จดหมายข่าว

สานสุขภาพ

ความร่วมมือไทย - ลาว ด้านการแพทย์และสาธารณสุข
ตามพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี

ISSN 1685-6643

ปีที่ 7 ฉบับที่ 2 เมษายน-กรกฎาคม 2009

เพื่อส่งเสริมการพัฒนาด้านการแพทย์และสาธารณสุขในประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

"สานสานสัมพันธ์สาธารณสุขลาว - ไทย รุ่นที่ 11"
"การรักษาทางทันตกรรมในเด็กออทิสติก"
"โรคไข้ปวดข้อยุงลาย (Chikungunya fever)"
"แนวทางการวินิจฉัยโรคซิฟิลิส"
สำหรับงานแผ่นเพื่องของโรงพยาบาล"
"โรคทริคิเนลโลซิส (Trichinellosis)"
"Flow cytometry"

Flow cytometry

1960s - 1970s Coulter, Shapiro และ Komensky ได้พัฒนาเครื่องมือที่เรียกว่า flow cytometer สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดและคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ โดยให้เซลล์เคลื่อนที่แบบเรียงเดี่ยวผ่านลำแสงเลเซอร์ และในปี 1975 Kohler และ Milstein ได้คิดค้นเทคนิคไฮบริโด มาเพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MoAb) เมื่อรวมจุดเด่นของเทคนิคทั้งสองเข้าด้วยกันแล้ว ทำให้เครื่อง flow cytometer มีประสิทธิภาพสูง เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทางคลินิก โดยเฉพาะในความจำเป็นของการตรวจหา $CD4^+$ T-cells ในผู้ติดเชื้อ HIV

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชฎารัตน์ จารุชัยมนตรี
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

หลักการของ Flow cytometry

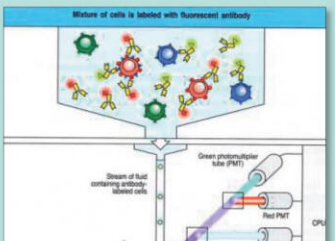
ระบบการทำงานของเครื่อง flow cytometer มี 3 ส่วน คือ *(รูปภาพที่ 1)*

(1) ระบบการเตรียมตัวอย่างตรวจ

(2) ระบบแสงที่นิยมใช้กัน คือ เลเซอร์

(3) ระบบอิเล็กทรอนิกส์/คอมพิวเตอร์

ตัวอย่างตรวจที่จะนำมาวิเคราะห์ อาจจะเป็นเลือด (whole blood) หรือเซลล์เม็ดเลือดที่แยกออกมาจาก whole blood แล้ว ถ้าต้องการหาแอนติเจนบนผิวเซลล์ต้องนำเซลล์มาย้อมด้วย moAb ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการศึกษาและ moAb นั้น จะติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ตัวอย่างตรวจหรือเซลล์จะนำมาเจือจางในน้ำยาเพื่อให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ สามารถไหลผ่านท่อเล็กๆ ในลักษณะเรียงเดี่ยวผ่านลำแสงเลเซอร์ เมื่อเซลล์กระทบกับแสงเลเซอร์จะเกิดการกระจายของแสงออกไปทุกทิศทาง แสงที่กระจายออกจากเซลล์ จะถูกบันทึกและวิเคราะห์ออกมาตามคุณลักษณะของเซลล์แต่ละชนิด โดยแสงที่หักเหไปตามแกนของลำแสงเลเซอร์ (forward scatter) จะถูกบันทึกไว้โดย forward scatter detector ส่วนแสงที่กระจายออกไปและทำมุม 90 องศากับแสงเลเซอร์ (side scatter) จะถูกบันทึกโดย side scatter detector โดย forward scatter light (FSC) เป็นการวัดขนาดของเซลล์ ส่วน side scatter (SSC) เป็นการวัดความซับซ้อนภายในเซลล์ เช่น นิวโทรฟิลมีแกรนูล จำนวนมากและนิวเคลียสมีหลายพู จึงมีค่า SSC สูงกว่าลิมโฟซัยท์ นอกจากนี้เครื่อง flow cytometer ยังสามารถวิเคราะห์แอนติเจนที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ได้อีกด้วย



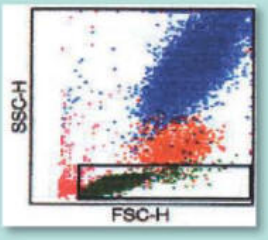
รูปภาพที่ 1 แสดงส่วนต่างๆ ของเครื่อง flow cytometer

การวิเคราะห์แอนติเจนจำเพาะที่ปรากฏบนผิวเซลล์นั้นๆ เช่น CD3, CD4, CD8 แอนติเจนบนผิวของ T-cells สามารถทำได้โดยนำเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ moAb ที่จำเพาะกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorochrome) หากแอนติเจนทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ moAb แล้ว เมื่อเซลล์นี้ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ สารเรืองแสงที่ติดอยู่กับ moAb จะถูกกระตุ้น และปล่อยแสงเรืองออกมา และแสงเหล่านี้จะถูกบันทึกโดย fluorescence detector ในการวิเคราะห์ถ้าใช้สารเรืองแสง 3 ชนิด เครื่องจะต้องมี fluorescence detector 3 ตัว

Fluorochrome หรือสารเรืองแสงเป็นสารที่สามารถดูดซึมแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่ง (excitation) และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นที่ยาวกว่าเดิมออกมา (emission) ในเครื่อง flow cytometer มักใช้สารเรืองแสงที่ถูก excited โดยคลื่น

