การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization

นางสาวกรวิกา เส็งเล็ก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY, POLYMERASE CHAIN REACTION AND IN SITU HYBRIDIZATION IN THE DETECTION OF MONOCLONALITY IN EXTRANODAL MARGINAL ZONE B-CELL LYMPHOMA OF MUCOSA–ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE (MALT LYMPHOMA)

Miss Kornwika Senglek

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization

โดย นางสาวกรวิกา เส็งเล็ก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธรรมธร อาศนะเสน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธรรมธร อาศนะเสน)

.... กรรมการ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ สัญญา สุขพณิชนันท์)

.... กรรมการ

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรวิกา เส็งเล็ก: การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization (Comparision of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and in situ hybridization in the detection of monoclonality in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. นพ. ธรรมธร อาศนะเสน, 135 หน้า.

บทนำ: การวินิจฉัย MALT lymphoma ยังคงท้าทายเมื่อชิ้นเนื้อที่ถูกนำมาศึกษามีขนาดเล็ก (endoscopic biopsy specimen) จึงเป็นเรื่องที่ยากที่จะวินิจฉัย MALT lymphoma ด้วย histomorphology และ immunophenotype จึงนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อช่วยในการวินิจฉัย จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อเปรียบเทียบร้อยละในการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) ระหว่างวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization **วิธีการทำวิจัย:** ในการทำวิจัยในครั้งนี้ จะตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อตัวอย่างที่มาจาก formalin fixed paraffin-embedded โดยได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็น MALT lymphoma ชิ้นเนื้อถูกย้อมด้วย kappa และ lambda antibody ที่จำเพาะต่อ ig light chain ด้วยวิธี Automated IHC, kappa และ lambda mRNA light chain ด้วยวิธี Automated ISH ด้วย probe ที่เป็น fluorescein-tagged oligoprobes การตรวจสอบ monoclonality ด้วยเทคนิค PCR จะสกัด DNA จากชิ้นเนื้อตัวอย่างและใช้ consensus primer ต่อ framework 3 (Fr3) ของ V segments and และ consensus primer ต่อ J region ของ immunoglobulin heavy chain gene **ผลการทดลอง:** พบว่า มี 23 รายใน 43 ราย (53.5%) ที่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ด้วยวิธี IHC โดยแยกเป็น kappa light chain restriction 14 ราย และ lambda light chain restriction 9 ราย ในขณะที่วิธี ISH ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 28 รายใน 43 ราย (65.1%)โดยแยกเป็น kappa light chain restriction 17 ราย และ lambda light chain restriction 11 ราย และเทคนิค PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 21รายใน 43ราย (48.8%) เมื่อนำทดสอบทางสถิติพบว่าทั้ง 3 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p>0.05$) และพบว่ามี รายที่ตรวจไม่พบผลบวก monoclonality โดยทั้ง 3 วิธี **สรุปผลการทดลอง** : Automated ISH (65.1%) สามารถใช้ตรวจหา light chain expression ใน paraffin section และมีการตรวจพบผลบวก monoclonality ได้เหนือกว่า IHC (53.5%) ใน MALT lymphoma และมีร้อยละการตรวจพบที่มากกว่าเทคนิค PCR (48.8%) แต่ถ้าใช้ Automate IHC และ PCR รวมกัน 2 เทคนิคพบว่าสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ในร้อยละที่สูง (81.4%) กว่าเทคนิคเพียงเทคนิคเดียวและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในผู้ป่วย MALT lymphoma และเป็นเทคนิคที่มีราคาถูก

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .... กรวิกา
ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

4874703630: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: MALT LYMPHOMA, MONOCLONALITY, LIGHT CHAIN RESTRICTION, ISH, PCR, IHC

KORNWIKASENGLEK: COMPARISION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY, POLYMERASE CHAIN REACTION AND IN SITU HYBRIDIZATION IN THE DETECTION OF MONOCLONALITY IN EXTRANODAL MARGINAL ZONE B-CELL LYMPHOMA OF MUCOSA-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE (MALT LYMPHOMA). THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PONGSAK WANNAKRAIROT, M.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. THAMATHORN ASSANASEN, M.D., 135 pages.

