

ระยะเวลาที่มีผลต่อความคงตัวของสารเรืองแสงในการย้อมเซลล์ที่ถูกตรึง เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry

Stability of Fluorochrome in Fixative Cells for Flow Cytometric Analysis

สิรภาพ วงษ์เนียม^{1*}

Sirapope Wongniam^{1*}

บทคัดย่อ

ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้งานบริการตรวจวิเคราะห์เซลล์ด้วยเทคนิค flow cytometry ประสบความสำเร็จคือ ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อสภาพความคงตัว (stability) ของสารเรืองแสงที่ใช้ เพื่อให้ทราบถึงผลของปัจจัยดังกล่าว ผู้วิจัยได้ตรวจนับจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มจากการคายแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์ที่ถูกตรึง และย้อมด้วย propidium iodide (PI) และแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะกับเซลล์ที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) และ PE-Cy7 งานวิจัยได้แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มคือ เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ (เซลล์ MCF-7, เซลล์ HuCCA-1 และเซลล์ HT1080) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (granulocytes (CD11b), monocytes (CD14) และ lymphocytes (CD4:CD8 และ CD3:CD19)) ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง BD FACSCanto flow cytometer ตามระยะเวลา 0, 15, 30 นาที; 1, 2, 3, 5 ชั่วโมง; 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน ผลการวิเคราะห์ที่โดยพิจารณาจากค่า mean differences ที่ 3% ซึ่งแสดงถึงความคงตัวของสารเรืองแสงที่ยอมรับได้ พบว่าในเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์มีค่า mean differences ของจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงมากกว่า 3% ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวมีค่า mean differences ของจำนวนเซลล์มากกว่า 3% ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป แต่ค่า mean differences ของปริมาณความเข้มแสงไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการส่งตัวอย่างเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อการวิเคราะห์ในงานวิจัยของผู้รับบริการไม่ควรเกิน 3 วัน และ 5 วันตามลำดับ จากข้อมูลเบื้องต้นยังสามารถใช้ในการจัดตารางเวลาในการเข้ารับบริการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: Flow Cytometry/ FACS/ Fluorochrome/ Fixative Cells

Abstract

The success of a flow cytometric analysis depends on the stability of fluorescent dyes during preserving time. To gain more details in the stability of fluorescent dyes, the fixative cell lines (MCF-7, HuCCA-1 and HT1080 cells) and white blood cells [granulocytes (CD11b), monocytes (CD14) and lymphocytes (CD4:CD8 and CD3:CD19)] were labeled with propidium iodide (PI) and cell-specific fluorescent labeled antibodies, fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and PE-Cy7, respectively. The amount of cell count (event) and emission intensity were measured by BD FACSCanto flow cytometer at the various time points of 0, 15, 30 min; 1, 2, 3, 5 hrs; 1, 2, 3, 4, 5 and 7 days. These were calculated in mean differences comparing to the standard cut-off 3%. In cell lines, >3% of mean differences of both event and intensity could be observed after 3 days. In white blood cells, no change of mean differences of intensity were observed, but event showed >3% after 5 days. Thus, in order to obtain the precise data from fluorescent labeled cell lines and white blood cells, the preserving time should not be over 3 and 5 days, respectively. Moreover, this knowledge can be utilized for a service management to the users.

Keywords: Flow Cytometry/ FACS/ Fluorochrome/ Fixative Cells

¹ หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400

¹ Central Instrument Facility, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

* Corresponding author: sirapope.won@mahidol.ac.th

1. บทนำ

การบริการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer เป็นหนึ่งในงานบริการวิชาการ (analytical service) ของหน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเป็นหน่วยงานกลางสำหรับให้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ชั้นสูงเพื่อการสนับสนุนและพัฒนางานวิจัย ของหน่วยงานภายในมหาวิทยาลัย ภาครัฐและเอกชน

การศึกษา flow cytometry เป็นการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของ living cells หรืออนุภาคขนาดเล็กทางชีววิทยา (biological particles) ในงานสาขาต่างๆ เช่น สาขาโลหิตวิทยา สาขาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล สาขาพยาธิวิทยา สาขาเภสัชวิทยา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาพฤกษศาสตร์ เป็นต้น [1], [2], [3] ซึ่งประยุกต์งานทางด้านชีวเคมี และฟิสิกส์เข้าด้วยกัน โดยอาศัยเครื่อง flow cytometer เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดคุณลักษณะของเซลล์เดี่ยว (single cell) ที่แขวนลอยหรืออนุภาคขนาดเล็กที่ไม่เกาะกัน ขณะกำลังไหลอยู่ในสารละลาย (sheath fluidic) ด้วยการประเมินคุณลักษณะของขนาด และองค์ประกอบภายในเซลล์ โดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ และวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งออกมาบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ ขณะที่ไหลผ่านกรวย (nozzle) ด้วยตัวรับแสง (detector) จะรับแสงที่หักเหตามช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน แล้วแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าเพื่อประมวลผลด้วยระบบคอมพิวเตอร์ต่อไป [4]

