตรวจหาความผิดปกติของการรวมกันของยีนที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม (Translocation) ในระยะอินเทอร์เฟสจากเลือดและไขกระดูกในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวและในผู้ป่วยที่มีจำนวนโครโมโซมเกินมาในบางคู่ เช่น คู่ที่ 13, 18 และ 21 ซึ่งเซลล์ทั้งสองระยะนั้นจะมีวิธีการเตรียมเซลล์และข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ดังจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. บ่งชี้วิธีการเตรียมเซลล์ที่ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคการตรวจฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน ทั้งในระยะอินเทอร์เฟสและเมทาเฟส
2. ประยุกต์ใช้เซลล์ในระยะอินเทอร์เฟสและเมทาเฟส ในเทคนิคการตรวจฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

ส่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้แก่ เลือดและไขกระดูก จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเตรียมเซลล์ในระยะอินเทอร์เฟส (Interphase)

นำตัวอย่างส่งตรวจได้แก่ เลือดหรือไขกระดูก 8-10 หยดจากหลอดปราศจากเชื้อที่มี Heparin มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 4 มิลลิลิตร ซึ่งมียาปฏิชีวนะ 1 % Penicillin-streptomycin และ fetal bovine serum 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแล้วดูดน้ำส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนเซลล์ ทำการปั่นล้างด้วยสารละลาย 1X Hank balance salt solution 2 รอบ จากนั้นทำให้เซลล์บวมโดยการเติม KCl ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และทำให้เซลล์คงตัวโดยใช้สารละลาย Fixative (3:1 Ethanol: Acetic acid) แล้วหยดเซลล์ลงบนสไลด์ อบสไลด์ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำสไลด์ไปย้อมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

การเตรียมเซลล์ในระยะเมทาเฟส (Metaphase)

นำตัวอย่างส่งตรวจได้แก่เลือด 4-6 หยด จากหลอดปราศจากเชื้อที่มี Heparin มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิโมโฟไซค์ เตรียมโดยนำ RPMI 1640 ซึ่งมียาปฏิชีวนะ 1 % Penicillin-streptomycin ผสมอยู่ ปริมาตร 4 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติม Fetal bovine serum 1 มิลลิลิตร และ Phytohemagglutinin (PHA) 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าเบาๆ ให้ผสมกันแล้วนำไปเก็บบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวโครโมโซม โดยทำการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์โดยการเติม Colcemid ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เซลล์บวมโดยการเติม KCl ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และทำให้เซลล์

คงตัวโดยใช้สารละลาย Fixative (3:1 Ethanol: Acetic acid) แล้วหยดเซลล์ลงบนสไลด์ ออบสไลด์ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง นำสไลด์ไปย้อมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

การเตรียมสไลด์ก่อนการไฮบริไดเซชัน (Pretreatment slide)

นำสไลด์มาที่ทำเครื่องหมายระบุบริเวณที่หยดเซลล์แช่ลงใน Coupling jar มีสารละลาย 2XSSC ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำสไลด์ขึ้นมาตากไว้ประมาณ 30 วินาที หลังจากนั้นเตรียม RNase 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ใน 2XSSC ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วหยดสารละลายดังกล่าว ลงบนสไลด์แล้วปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม วางลงในเครื่อง ThermoBrite ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์มาแช่ในสารละลาย 2X SSC ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยแช่ซ้ำ 3 ครั้ง

จากนั้นเตรียมสารละลาย Pepsin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงใน Coupling jar ที่บรรจุน้ำกลั่น 49.5 มิลลิลิตรและ 1N HCl 0.5 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำแผ่นสไลด์ลงใน Coupling jar ดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลาย 1XPBS ใน Coupling jar ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเตรียมสารละลาย Fixative (1XPBS 47.5 มิลลิลิตร: MgCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 2.5 มิลลิลิตร: 37 % Formaldehyde 1.3 มิลลิลิตร) ลงใน Coupling jar และนำแผ่นสไลด์แช่ในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrated) โดยแช่สไลด์ใน แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70%, 80 % และ 95% อย่างละ 5 นาทีตามลำดับ แล้วตากสไลด์ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง

การไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

หยด DNA probe ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจ ในอัตราส่วน (1:7:4 Probe: Hybridization buffer: Distillate water) ลงบนสไลด์ในที่ห้องมืดหรือมีแสงสว่างน้อย ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และกาวยาง และบ่มในเครื่อง ThermoBrite ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง โดยใช้ LSI DiGeorge region probe (LSI TUPLE1 SpectrumOrange สารเรืองแสง SpO/LSI ARSA SpectrumGreen สารเรืองแสง FITC) (BCC MDX Co.,Ltd) ในการตรวจความผิดปกติของ DiGeorge syndrome และใช้ Vysis LSI 13 RB1 (13q14) (SpectrumOrange สารเรืองแสง SpO) probe (BCC MDX Co.,Ltd) สำหรับการหาความผิดปกติ Trisomy 13 นอกจากนี้ยังใช้ Vysis LSI BCR/ABL dual color dual fusion (สารเรืองแสง SpO และ FITC) translocation probe (BCC MDX Co.,Ltd) สำหรับการตรวจหาความผิดปกติของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML

การล้างสไลด์หลังการไฮบริไดเซชัน

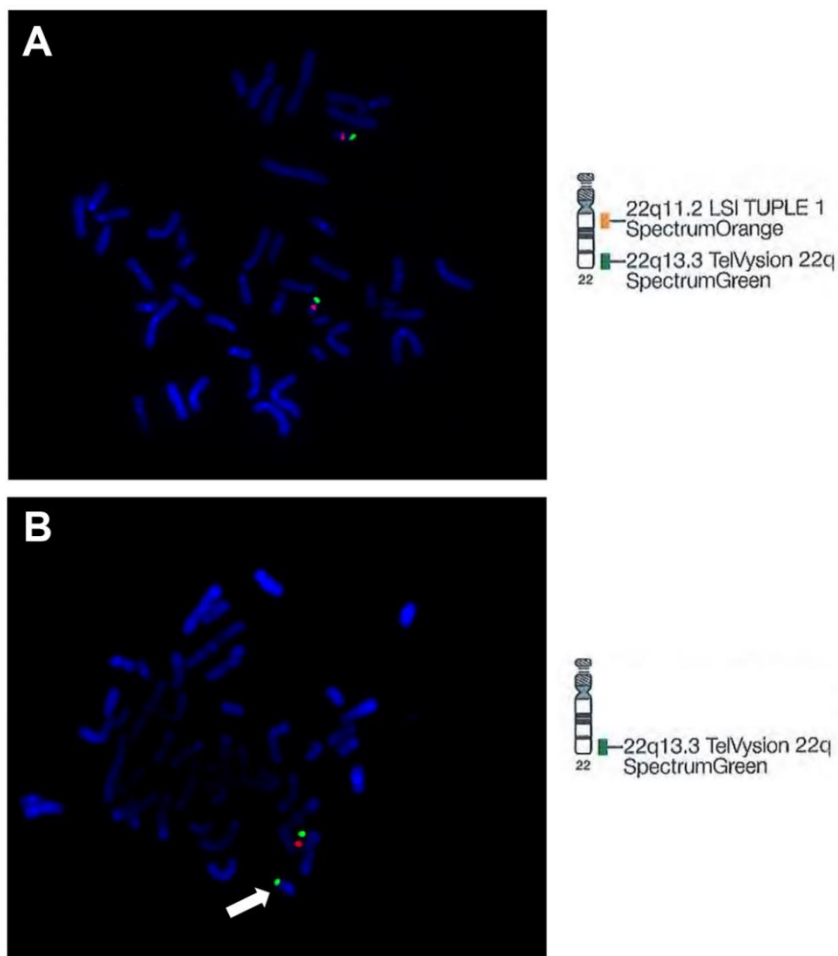
อุ่นสารละลาย Washing solution (0.4x ssc/0.3% Tween 20) ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส ล้างหน้า 30 นาทีในที่ห้องมืดหรือมีแสงสว่างน้อย หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ออกจากเครื่อง ThermoBrite และนำกาวยางและกระจกปิดสไลด์ออก แล้วนำไปแช่ใน Washing solution ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70%, 85 % และ 95%