Introduction: Diagnosis of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) remains a challenge especially when tissue source is endoscopic biopsy specimen. The difficulty in distinction of reactive from neoplastic B-cell infiltrates by histomorphology and immunophenotype is the major problem. Therefore the use of molecular diagnostic technique might be helpful. We compared the percent in detection of monoclonality in MALT lymphoma with immunohistochemistry (IHC), polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization (ISH). **Material and Method**: Analyses were applied to formalin fixed paraffin-embedded tissue from cases with diagnosis of MALT lymphoma from 43 patients. Tissue sections were stained for kappa and lambda light chain by Automated IHC (Ventana Medical System) and for light chain mRNA by Automated ISH (Ventana Medical System) using fluorescein-tagged oligoprobes. Simple PCR was carried out on DNA extracted from sections using consensus primers to framework 3 (Fr3) of the V segments and to consensus primer from the J region of the immunoglobulin heavy chain gene. **Result**: Twenty-three of 43 (53.5%) MALT lymphoma cases had detectable light chain restriction dividing into kappa restriction 13 cases and lambda restriction 10 cases by IHC whereas expression of monotypic light-chain mRNA was detected in 28 of 43 cases (65.1%) dividing into kappa restriction 17 cases and lambda restriction 11 cases by ISH. The clonal rearrangement band was demonstrated in 21 of 43 cases (48.8%) by PCR. However, there is no statistical difference ($p>0.05$) comparing 3 methods. Notably, there are cases that monoclonality can not be demonstrated by any of 3 methods. **Conclusion**: Automated ISH (65.1%) is useful in detecting light chain expression in paraffin section and appeared superior to IHC (53.5%) for light chain detection in MALT lymphoma than PCR for heavy chain gene rearrangement using Fr3 and J region primer (48.8%). Combined automated IHC and PCR is useful in detecting monoclonality to get most percentage (81.4%) in MALT lymphoma comparing with each test ($p<0.05$) with reasonable cost.

Department Medical Science	Student's signature........................
Academic year 2006	Advisor's signature........................
	Co-advisor's signature........................

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธรรมธร อาศนะเสน

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธรรมธร อาศนะเสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ, ศาสตราจารย์นายแพทย์สัญญา สุขพณิชนันท์ และศาสตราจารย์นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้จนบรรลุวัตถุประสงค์ในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสในการศึกษาหาความรู้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณปรีชา เรืองเวชวรชัย ที่คอยช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และพี่ ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ชั้น 14 ตึก อ.ป.ร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ กำลังใจ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัวเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฌ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question).....11

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....11

1.4 สมมติฐาน.....11

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....12

1.6 ขอบเขตของการวิจัย.....13

1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น.....13

1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....13

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....13

1.10 ขั้นตอนการวิจัย.....14

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....16

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....16

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....21

3.1 รูปแบบการวิจัย.....21

3.2 ประชากรศึกษา.....21

3.3 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....23

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....38
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....38
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....40
4.1 ผลการคัดเลือกประชากรเข้าศึกษาโดยการตรวจสอบ immunophenotype.....40
4.2 ผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ของวิธี IHC, ISH และ PCR.....50
4.3 ผลการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ของวิธี IHC, ISH และ PCR.....102
4.4 ผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR 107
ของแยกตามอวัยวะที่เกิด MALT lymphoma
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....114
5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....114
5.2 ข้อเสนอแนะ.....124
รายการอ้างอิง.....129
ภาคผนวก 133
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....135

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงชนิดและลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทดลองของ ต่อ human β-globin gene.......32
2. แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (invitrogen)..33
3. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อ human β-globin gene............................33
4. แสดงชนิดและลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทดลอง..34
ต่อ Immunoglobulin heavy chain gene rearrangement
5. แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (invitrogen)...35
6. แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ..35
ต่อ Immunoglobulin heavy chain gene rearrangement
7. แสดงข้อมูลของประชากรเป้าหมายที่ถูกคัดเลือกโดยลักษณะ immunophenotype...............40
8. แสดงการเปรียบเทียบผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ของทั้ง 3 วิธี 103
9. แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน orbit MALT lymphoma 107
ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR
10. แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน stomach MALT lymphoma 109
ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR
11. แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน small intestine MALT lymphoma 111
ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR
12. แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน บริเวณ อื่น ๆ 112
นอกเหนือจาก Gastrointestinal tact และ Orbit ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR
13. แสดง ผลสรุปการตรวจพบผลบวก monoclonality ของแต่ละวิธี 114
ใน MALT lymphoma ทั่วร่างกาย
14. แสดงผลการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ของ Hiroshi Inagaki และคณะ(A)..........116
เปรียบเทียบกับในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality
ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of
mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry,
polymerase chain reaction และ in situ hybridization (B)
15. แสดงผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ของ IHC, ISH และ PCR 118
ของแต่ละอวัยวะที่ตรวจพบ MALT lymphoma