การตรึงสภาพเซลล์ (fixation) เป็นการหยุดกิจกรรมหรือขบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ (metabolism) และรักษาสภาพของเซลล์ และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตให้คงอยู่ในสภาพคล้ายเดิมมากที่สุด [5], [6] โดยไม่ให้อาณัติกำหนด หรือ epitope (ตำแหน่งย่อยๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ) ที่ต้องการวิเคราะห์ถูกทำลายไป อย่างไรก็ตาม สาร fixation buffer หรือ fixative agent ชนิดหนึ่งอาจไม่สามารถใช้ได้กับแอนติเจนบางชนิด ดังนั้นการเลือกชนิดของ fixation buffer ความเข้มข้น สภาวะการทดลอง และระยะเวลาการตรึงเซลล์ จึงมีผลต่อการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำ ซึ่งการตรึงเซลล์นานเกินไปอาจทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง และรบกวนผลจากการย้อมได้

งานวิจัยก่อนหน้าได้มีการศึกษาความคงตัวของสารเรืองแสงในการวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของสเปิร์ม โดยใช้ 4% paraformaldehyde เพื่อตรึง (fix) เซลล์ และพิจารณาค่าเบี่ยงเบนของ mean differences มากกว่า $\pm 5\%$ ในวันที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 ซึ่ง caspase-3 และ FITC-CD46(+) spermatozoa ไม่ควรเกินวันที่ 10 และวันที่ 14 ตามลำดับ [7] การศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดต่อการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง และแกรนูโลไซต์ (granulocytes) โดยใช้ EDTA และ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งโดยเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง และผ่านการตรึงเซลล์โดยใช้ 1% paraformaldehyde 500 μL พบว่าระยะเวลาของการเก็บเลือดจนถึงเวลาวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 48 ชั่วโมงในเม็ดเลือดแดง และแกรนูโลไซต์ภายใน 24 ชั่วโมง [8] นอกจากนี้ การศึกษาการสลายตัว (degrade) ของสารเรืองแสง APC tandem dye ที่ส่งผลกระทบต่อกลไกการแสดงออกของเซลล์ โดยเปรียบเทียบปริมาณความเข้มแสงของแอนติบอดี (antibody) CD45, CD20, CD3 และ CD19 ที่ติดฉลากด้วย APC-Cy7 และ -H7 กับ CD19 ที่ติดฉลากด้วย APC พบว่า APC-Cy7 และ -H7 สลายตัวเร็วกว่า APC-based และขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ใช้วิเคราะห์ [9]

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการปฏิบัติงานคือ ระยะเวลาในการให้บริการวิเคราะห์ตัวอย่างมีเวลาจำกัดตามระบบเวลาราชการ รวมถึงจำนวนผู้ขอรับบริการในแต่ละวันมักน้อยแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อสภาพความคงตัวของสารเรืองแสง (fluorochrome) ที่ใช้ในการย้อมเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลาย fixation buffer โดยไม่ส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์ จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้ขอรับ และผู้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ควรมีความรู้ เพื่อใช้จัดการเวลาการรับตัวอย่างวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสม พร้อมทั้งได้ผลที่มีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ยังสามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษามาใช้อธิบาย และให้คำปรึกษากับผู้ขอรับบริการในการวางแผนงานวิจัยต่อไปได้

วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้คือ 1. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อความคงตัวของสารเรืองแสงที่ใช้ในการย้อมเซลล์ภายหลังการตรึงด้วยสารละลาย fixation buffer แล้วจึงให้ผลการทดลองคงที่ และน่าเชื่อถือ 2. เพื่อใช้ในการจัดการเวลาขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค flow cytometry ได้

อย่างเหมาะสม 3. เพื่อใช้ในการให้คำปรึกษา และความเชื่อมั่นต่อการขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry และ 4. เพื่อเป็นการพัฒนางานประจำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. วัสดุและวิธีการ