อย่างละ 5 นาที ตามลำดับ และตากสไลด์ให้แห้ง จากนั้นหยด Counter stain solution 6 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกแก้วและทาน้ำยาทาเล็บที่ขอบกระจกแก้ว นำสไลด์เก็บในกล่องดำแล้วนำไปทำการวินิจฉัยใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และจะทำการรายงานผลตามมาตรฐาน An international system for human cytogenetic nomenclature 2016 (ISCN2016) (McGowan-Jordan et al., 2016)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติแบบมีการขาดหายไปของชิ้นส่วนของโครโมโซม (Microdeletion)

ตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากเซลล์ในระยะเมทาเฟสในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่สงสัยโรค DiGeorge syndrome ซึ่งมีความผิดปกติการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมตรงตำแหน่ง 22q11 ด้วย DNA probe ชนิด Locus specific probe ที่จำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 1



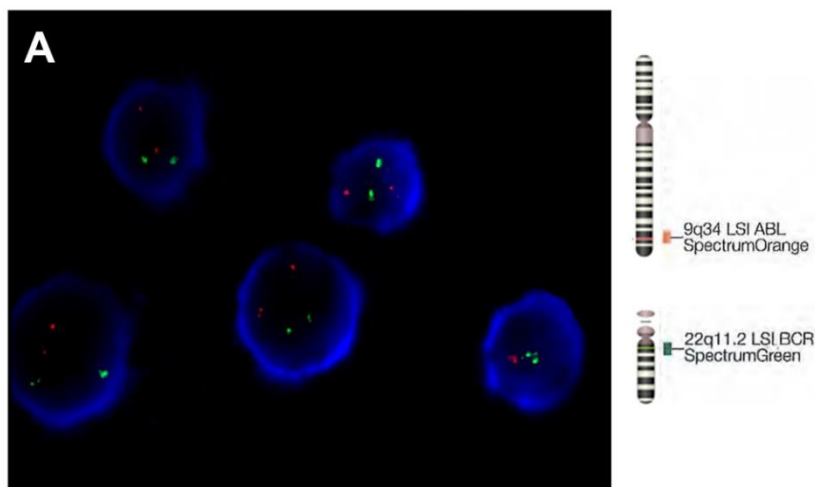
ภาพที่ 1 แสดงเซลล์ในระยะเมทาเฟสที่ย้อมด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ส่งตรวจหาความผิดปกติของโรค DiGeorge syndrome ซึ่งสีเขียวเป็น Marker ของโครโมโซมแท่งที่ 22 ตรงตำแหน่ง 22q13.3 ส่วนสีส้ม เป็น Marker ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ตำแหน่ง 22q11 (ที่มา: ห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

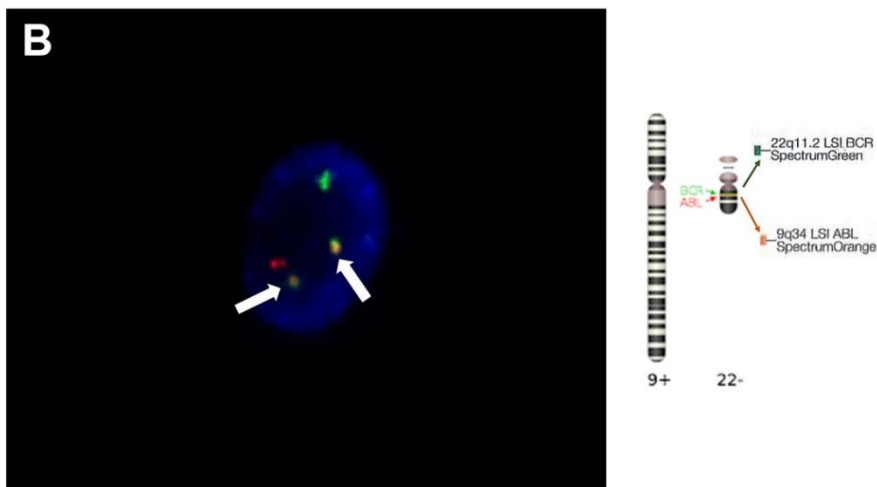
ภาพ 1A: แสดงผลโครโมโซมปกติ พบสีเขียว 2 จุดและสีส้ม 2 จุด แสดงว่าไม่พบการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมตรงตำแหน่ง 22q11

ภาพ 1B: แสดงผลโครโมโซมที่มีความผิดปกติ พบสีเขียว 2 จุด สีส้ม 1 จุด แสดงว่ามีการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมตรงตำแหน่ง 22q11

การตรวจหาความผิดปกติแบบมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม (Translocation) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว

ตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส ในเลือดและไขกระดูกผู้ป่วยที่สงสัยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือใช้เพื่อติดตามผลการรักษา ด้วยตัวติดตามดีเอ็นเอชนิด fusion probe ยกตัวอย่างเช่น ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (AML) ใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอชนิด PML/RARA dual color dual fusion probe ที่ใช้ระบุความผิดปกติของโครโมโซมแบบ t(15;17)(q24;q21.1) หรือในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (CML) ใช้ตัวติดตามดีเอ็นเอชนิด BCR/ABL dual color dual fusion probe ที่ใช้ระบุความผิดปกติของโครโมโซมแบบ t(9;22)(q34;q11.2) ดังแสดงในภาพที่ 2





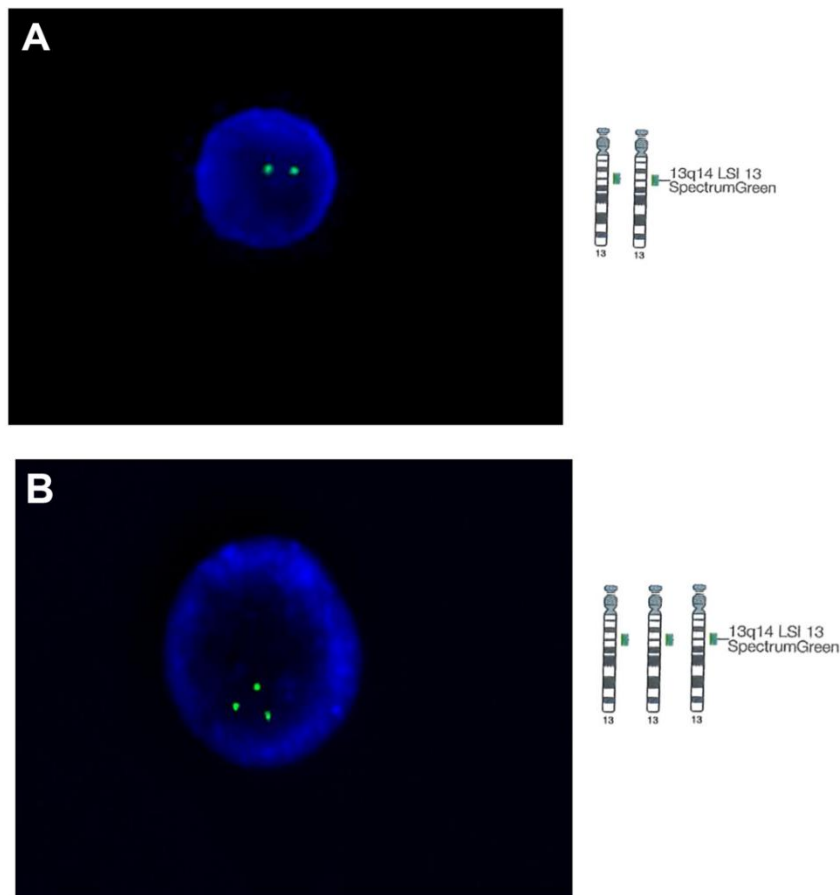
ภาพที่ 2 แสดงเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสที่ย้อมด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากตัวอย่างเลือดหรือไขกระดูกผู้ป่วยที่สงสัยผู้มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด CML โดยจะพบความการเกิด BCR/ABL fusion gene เนื่องมาจากมีความผิดปกติของโครโมโซมแบบ t(9;22)(q34;q11.2) ซึ่งสีส้มเป็น Marker ของโครโมโซมแท่งที่ 9 ตรงตำแหน่ง 9q34 ที่มี ABL gene ส่วนสีเขียว เป็น Marker ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ตำแหน่ง 22q11.2 มี BCR gene (ที่มา: ห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

ภาพ 2A: แสดงผลโครโมโซมปกติ พบสีส้ม 2 จุดและสีเขียว 2 จุด แสดงถึงการไม่มี BCR/ABL fusion gene

