วิจารณ์ผลการทดลอง

ผู้ป่วยซึ่งแพทย์วินิจฉัยว่าเป็น chronic myeloid leukemia (CML) และส่งไขกระดูกหรือเลือดมาตรวจเพื่อหาความผิดปกติของโครโมโซมที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2536 ถึงปี พ.ศ.2540 จำนวนทั้งสิ้น 44 ตัวอย่าง นี้เป็นเพศหญิง 25 รายมากกว่าเพศชายที่มี 19 รายเล็กน้อย หรือเป็น 1.3 เท่า ซึ่งต่างจากตัวเลขที่พบในอุบัติการณ์ที่จะเพศชายจะเป็น 1.2 เท่าของเพศหญิง

Lin F. และคณะ (1994), Paldi-Haris P.[29] และ Foldi J.(1995) [30] รายงานว่าในผู้ป่วย CML ที่ได้รับการรักษาแล้วแต่อาจจะยังมีโครโมโซมฟิลาเดลเฟียหรือ ยีนลูกผสม bcr/abl เหลืออยู่ในปริมาณเล็กน้อยที่เรียกว่า minimal residual disease (MRD) นั้นสามารถใช้เลือดหรือไขกระดูกเพื่อตรวจหา MRD ได้ด้วยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ โดยมีความไว (sensitivity) พอๆ กัน เช่นเดียวกับรายงานนี้ที่สามารถใช้เลือดหรือไขกระดูกมาตรวจหาโครโมโซมฟิลาเดลเฟียโดยวิธีไซโตเจเนติคส์หรือตรวจหายีนลูกผสม bcr/abl ได้ผลเหมือนๆ กัน ตัวอย่างตรวจที่เป็นเลือดส่งมาถึง 30 ตัวอย่างมากกว่าไขกระดูกที่ส่งมาเพียง 14 ตัวอย่างถึง 2 เท่า ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากในกรณีที่ไม่สามารถเจาะไขกระดูกผู้ป่วยหรือเจาะได้น้อยไม่พอ สามารถส่งลือดตรวจแทนไขกระดูกได้และมีความไว(sensitivity) ในการตรวจเหมือนกัน ไม่จำเป็นต้องเจาะไขกระดูกซ้ำช่วยลดการต้องเจ็บตัวของผู้ป่วยโดยไม่จำเป็นได้

การตรวจพบยีนลูกผสม bcr/abl ทั้ง 2 แบบในผู้ป่วย CML นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าจะมีผลต่อการเกิดโรคหรือการดำเนินโรคอย่างไร ทั้งนี้เพราะมีรายงานที่ขัดแย้งกันอยู่ บางรายงานพบว่าถ้าพบยีนลูกผสม bcr/abl ที่มีขนาดสั้นกว่าผู้ป่วยจะอยู่ในระยะ chronic สั้นกว่าผู้ป่วยที่มียีนลูกผสม bcr/abl ชิ้นใหญ่กว่า แต่บางรายงานไม่พบว่ามีความแตกต่าง[14,15] ในรายงานนี้ตรวจพบยีนลูกผสม bcr/abl ชิ้นใหญ่มากกว่าชิ้นเล็ก คือพบขนาด 379 เบส จำนวน 23 รายและขนาด 304 เบสจำนวน 18 ราย ซึ่งทางห้องปฏิบัติการไม่สามารถติดตามผู้ป่วยได้จึงไม่ทราบว่าผู้ป่วยมีการดำเนินของโรคเป็นอย่างไร ผู้ป่วยที่มียีนลูกผสม bcr/abl ชิ้นใหญ่กว่าจะอยู่ในระยะ chronic ยาวกว่าหรือไม่

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์มีความไวมากกว่าการตรวจโดยวิธีไซโตเจเนติคส์ [6,7,12,24] ดังกล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงช่วยวินิจฉัยโรคได้ดีกว่า เช่นในตัวอย่างตรวจที่ 1 ที่พบ t(7;12) ซึ่งไม่ใช่ความผิดปกติของโครโมโซมที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิด CML ยืนยันได้ด้วยการไม่พบยีนลูกผสม bcr/abl หรือในตัวอย่างตรวจที่ 27 และ 34 ตรวจไม่พบโครโมโซมฟิลาเดลเฟียแต่ตรวจพบยีนลูกผสม แสดงว่าทั้งสองรายน่าจะเป็น CML Negative Ph ซึ่งพบได้ประมาณ ร้อยละ 5 ของผู้ป่วย CML การตอบสนองต่อการรักษาจะไม่ดีเท่ากลุ่มที่พบโครโมโซมฟิลาเดลเฟีย นอกจากนี้ยังใช้ติดตามการรักษาได้ดีกว่า จะเห็นได้จากตัวอย่างตรวจที่ 9,14,19 ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายเดียวกันที่กำลังรับการรักษาตัว ตัวอย่างตรวจที่ส่งมาครั้งแรกและครั้งหลังตรวจพบโครโมโซมฟิลาเดลเฟียแต่ตัวอย่างตรวจที่ส่งมาตรวจครั้งที่สองตรวจไม่พบ แต่ตรวจพบยีนลูกผสมทั้งสามครั้งแสดงว่าผู้ป่วยยังมี MRD หลังได้รับการรักษา [31]