การเก็บข้อมูลตัวอย่างที่ส่งตรวจวิเคราะห์

การศึกษานี้เป็นการส่งตรวจวิเคราะห์ และบันทึกข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างจากผู้รับบริการ ซึ่งขึ้นอยู่กับความเต็มใจในการกรอกรายละเอียด ไม่ส่งผลกระทบต่อหัวข้องานวิจัย และเป็นความลับของผู้ใช้บริการ ข้อมูลที่บันทึกได้แก่ ข้อมูลทั่วไปของผู้รับบริการ ประเภท/ชนิดของตัวอย่างที่วิเคราะห์ ความปลอดภัยในตัวอย่าง หัวข้อวิจัย/หัวข้อการศึกษา/สิ่งที่สนใจในการศึกษา สารเรืองแสงที่เลือกใช้ วิธีการทดลองโดยสังเขป และชนิดของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ ความต้องการข้อมูลทีวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น จำนวนเซลล์ที่นำไปคำนวณ ค่าคำนวณทางสถิติ รูปแบบรายงานที่ต้องการนำเสนอ และข้อเสนอแนะ/ข้อความบันทึกจากผู้ส่งตัวอย่างวิเคราะห์

เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์

เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ในการศึกษานี้ ได้แก่ MCF-7 cells (human breast adenocarcinoma cell lines), HuCCA-1 cells (human bile duct epithelial carcinoma cell lines), และ HT1080 cells (human fibrosarcoma cell lines) ถูกเตรียมให้มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 1×10^5 viable cells/mL แล้วเข้าสู่กระบวนการศึกษาตามหัวข้อวิจัย ซึ่งต่อมาจะถูก fix ด้วย 99.95% ethanol ที่ -20°C เป็นเวลามากกว่า 15 นาที และย้อมด้วย propidium iodide (PI) โดยปฏิบัติตามชุด BD Pharmingen™ PI/RNase staining buffer (catalog no.550825) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมได้ปรับปริมาตรด้วย phosphate-buffered saline (PBS) เพื่อได้ความเข้มข้นเซลล์ที่เหมาะสม (300–800 events/sec) ต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ในการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ (events) และปริมาณความเข้มแสง (intensity) ของแต่ละช่วงวงจรเซลล์ (DNA cycle) ได้แก่ ระยะเวลา G_0 (resting phase)/ G_1 (1st Gap phase), S (DNA synthesis), G_2/M (2nd Gap phase/mitosis phase) และ เซลล์ที่เสียหาย (cell debris) ในตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample)

เซลล์เม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือด (whole blood) ที่มี EDTA หรือ heparin ปริมาตร 100 μL ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างตามหัวข้องานวิจัยที่ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ ซึ่งผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยชุด kit ที่จำเพาะต่อแอนติบอดี ได้แก่ BD

Pharmingen™ PE-Cy™7 mouse anti-human CD11b/Mac-1 (catalog no.557743) ใช้ศึกษา granulocytes; BD Pharmingen™ FITC-CD14 (catalog no.347493) แอนติบอดีที่จับจำต่อ human monocytes/macrophages; BD Simultest™ FITC-CD4/PE-CD8 (catalog no.340039) ใช้ศึกษา mature human helper/inducer [CD4(+)] และ suppressor/cytotoxic [CD8(+)] lymphocytes; และ BD Simultest™ FITC-CD3/PE-CD19 (catalog no.349211) สำหรับศึกษา mature human T [CD3(+)] และ B [CD19(+)] lymphocytes แล้วเข้าสู่การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการโดยใช้ 1X BD FACS lysing solution ในการทำลายเม็ดเลือดแดง ต่อมาเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการจะถูก fix ด้วย 1–4% paraformaldehyde ปริมาตร 100–500 μL ที่ -20°C เป็นเวลา 10–20 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วย 1X PBS ให้ได้ปริมาตร 500 μL – 1 mL ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer เพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงที่เป็นบวก (intensity (+)) ของแต่ละแอนติบอดีในตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample)

การทดสอบด้วยเครื่อง flow cytometer

หลังจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เซลล์ทั้ง 2 กลุ่มจะถูกเก็บที่ 4°C ก่อนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BD FACSDiva software version 4.1.1 ด้วยเครื่อง BD FACSCanto™ flow cytometer ของบริษัท Becton Dickinson and company โดยใช้ตัวอย่างเดิมในการเก็บข้อมูลตามเวลาดังนี้ 0, 30 นาที; 1, 3, 5 ชั่วโมง; 1, 2, 3 และ 5 วัน (เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์) และ 0, 15, 30 นาที; 1, 2, 3, 5 ชั่วโมง; 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน (เซลล์เม็ดเลือดขาว) จำนวนเซลล์ที่บันทึก 20,000–30,000 events เปรียบเทียบข้อมูลกับกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มต้นวิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