ภาพ 2B: แสดงผลโครโมโซมที่มีความผิดปกติ พบ สีส้ม 1 จุด สีเขียว 1 จุด และ สีเหลือง 2 จุด ซึ่งจุดสีเหลืองบ่งชี้ถึงการมี BCR/ABL fusion gene

การตรวจหาความผิดปกติแบบมีจำนวนโครโมโซมเกินไป 1 แท่ง (Trisomy)

ตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีจำนวนโครโมโซมเกิน เช่น โครโมโซมคู่ที่ 13 ,18 และ 21 ด้วยตัวติดตามดีเอ็นเอชนิด Amplification-deletion probe ที่จำเพาะต่อโครโมโซมคู่ นั้น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสที่ย้อมด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ส่งตรวจหาความผิดปกติแบบมีจำนวนโครโมโซมเกินไป 1 แห่งของโครโมโซมคู่ที่ 13 (ที่มา: ห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

ภาพ 3A: แสดงผลโครโมโซมปกติ พบสีเขียว 2 จุด

ภาพ 3B: แสดงผลโครโมโซมที่มีความผิดปกติ พบสีเขียว 3 จุด แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมคู่ที่ 13 เกินมา 1 แห่ง (Trisomy 13)

การย้อมสไลด์ด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันสามารถเตรียมเซลล์ได้ทั้งระยะอินเตอร์เฟส และระยะเมทาเฟส ซึ่งแต่ละระยะนั้นมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดตัวอย่างส่งตรวจ ชนิดตัวติดตามดีเอ็นเอ (Probe) และลักษณะของการตรวจวินิจฉัย พบว่าการเตรียมเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสนั้น ใช้เวลาสั้นกว่าระยะเมทาเฟสเนื่องจากไม่ต้องเลี้ยงเซลล์ ทำให้ระยะการรอคอยผลการวินิจฉัยสั้นกว่าซึ่งช่วยในการตัดสินใจของแพทย์ที่ต้องทำการรักษาอย่างเร่งด่วนได้ทันทั่วทั้ง สอดคล้องกับรายงานของ Dascalescu et al. (1999) ซึ่งได้ทำการศึกษาเพื่อตรวจหาเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิด Multiple myeloma พบว่า การเตรียมเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส และย้อมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน

เป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยที่จะทำการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูก นอกจากนี้สิ่งที่สำคัญอีกอย่าง เนื่องจากไม่มีการเลี้ยงเซลล์จึงทำให้ลดการปนเปื้อน (Contaminate) ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนอาจจะส่งผลให้การเลี้ยงเซลล์ล้มเหลวและไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยได้ (Dascalescu et al., 1999) ทั้งนี้ในกรณีใช้เพื่อติดตามผลการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง พบว่าการเพาะเลี้ยงโครโมโซมให้ได้เซลล์ระยะเมทาเฟสจากไขกระดูกผู้ป่วยมะเร็งนั้น ทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากการได้รับยาเคมีบำบัด อาจมีผลรบกวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงนิยมเตรียมเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟสสำหรับเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน (Agis et al., 2006) ซึ่งการตรวจ BCR/ABL หรือ PML/RARA fusion gene โดยเทคนิค FISH สามารถ บอกเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ปกติและจำนวนเซลล์มะเร็งที่มียีนผิดปกติ ช่วยแก้ปัญหาใน บางครั้งที่เกิดการวิเคราะห์โครโมโซมโดยวิธีการย้อมสีแถบโครโมโซมได้ผล เนื่องจากโครโมโซมระยะเมทาเฟส มีจำนวนไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย หรือคุณภาพของโครโมโซมไม่ดีพอที่จะวิเคราะห์ได้ในขณะเดียวกันการศึกษาของ Yang et al. (2015) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมก่อนคลอดจากน้ำคร่ำโดยใช้เทคนิคเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน กับวิธีการย้อมแถบสีบนโครโมโซม (G-banding) พบว่าการตรวจหาจำนวนโครโมโซมเกินมา 1 แท่ง (Trisomy) ในโครโมโซมบางคู่ เช่น คู่ที่ 13, 18 และ 21 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันเป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และสามารถลดภาระงาน (Workload) เมื่อการเลี้ยงเซลล์น้ำคร่ำล้มเหลว (Yang et al., 2016) นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายสำหรับการเตรียมเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส ยังน้อยกว่าระยะเมทาเฟสเพราะสามารถเตรียมเซลล์ได้เลยหลังจากได้รับสิ่งส่งตรวจโดยไม่ต้องเลี้ยงเซลล์ การตรวจหาจำนวนโครโมโซมเกินมา 1 แท่ง ในบางคู่รวมถึงโครโมโซมเพศจากเซลล์บุเนื้อเยื่อรก (Chorionic villi) โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันนั้นใช้เวลาไม่นาน ราคาไม่แพง มีความแม่นยำ และมีความไวสูง (Sensitivity) (Jalal & Law, 1997; Philip et al., 1994) แต่ข้อจำกัดของเซลล์ระยะอินเตอร์เฟส คือไม่สามารถเห็นตำแหน่งของสัญญาณที่บ่งชี้ความผิดปกติบนโครโมโซมแท่งนั้นๆได้ เนื่องจากไม่สามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซม ซึ่งจะเห็นเฉพาะจุดสัญญาณติดตามดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อโรคที่สนใจเท่านั้น การเตรียมเซลล์ในระยะ อินเตอร์เฟส จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นไขกระดูกในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะได้ปริมาณเซลล์มาก ส่วนการเตรียมเซลล์จากเลือดจะได้ปริมาณเซลล์น้อยและขนาดเล็กกว่าไขกระดูกเนื่องจาก ไม่ได้ถูกกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ดังนั้นการเตรียมเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสจากตัวอย่างเลือดอาจจะทำให้ใช้ระยะเวลานานและยากในการแปลผลได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์มากกว่าเซลล์ที่เตรียมจากไขกระดูก