ตารางที่ **หน้า**

16. แสดงผลการทดสอบทางสถิติ McNemar test……………………………………………..125

17. แสดงผลการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality…………………………………………126

ระหว่าง ISH คู่กับ PCR และ IHC คู่กับ PCR

18.แสดงการเปรียบเทียบ เวลาในการตรวจวินิจฉัยของแต่ละวิธี, ………………………………..126

ร้อยละผลบวก monoclonality และ ราคาในการวินิจฉัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1 แสดง ส่วนประกอบของ Immunoglobulin………………………………………………………..8

2.แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 3…….........…………………….50

3.แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 5…….........…………………….51

4 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 21………..…………………….51

5 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 29………..…………………….52

6 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 31………..…………………….52

7 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 36………..…………………….53

8 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 38………..…………………….53

9 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 41……………………………..54

10 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 44……..……………………..54

11 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 47……..……………………..55

12 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 55…….……………………...55

13 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 57…….………………………56

14 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 62…………………………...56

15แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 16…….……………………...57

16 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 22……...…………………...57

17 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 34…….……………………58

18 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 43…….……………………58

19 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 50…….……………………58

20 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 51…….……………………59

21 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 53……………………………..59

22 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 54……………………………..60

23 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 60……………………………..60

24 แสดง ผลการย้อม IHC kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 61…….……………………..61

25 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 3…….…………………………61

26 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 5…….…………………………62

รูปที่ **หน้า**

27 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 16..................................63
28 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 21..................................63
29 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 22..................................64
30 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 29..................................64
31 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 31..................................65
32 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 34..................................65
33 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 36..................................66
34 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 38..................................66
35 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 41..................................67
36 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 43..................................67
37 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 44.................................68
38 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 47.................................68
39 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 50.................................69
40 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 51.................................69
41 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 53.................................70
42 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 54.................................70
43 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 55.................................71
44 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 57.................................71
45 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 60.................................72
46 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 61.................................72
47 แสดง ผลการย้อม IHC IgG และ IgM ของผู้ป่วยหมายเลข 62.................................73
48 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin gene ของผู้ป่วยหมายเลข 13, ...74
หมายเลข 14, หมายเลข 27, หมายเลข 32, หมายเลข 33, หมายเลข41,
หมายเลข 48, หมายเลข 58, หมายเลข46 และ หมายเลข 50
49 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin gene ของผู้ป่วยหมายเลข 38, หมายเลข17, ...75
หมายเลข 44, หมายเลข 54, หมายเลข 55, หมายเลข 57, หมายเลข 43 และ หมายเลข 61

รูปที่ **หน้า**

50 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin geneของผู้ป่วย หมายเลข 15, หมายเลข 41..........76
หมายเลข 56, หมายเลข 59, หมายเลข 20, หมายเลข 21, หมายเลข 22, หมายเลข 34 และ
หมายเลข 53
51 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin geneของผู้ป่วยหมายเลข 49, หมายเลข 51, ...76
หมายเลข 35, หมายเลข 36, หมายเลข 15, หมายเลข 41, และ หมายเลข 29
52 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin gene ของผู้ป่วยหมายเลข 33, หมายเลข 33, ...77
หมายเลข 40, หมายเลข 37,หมายเลข 24 และ หมายเลข 24
53 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วยหมายเลข 16, หมายเลข 3, หมายเลข 10, หมายเลข 1...............77
หมายเลข 6, หมายเลข 9, หมายเลข 23, หมายเลข 27, หมายเลข 23 และ หมายเลข 17
54 แสดง แถบดีเอ็นเอต่อ human β-globin geneของผู้ป่วย 9, หมายเลข 23............,............78
หมายเลข 24, หมายเลข 45, หมายเลข 48, หมายเลข 31, หมายเลข 14, หมายเลข 14 และ
หมายเลข 14
55 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 38..............................79
56 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 46..............................80
57 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 35 และ 36.......................80
58 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 29..............................81
59 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 32..............................81
60 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 39..............................82
61 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 37..............................82
62 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 16 และ 3.......................83
63 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 5และ 9..........................83
64 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 17..............................84
65 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 42..............................84
66 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 49..............................85
67 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 50..............................85
68 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 51..............................86
69 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 75 และ 56......................86
70 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 57..............................87