การคำนวณ

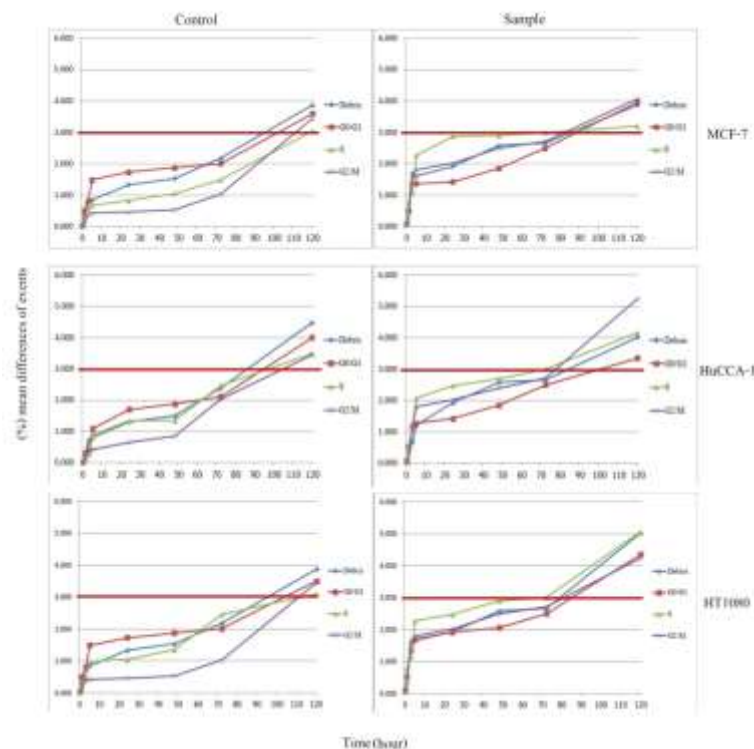
นำผลการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ (events) และปริมาณความเข้มแสง (intensity) ของแต่ละช่วงวงจรเซลล์ (DNA cycle) ที่ได้จากตัวอย่างเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ และจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงที่เป็นบวก (intensity (+)): CD11b(+), CD14(+), CD4(+)/CD8(+) และ CD3(+)/CD19(+) ของแต่ละแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยคำนวณค่าความแตกต่าง (differences) [7] ของจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงจากข้อมูลในระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเป็น (%) mean differences ($\pm 2SD$ (standard deviation)) ของข้อมูลจำนวนเซลล์ (mean differences of events) และปริมาณความเข้มแสง (mean differences of intensity) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะถูก

พิจารณาค่า mean differences น้อยกว่า 3% เป็นค่าที่ยอมรับได้ [2], [3], [10]

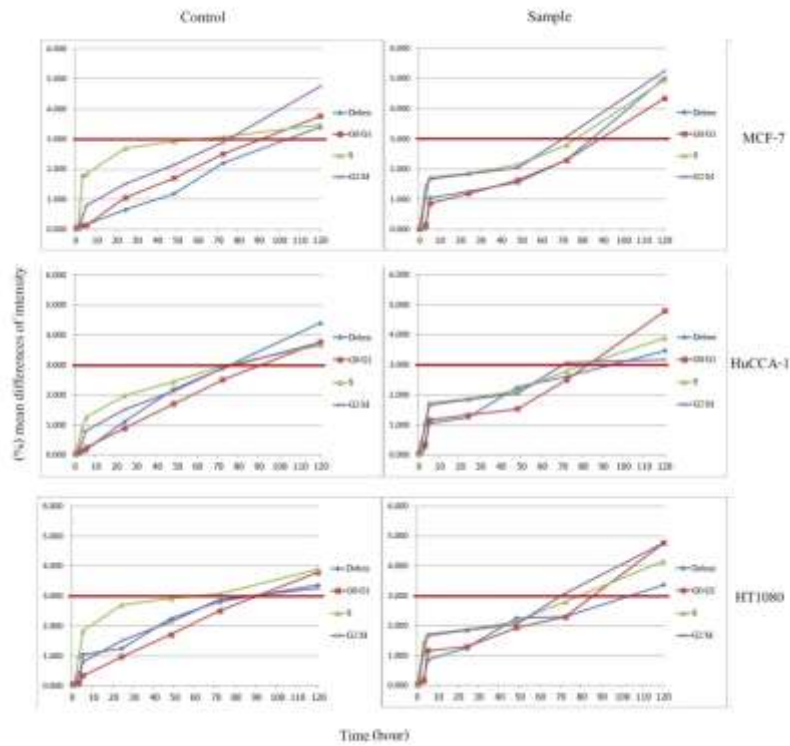
3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาแบ่งประเภทตัวอย่างจากผู้รับบริการตรวจวิเคราะห์ออกเป็น 2 กลุ่ม พบว่ากลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ ได้แก่ MCF-7 cells, HuCCA-1 cells และ HT1080 cells แสดงค่า (%) mean differences (\pm 2SD) ของแต่ละช่วง DNA cycle (G0/G1, S และ G2/M) และเซลล์ที่เสียหาย (cell debris) ในตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample) ดังรูปที่ 1 และ 2 ถ้าพิจารณาความสัมพันธ์ของ MCF-7 cell lines ในระยะ G0/G1 ช่วงเวลา 0-1 ชั่วโมง ค่า mean differences of events ของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างศึกษา เท่ากับ $0.025(\pm 0.06)$ - $0.495(\pm 0.08)$ และ $0.071(\pm 0.08)$ - $0.512(\pm 0.10)$ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า mean differences of intensity ค่าจะแปรผันเล็กน้อย $0.070(\pm 0.05)$ - $0.075(\pm 0.06)$ และ $0.023(\pm 0.07)$ - $0.110(\pm 0.09)$ ตามลำดับ ระยะเวลา 1 ชั่วโมงถึง 3 วัน ข้อมูลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของค่า mean differences of events เท่ากับ $0.495(\pm 0.08)$ - $2.012(\pm 0.23)$