ส่วนการเตรียมเซลล์ในระยะเมทาเฟสสำหรับย้อมด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน ทำให้พื้นหลังของสไลด์มีสิ่งรบกวน (Artifact) น้อย และเห็นรูปร่างของโครโมโซมชัดเจน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการเลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย ส่งผลให้เห็นสัญญาณติดตามที่ตำแหน่งจำเพาะบนโครโมโซมที่สนใจ ทำให้วินิจฉัยได้ง่าย ซึ่งนิยมใช้ในการวินิจฉัยความผิดปกติแบบมีการขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (Microdeletion) และกรณีดูความผิดปกติแบบ Translocation ก็สามารถยืนยันได้ว่าการย้ายของชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซมคู่หนึ่งๆจริง การเตรียมเซลล์ในระยะเมทาเฟสยังถูกนำมาใช้มากใน การวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค Spectral karyotype (SKY) และ Multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) สามารถวิเคราะห์โครโมโซมด้วยการกำหนดสีบนแท่งโครโมโซมและในระดับแถบย่อยบนแท่งโครโมโซม (Nguyen & Reijo Pera, 2008)

ส่วนข้อจำกัดของเซลล์ในระยะเมทาเฟสคือต้องมีการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่เตรียมสำหรับวิธีการย้อมแถบสีบนโครโมโซม (G-banding) ซึ่งทำให้มีระยะเวลาในการรอคอยผลนานกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชันในระยะอินเตอร์เฟส อีกทั้งการเลี้ยงเซลล์ต้องทำในสภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งต้อง

อาศัยความชำนาญและทักษะของผู้ปฏิบัติงาน หากเกิดการปนเปื้อนจะทำให้ไม่สามารถย้อมฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริโดเซชันต่อได้ นอกจากนี้เนื่องจากต้องมีการเลี้ยงเซลล์ จึงทำให้ราคาต้นทุนสูงกว่าในระยะอินเตอร์เฟสได้