รูปที่ **หน้า**

71 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วยหมายเลข 59……………………..87

72 แสดง แถบดีเอ็นเอ Ig gene rearrangement ของผู้ป่วหมายเลข 61…………………………88

73.แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 3……………………………89

74 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 5……………………………89

75 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 6……………………………90

76 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 21……….…………………90

77 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 29……….…………………91

78 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 31……….…………………91

79 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 33……….…………………92

80 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 36…………………………92

81 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 38……….…………………93

82 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 41…………………………93

83 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 44…………………………94

84 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 46…………………………94

85 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 47…………………………95

86 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 49…………………………95

87 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 55……..…………………96

88 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 57……..………………....96

89 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 62……..………………..97

90 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 16……….……………...97

91 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 22…………………………98

92 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 34…………………………98

93 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 40…………………………99

94 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 43…………………………99

95 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 50…………………………100

96 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 51…………………………100

97 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 53……..…………………101

98 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 54………..………………..101

รูปที่ **หน้า**

99 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 60……………………..……102

100 แสดง ผลการย้อม ISH kappa: Lambda ของผู้ป่วยหมายเลข 61……..…………………..102

101 แสดง ผลการเปรียบเทียบการย้อม ISH kappa: lambda เทียบกับผลการย้อม IHC kappa: lambda …120
และ การตรวจ IHC ต่อ heavy chain คือ IHC-IgM, IHC-IgG และ IHC-IgA

102.แสดงผลการเปรียบเทียบการย้อม ISH kappa: lambda เทียบกับผลการย้อม IHC kappa: lambda ……121
light chain restriction และยืนยันผลโดยการตรวจ IHC ต่อ heavy chain
ได้ผล (5)IHC-IgM+ และ (6) IHC-IgG -

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

IHC = Immunohistochemistry

ISH = In situ hybridization

PCR = Polymerase chain reaction

MALT lymphoma = Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa – associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) ที่นิยามจาก World Health Organization (WHO) ว่าเป็น Extranodal lymphoma ที่ประกอบไปด้วย B-cell ขนาดเล็กมีรูปร่างคล้าย marginal zone (centrocyte–like) cell, monocytoid B cell หรือ small lymphocyte และอาจมีเซลล์ขนาดใหญ่ปะปนมีรูปร่างคล้าย centroblast หรือ immunoblast [1] โดย MALT Lymphoma เกิดได้กับหลายอวัยวะ พยาธิสภาพที่เกิดแต่ละอวัยวะต่างกันไปบ้างแต่มีหลักการวินิจฉัย MALT Lymphoma ที่เยื่อบุผิว หลัก ๆ ดังนี้