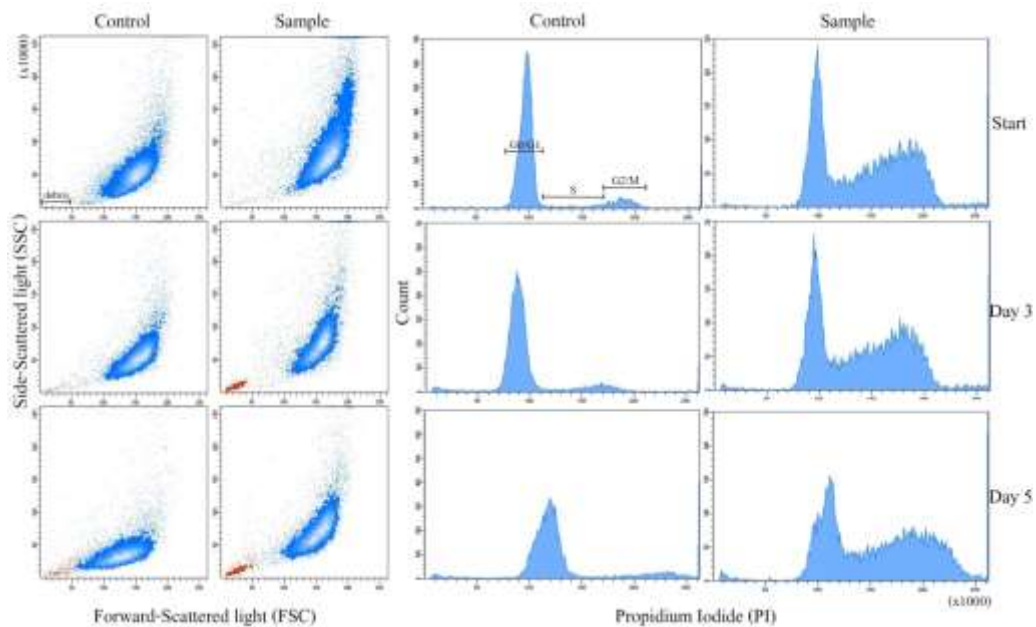
และ $0.512(\pm 0.10)$ - $2.495(\pm 0.34)$ และค่า mean differences of intensity เท่ากับ $0.075(\pm 0.06)$ - $2.514(\pm 0.25)$ และ $0.110(\pm 0.09)$ - $2.300(\pm 0.32)$ ตามลำดับ และลักษณะทางกายภาพของเซลล์ยังคงสภาพดี (รูปที่ 3) อย่างไรก็ตามตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไปค่า mean differences of events มีค่าสูงขึ้นมากกว่า 3% เท่ากับ $3.602(\pm 0.79)$ และ $3.973(\pm 0.85)$ และค่า mean differences of intensity เท่ากับ $3.770(\pm 0.74)$ และ $4.354(\pm 0.84)$ ตามลำดับ ซึ่งลักษณะทางกายภาพของเซลล์มีการเสียหายมากส่งผลต่อการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงใน DNA cycle จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในการตรวจวิเคราะห์วันที่ 3 ค่าเฉลี่ย และความแปรปรวนของค่า mean differences ของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างศึกษาใน MCF-7 cells, HuCCA-1 cells, และ HT1080 cells ของระยะ G0/G1, S, G2/M ใน DNA cycle ซึ่งเซลล์ทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันโดยการทดสอบ t-test และ one-way ANOVA นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มแสงระหว่างตัวอย่างควบคุมกับตัวอย่างศึกษามีความแตกต่างกันโดยการทดสอบ t-test



ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean differences of events ในตัวอย่างควบคุม (control) (ขวา) และตัวอย่างศึกษา (sample) (ซ้าย) ของระยะ G₀/G₁, S, G₂/M ใน DNA cycle และเซลล์ที่เสียหาย (cell debris) ของ MCF-7 cell lines, HuCCA-1 cell lines, และ HT1080 cell lines เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง



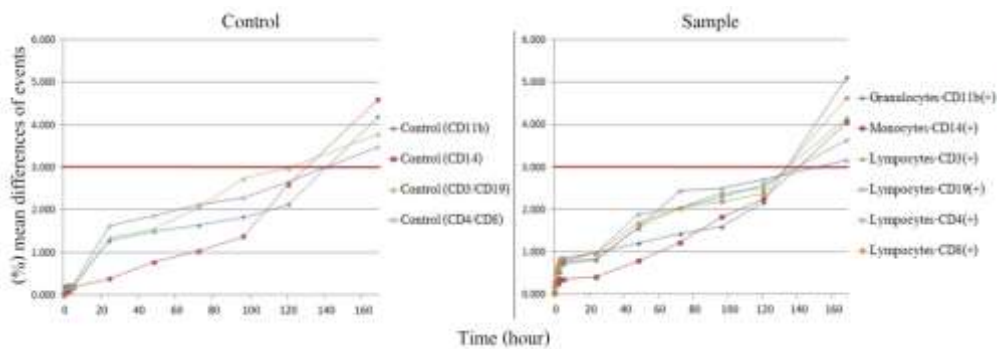
ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean differences of intensity ในตัวอย่างควบคุม (control) (ขาว) และตัวอย่างศึกษา (sample) (ซ้าย) ของระยะ G_0/G_1 , S, G_2/M ใน DNA cycle และเซลล์ที่เสียสภาพ (cell debris) ของ MCF-7 cell lines, HuCCA-1 cell lines, และ HT1080 cell lines เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0, 0.5, 1, 3, 5, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง



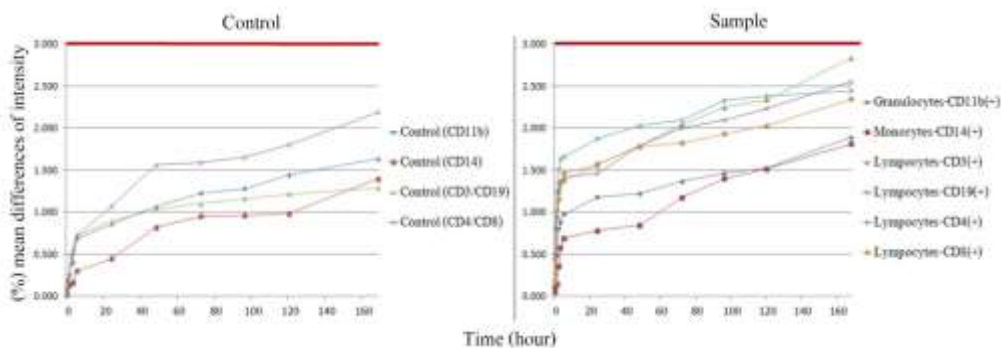
ภาพที่ 3 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของของเซลล์ MCF-7: control และ sample ในรูปแบบ contour plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า forward-scattered light (FSC) กับ side-scattered light (SSC) [ซ้าย] และรูปแบบของ histogram แสดงปริมาณความเข้มแสง (PI) กับ จำนวนเซลล์ (count) ของระยะ G_0/G_1 , S, G_2/M ใน DNA cycle [ขวา] และเซลล์ที่เสียสภาพ (cell debris) ตามระยะเวลาเริ่มต้น, 3 และ 5 วัน