สรุป

การย้อมสไลด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์อินซิติวไฮบริโดเซชันสามารถประยุกต์ใช้ทั้งในเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสและเมทาเฟส ซึ่งการเตรียมเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสสามารถทำได้โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยง ทำให้ระยะเวลาการรอคอยผลสั้นกว่าและใช้ต้นทุนน้อยกว่าระยะเมทาเฟส ลดการปนเปื้อนและการล้มเหลวในการเตรียมเซลล์จากการเพาะเลี้ยง สามารถรายงานผลเป็นร้อยละความผิดปกติในผู้ป่วยมะเร็ง เหมาะกับการใช้ในงานวินิจฉัยในกรณีเร่งด่วนเช่น การวินิจฉัยความผิดปกติของการมีโครโมโซมเกินไป 1 แท่ง (Trisomy) ของทารกในครรภ์อายุครรภ์มากและการดู Fusion gene ในมะเร็งชนิดต่างๆ ส่วนเซลล์ระยะเมทาเฟสต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ใช้เวลารอคอยผลนานกว่าระยะอินเตอร์เฟส ซึ่งหากการเพาะเลี้ยงเซลล์ล้มเหลวจากการปนเปื้อนอาจจะทำให้ไม่สามารถทำการวินิจฉัยได้ แต่เหมาะสมในการวินิจฉัยความผิดปกติที่ต้องการรูปร่างของโครโมโซม เช่น การขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม (Microdeletion) และกรณีดูความผิดปกติแบบ Translocation ก็สามารถยืนยันได้ว่าการย้ายของชิ้นส่วนระหว่างโครโมโซมคู่หนึ่ง ๆ จริง ทั้งนี้การเลือกเตรียมโครโมโซมในระยะอินเตอร์เฟสหรือเมทาเฟสนั้นควรพิจารณาจากลักษณะงานที่ใช้วินิจฉัย ชนิดของสิ่งส่งตรวจ ชนิดของ Probe และข้อจำกัดต่างๆ เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมนั้นมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพดี

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากงานวิจัยเป็นเชิงพรรณนา อาจต้องมีการเพิ่มเติมการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนาในรูปแบบกราฟหรือแผนภูมิให้เห็นภาพรวมจำนวนเคสทั้งหมด ส่วนข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยครั้งต่อไป เพิ่มเติมการศึกษาโดยใช้สถิติเชิงอนุมาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณงานบริการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ ห้องวิจัย สารเคมีและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Agis, H., Jaeger, E., Doninger, B., Sillaber, C., Marosi, C., Drach, J., & Oehler, L. (2006). In vivo effects of imatinib mesylate on human haematopoietic progenitor cells. *Eur J Clin Invest*, 36(6), 402-408. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01645.x
- Bishop, R. (2010). Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberration of medical significance. *Bioscience Horizons*, 3, 11.

- Dascalescu, C. M., Callanan, M., Chauvet, M., Le Baccon, P., Pegourie-Bandelier, B., Garban, F., & Leroux, D. (1999). Interphase FISH: a rapid method for detecting malignant plasma cells in multiple myeloma patients submitted to autologous transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 23(7), 687-694. doi:10.1038/sj.bmt.1701626
- Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 63(2), 378-383. doi:10.1073/pnas.63.2.378
- Jalal, S. M., & Law, M. E. (1997). Detection of newborn aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization. **Mayo Clin Proc**, 72(8), 705-710. doi:10.4065/72.8.705
- McGowan-Jordan, J., Simons, A., & Schmid, M. (2016). **ISCN 2016: an international system for human cytogenomic nomenclature** (2016) (Vol. 149). Switzerlans: Karger.
- Nguyen, H. N., & Reijo Pera, R. A. (2008). Metaphase spreads and spectral karyotyping of human embryonic stem cells. **CSH Protoc**, 2008, pdb prot5047. doi:10.1101/pdb.prot5047
- Philip, J., Bryndorf, T., & Christensen, B. (1994). Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Prenat Diagn**, 14(13), 1203-1215. doi:10.1002/pd.1970141306
- Wolff, D. J., Bagg, A., Cooley, L. D., Dewald, G. W., Hirsch, B. A., Jacky, P. B., & American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance, C. (2007). Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. **J Mol Diagn**, 9(2), 134-143. doi:10.2353/jmoldx.2007.060128
- Yang, W. X., Pan, H., Wang, S. T., Li, L., Wu, H. R., & Qi, Y. (2016). Detection of recurrent 4p16.3 microdeletion with 2p25.3 microduplication by multiplex ligation-dependent probe amplification and array comparative genomic hybridization in a fetus from a family with Wolf-Hirschhorn syndrome. **Taiwan J Obstet Gynecol**, 55(1), 104-108. doi:10.1016/j.tjog.2015.12.006
- Yang, Y., Liu, Y., Huang, N., & Xie, K. (2015). [Comparison of results of improved FISH and conventional karyotyping analysis of 2607 amniotic fluid samples]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, 32(6), 785-788. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.06.006