ฝ่ายหอสมุด
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ถึงแม้จะมีความไวมากกว่าวิธีไซโตเจเนติคส์ แต่เป็นการตรวจหาว่ามีหรือไม่มียีนลูกผสม bcr/abl เท่านั้น ซึ่งเป็นข้อจำกัดทำให้ไม่สามารถทำนายการดำเนินของโรคที่เปลี่ยนจากระยะ chronic phase(CP) เข้าสู่ ระยะ blastic crisis phase(BP) ได้ วิธีไซโตเจเนติคส์จะทำนายได้ดีกว่าเพราะดูจากความผิดปกติของโครโมโซมที่จะพบเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ BP เช่น มี trisomy 8, 19, isochromosome (17q), +Ph[1] นอกจากนี้ในกลุ่มที่เป็น variant Ph chromosome หรือ variant translocation ถึงแม้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จะบอกได้ว่าเป็น complex translocation ไม่ใช่ simple translocation ดังตัวอย่างที่ 7 และ 8 เนื่องจากตรวจพบยีน BCR/ABL ขนาด 304 คู่เบส แสดงว่า ต้องเกิดการแลกที่ระหว่างโครโมโซม 9 และ 22 ก่อน แล้วจึงไปแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับโครโมโซม 14 เป็น "t(9;22;14)" ไม่ใช่ "t(9;14),t(14;22)" ที่เป็น simple translocation แต่วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไม่สามารถบอกได้ว่าโครโมโซมฟิลาเดลเฟียที่พบเป็น cryptic translocation หรือไม่ถ้าชิ้นส่วนของโครโมโซมที่มาแลกที่อยู่กับโครโมโซม 9 และ 22 มีขนาดเล็กพอๆ กัน เช่นส่วนปลายสุดของแขนสั้นของโครโมโซม 1 ตรงตำแหน่ง 1p36.1 จะมีขนาดเล็กเท่าๆ กับปลายแขนยาวของโครโมโซม 9 ตรงตำแหน่ง 9q34 และยังย้อมแถบสีติดสีจางเหมือนกัน เทคนิค FISH จะช่วยในการวินิจฉัยนี้ได้ดีกว่า[32,33] ความสำคัญของการต้องทราบว่าเป็น variant Ph chromosome หรือไม่เนื่องจากมีรายงานว่าในผู้ป่วย CML กลุ่มนี้จะเกิดการขาดหายไปของเนื้อโครโมโซมบริเวณใกล้ๆ กับที่เกิดโครโมโซมฟิลาเดลเฟียและคนไข้กลุ่มนี้จะมีการดำเนินของโรคไม่ดี

ดังนั้นจะเห็นว่าถึงแม้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จะมีความไวมากกว่าวิธีการตรวจแบบอื่น แต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้ได้ทุกกรณี ต้องเลือกใช้ให้เหมาะกับจุดประสงค์

รายงานครั้งนี้ทุกตัวอย่างตรวจที่ส่งมาไม่ได้แยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยการปั่นแยกใน Ficoll gradient แต่ใช้วิธีแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวด้วย lysis buffer ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการสกัด DNA และล้างเม็ดเลือดแดงทิ้งไปเหลือแต่เม็ดเลือดขาวนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -10 °C เมื่อนำออกมาจากช่องแช่แข็งจะทำให้ผนังของเม็ดเลือดขาวแตกไม่จำเป็นต้องบดด้วยอุปกรณ์อื่นๆ อีก สามารถนำมาสกัด RNA เพื่อนำไปสังเคราะห์ cDNA และใช้เป็น template ในขั้นตอนการทำ RT-PCR ต่อไปของวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ได้อย่างดี วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายแต่มีประสิทธิภาพช่วยลดขั้นตอนแยกด้วย Ficoll เป็นการประหยัดเวลาแล้วยังประหยัดค่าใช้จ่ายได้ด้วย