กลุ่มตัวอย่างเม็ดเลือดขาวที่เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ตามระยะเวลา ได้แก่ granulocytes [CD11b (+)], monocytes [CD14(+)], และ [CD4(+):CD8(+)] และ [CD3(+):CD19(+)] ใน lymphocytes แสดงค่า mean differences ในตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างศึกษา ดังรูปที่ 4 และ 5 เมื่อพิจารณาข้อมูลของ granulocytes [CD11b(+)] ในช่วงระยะเวลา 0-5 วัน ค่า mean differences of events เท่ากับ $0.001(\pm 0.06)$ - $2.121(\pm 0.33)$ และ $0.024(\pm 0.08)$ - $2.166(\pm 0.42)$ ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับความสัมพันธ์ต่อค่า mean differences of intensity เท่ากับ $0.026(\pm 0.06)$ - $1.441(\pm 0.32)$ และ $0.067(\pm 0.07)$ - $1.523(\pm 0.44)$ ตามลำดับ ส่วนคุณลักษณะทางกายภาพของเซลล์มีการกระจายตัวเล็กน้อย (รูปที่ 6) อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่วันที่ 7 ขึ้นไปค่า mean differences of events มีค่าสูงขึ้นมากกว่า 3% มีค่าเท่ากับ $4.185(\pm 0.75)$ และ $5.110(\pm 0.84)$ ตามลำดับ

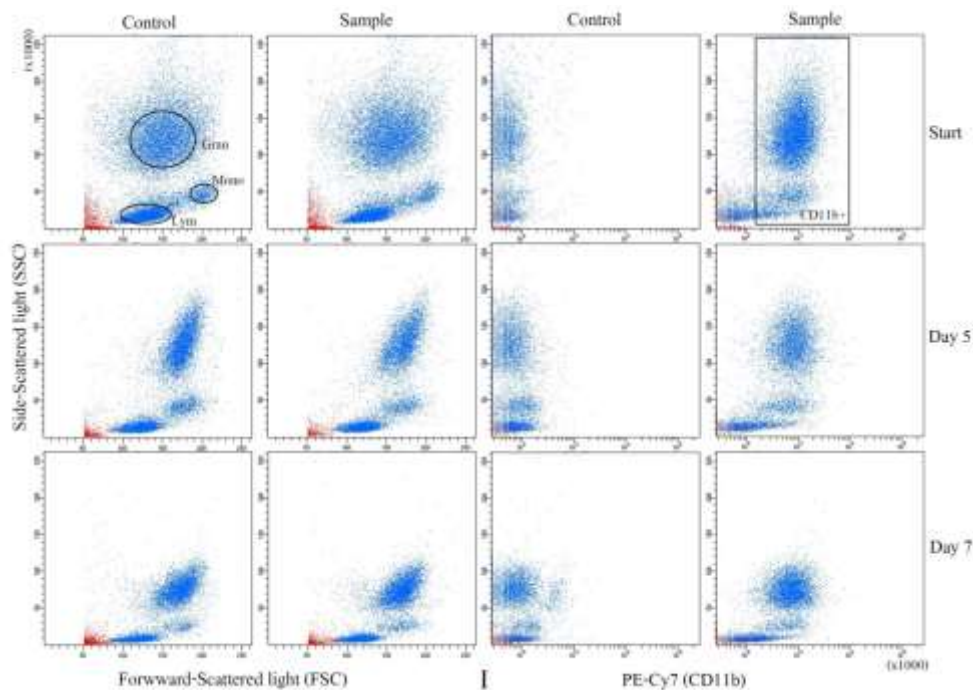
และค่า mean differences of intensity มีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน มีค่าเท่ากับ $1.635(\pm 0.39)$ และ $1.892(\pm 0.44)$ ตามลำดับ รวมถึงคุณลักษณะทางกายภาพของเซลล์มีการเสถียรภาพมากจึงส่งผลต่อการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ แต่มีผลต่อปริมาณความเข้มข้นไม่มาก ทั้งนี้อาจขึ้นกับความจำเพาะของสารเรืองแสงกับแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพดี และความเข้มข้นมากเกินไป (excess) จากการทดสอบทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในการตรวจวิเคราะห์วันที่ 5 ค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของค่า mean differences ของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างศึกษาในเม็ดเลือดขาวทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันโดยการทดสอบ t-test และ one-way ANOVA นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ และปริมาณความเข้มข้นระหว่างตัวอย่างควบคุมกับตัวอย่างศึกษามีความแตกต่างกันโดยการทดสอบ t-test



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean differences of events ของตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample) ใน granulocytes [CD11b(+)]; monocytes [CD14(+)]; CD4(+):CD8(+)] และ CD3(+):CD19(+)] ใน lymphocytes เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean differences of intensity ของตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample) ใน granulocytes [CD11b(+)]; monocytes [CD14(+)]; CD4(+):CD8(+)] และ CD3(+):CD19(+)] ใน lymphocytes เปรียบเทียบกับเวลาที่ 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของเซลล์เม็ดเลือดขาว:granulocyte cells (Gran), monocyte cells (Mono) และ lymphocyte cells (Lym) ของตัวอย่างควบคุม (control) และตัวอย่างศึกษา (sample) ในรูปแบบ dot plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า forward-scattered light (FSC) กับ side-scattered light (SSC) [ซ้าย] และ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มแสงของ PE-Cy7(CD11b)กับค่าSSC[ขวา]ตามระยะเวลาเริ่มต้น,5และ7 วัน