แสงเดียวกัน แต่แสงที่ emitted ออกมาจะต่างกัน สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ fluorescein isothiocyanate (FITC) และ Phycoerythrin (PE) โดย FITC จะปล่อยแสงเรืองสีเขียวเหลือง ส่วน PE จะปล่อยแสงเรืองสีส้มแดง

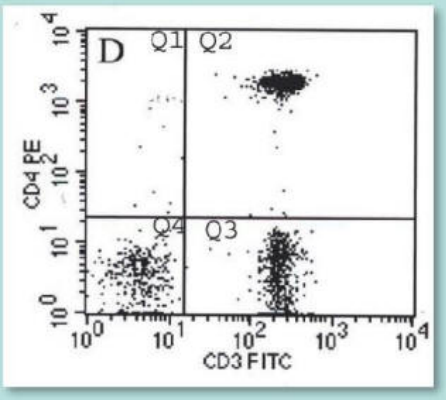
ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลที่เก็บได้ทั้งหมดโดยชุดคอมพิวเตอร์ โดยคอมพิวเตอร์จะแปลงสัญญาณเหล่านั้นออกมาในรูปของ dot plot *(รูปภาพที่ 2 และรูปภาพที่ 3)*



รูปภาพที่ 2

จากรูปภาพที่ 2 เป็นการวิเคราะห์ $CD4^+$ T-cells ทำโดยนำ whole blood มาย้อมด้วย anti CD3-FITC และ anti CD4-PE รูปภาพที่ 2 แสดง dot plot ระหว่าง FSC และ SSC ของเซลล์ชนิดต่างๆ ในเลือด โดยมีกลุ่มแกรนูโลซัยท์อยู่ด้านบนสุด ถัดลงมาเป็นกลุ่มโมโนซัยท์และกลุ่มลิมโฟซัยท์ตามลำดับ ถ้าเราต้องการวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มลิมโฟซัยท์ เราจะตีกรอบเซลล์ที่อยู่กลุ่มล่างสุด คอมพิวเตอร์จะแสดงคุณลักษณะต่างๆ ของลิมโฟซัยท์ออกมา ในกรณีนี้ dot plot จะแสดงปริมาณและชนิดของลิมโฟซัยท์ออกมา (รูปภาพที่ 3) โดยใน Q1 เป็นเซลล์ชนิด $CD3^-CD4^+$, Q2 เป็นเซลล์ชนิด $CD3^+CD4^+$, Q3 เป็นเซลล์ชนิด $CD3^+CD4^-$, Q4 เป็นเซลล์ชนิด $CD3^+CD4^-$ ดังนั้นเซลล์ที่เราสนใจ คือ $CD3^+CD4^+$ ซึ่งอยู่ใน Q2 ทั้งนี้เพราะ helper T-cells ต้องมีแอนติเจน $CD3^+$ และ $CD4^+$ อยู่บนผิวเซลล์

รูปภาพที่ 3



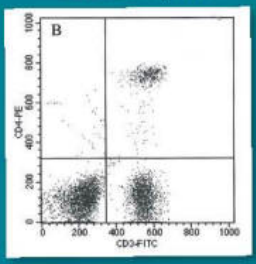
การวิเคราะห์จำนวน $CD4^+$ T-cells ในผู้ติดเชื้อ HIV

การดูแลผู้ติดเชื้อ HIV ข้อมูลที่มีความสำคัญที่ต้องนำมาพิจารณา คือ ปริมาณของ $CD4^+$ T-cells ที่เจาะเป็นช่วงๆ ในเวลาต่างๆ กัน ระดับของ CD4 สะท้อนให้เห็นระดับของความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน ถ้าระดับของ $CD4^+$ T-cells (absolute number) อยู่ที่ 200 เซลล์/ไมโครลิตร แสดงว่าผู้ติดเชื้อจะต้องได้รับการรักษาด้วยยา antibiotic เพื่อป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาส เช่น Pneumocystic carinii pneumonia นอกจากนี้ระดับของ CD4 ยังมีประโยชน์ในการติดตามการรักษาผู้ป่วยหลังได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ หากการรักษาได้ผล ระดับของ $CD4^+$ T-cells จะสูงขึ้น

การคำนวณหา absolute number $CD4^+$ T-cells ต้องทราบจำนวน absolute lymphocyte count, white blood cell count และค่า differential count จากนั้นจึงคำนวณค่า absolute number ของ $CD4^+$ T-cells ออกมา

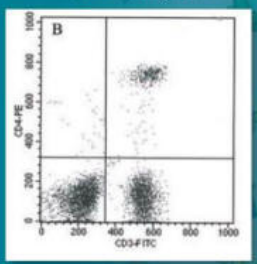
จากรูปข้างบน เป็น dot plot เปรียบเทียบระหว่าง HIV seronegative และ HIV seropositive Q2 แสดงปริมาณของ $CD3^+CD4^+$ T-cells จะเห็นว่า HIV seronegative จะมีจำนวนเซลล์ $CD3^+CD4^+$ หนาแน่นกว่า HIV seropositive เครื่อง flow cytometer จะแสดงค่า CD4% ออกมา หากต้องการหาค่า absolute CD4 เราต้องหาค่า WBC count และ differential count เพื่อหา % lymphocyte สมมติ ผู้ป่วย HIV seropositive มี WBC count 4,000 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร differential count ได้ lymphocyte 30% ดังนั้นค่า absolute lymphocyte count = 1,200 จากเครื่อง flow cytometer ค่า CD4% = 15 ดังนั้นค่า absolute CD4 = 180 ($15 \times 1,200/100$)

HIV Seronegative



CD4% = 60
ALC = 2100 cells/ul
Absolute CD4 = 1260/ul

HIV Seronegative



CD4% = 15
ALC = 2100
Absolute CD4 = 180