จากการเปรียบเทียบผลการศึกษาระยะเวลา ความคงตัวของสารเรืองแสงที่เหมาะสมต่อการ วิเคราะห์ระหว่างการศึกษานี้กับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งใช้ สารเรืองแสงชนิดเดียวกัน แต่ต่างกันที่แอนติบอดี (FITC-CD46(+)) [7] พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับ เซลล์ และสารเรืองแสงชนิดเดียวกันเพื่อให้ได้ผลที่ดี และน่าเชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณความ เข้มของสารเรืองแสงบางชนิด เช่น APC-Cy7/H7 ซึ่ง อยู่ในกลุ่มของ APC-tandem dye มีปริมาณความเข้ม แสงลดลงเร็วกว่า APC-based [9] ดังนั้นแม้ว่าผลของ งานวิจัยนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเบื้องต้นใน การศึกษาเซลล์ และสารเรืองแสงชนิดอื่นได้แต่หาก ผู้รับบริการใช้เซลล์หรือสารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติ แตกต่างไปจากการศึกษานี้ควรหาระยะเวลาความคงตัว ของสารเรืองแสงที่เหมาะสมต่อไป

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์ค่า mean differences ของ เซลล์เนื้อเยื่อทั้งสามชนิดที่ผ่านการตรึงสภาพเซลล์แล้ว มีแนวโน้มค่า mean differences of events และ mean

differences of intensity ของปริมาณดีเอ็นเอใน DNA cycle มีรูปแบบที่เหมือนกัน ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อ การวิเคราะห์ไม่ควรเกิน 3 วัน ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวมี ค่า mean differences of events ที่มีแนวโน้มเหมือนกัน แต่ค่า mean differences of intensity ไม่แตกต่างกัน อย่างชัดเจน ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ ไม่ควรเกิน 5 วัน ช่วงหลังระยะเวลาดังกล่าวเซลล์จะมี คุณลักษณะทางกายภาพ และปริมาณความเข้มแสงที่ แตกต่างกันมากกว่า 3% ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการ วิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ให้บริการวิเคราะห์ ได้แก่ นางสาวอนัญญา โภภาสวัสดิ์ชัย กลุ่มปฏิบัติการศึกษา ระบบภูมิคุ้มกันต่อโรคไข้เลือดออก และห้องปฏิบัติการ PR 617 ภาควิชาจุลชีววิทยา, นางสาวนิตยา บุญหมื่น ห้องปฏิบัติการ PR 421 ของภาควิชาสรีรวิทยา และ ห้องปฏิบัติ B113 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้

4. เอกสารอ้างอิงและบรรณานุกรม

1. โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. โพลไซโทเมตรี. กรุงเทพมหานคร: วังตะวัน; 2539.
2. Wulff S. Guide to Flow Cytometry. 2nd ed. Carpinteria, CA, USA: Dako; 2005.
3. Marion G Macey, editor. Flow Cytometry: Principles and Application. New York: Wiley-Liss; 2007.
4. Becton Dickinson and Company. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. San Jose, CA, USA: BD Biosciences; 2000.
5. Richard W. Burry, editor. Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. London: Springer Publishers Limited; 2010.
6. Hughes D, Mehmet H, editors. Cell Proliferation and Apoptosis: Advanced Methods. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers Limited; 2003.
7. Grunewald S, Rasch M, Reinhardt M, Baumann T, Paasch U, Glander HJ. Stability of fluorochrome based assays to measure subcellular sperm functions. Asian J Androl 2008;10 (3):455-459.
8. อัญชลี เทศสวัสดิ์, อรทัย ทะกำ, รัชดา กัญยานุญ วันชัย วนะชิวนาวิน. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดต่อการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดที่วิเคราะห์โดย flow cytometry. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์ บริการโลหิต 2548;15:233-46.
9. Le Roy C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F, Letestu R. Flow cytometry APC-tandem dyes are degraded through a cell-dependent mechanism. Cytometry A 2009; 75(10):882-890.
10. Doležel J, Greilhuber J, Suda J, editors. Flow cytometry with plant cells. Wiley-VCH, Weinheim; 2007.