1) **ลักษณะ lymphoma cell จะต้องพบ Marginal zone cell ซึ่งต้องมีลักษณะคล้าย centrocyte เรียกว่า centrocyte–like cell มีนิวเคลียสเล็กบิดเบี้ยว และเป็นร่องบนผนังนิวเคลียส มีไซโตพลาสซึมน้อย หรือมีเซลล์อีกชนิดเรียก monocytoid cell มีนิวเคลียสขนาดเล็กค่อนข้างกลมอยู่กลางเซลล์ มีปริมาณไซโตพลาสซึมปานกลาง**
2) **Lymphoepithelial lesion (LEL) เป็นรอยโรคที่มีลักษณะเฉพาะคือ เซลล์มะเร็งจะแทรกเข้าไปใน epithelium โดยจะแทรกผ่าน basement membrane ของ epithelium เข้าไปอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียก LEL โดยจะต้องพบเซลล์ของ Marginal zone B cell ตั้งแต่ 3 cell ขึ้นไป แต่ LEL ก็สามารถพบได้ในสภาวะอักเสบที่ไม่ใช่มะเร็งได้**
3) **Reactive lymphoid follicle พบในบริเวณใกล้เคียงกับ MALT lymphoma มีลักษณะ lymphoid follicle อาจเป็น follicle ทุติยภูมิปกติที่มี germinal center ใหญ่แล้วล้อมรอบด้วย Mantle zone หรือเป็น follicle ที่มีเซลล์ lymphoma แทรกเข้าไปเรียกว่า follicular colonization ในกรณีที่มี colonization ของเซลล์ lymphoma เข้าไปใน follicle ต้องแยกออกจาก follicular lymphoma [1, 2]**

ในปัจจุบันยังไม่มี immunophenotype marker ที่จำเพาะกับ MALT lymphoma

ลักษณะทางอณูพยาธิสภาพของ MALT lymphoma พบว่ามี clonal rearrangement ของ immunoglobulin (Ig) gene และมี somatic hypermutation ของ variable region ของ Ig gene ซึ่งเป็นการบอกถึงเซลล์ต้นกำเนิดของ MALT lymphoma ว่าเจริญมาจากเซลล์ในระยะ post germinal center B cell ในภาวะปกติการพัฒนาของ B lymphocyte follicle บริเวณ cortex ของต่อมน้ำเหลืองเกิดโดยการกระตุ้นของ antigen (Ag) ส่งผลให้เกิด somatic hypermutation ของ immunoglobulin gene ซึ่งถือเป็นลักษณะของ post germinal center B cell และใช้ในการแยก MALT lymphoma ออกจาก Small lymphocytic lymphoma ที่เกิด จาก naïve B cell ซึ่งยังไม่เกิด mutation [1, 2]

อุบัติการณ์ในประเทศไทยพบว่ามี MALT lymphoma พบประมาณ 4.2% ของ B cell lymphoma โดยตำแหน่งที่พบได้บ่อยคือ ทางเดินอาหาร (51%), เนื้อเยื่อบริเวณเบ้าตา (21%), ปอด (10.2%), ผิวหนัง (9.3%), ต่อมน้ำลาย (6.5%), thyroid (5.6%), Waldeyer ring (2.5%), เต้านม(1.9%) และตับอ่อน [1] จากการศึกษาด้าน histopathology ของ non-Hodgkin lymphoma (NHL) ในประเทศไทยโดยที่ได้รวบรวมข้อมูลจากโรงพยาบาลเชียงใหม่, สงขลา, ขอนแก่น, ราชวิถี, จุฬาลงกรณ์และพระมงกุฎเกล้าทั้งหมด 101 ราย พบว่าเป็น MALT lymphoma 6.13% ของ B cell lymphoma พบที่ stomach 50%, orbit 25% และ pulmonary 25% [3] เปรียบเทียบกับการศึกษาในโรงพยาบาลศิริราชของ gastrointestinal lymphoma (GI) แบ่งเป็น primary GI lymphoma (104 case) และ secondary GI lymphoma (16 case) พบว่ามีผู้ป่วย MALT lymphoma คือ 10.6 % ของ primary GI lymphoma พบใน Gastric 54.6% Intestinal 36.4% และ Multiple sites 9% [4]

จากที่กล่าวถึงลักษณะทางพยาธิสภาพของ MALT lymphoma ข้างต้นแล้วถ้าสามารถตรวจพบได้ตามลักษณะนั้น ๆ ได้ครบทุกลักษณะและมีความชัดเจนที่จะแยก Lymphoma cell ออกจาก Reactive cell ได้เลย การวินิจฉัย MALT lympohoma ก็คงไม่เป็นเป็นปัญหา แต่ในการปฏิบัติจริง พบว่าเกิดข้อจำกัดที่จะตรวจวินิจฉัยทางลักษณะของ Histomorphology และ immunophenotype คือ

1) การแยก Reactive lymphoid cell ออกจาก Lymphoma cell โดย histomorphology ได้ไม่ชัดเจน เนื่องจาก Reactive cell เป็น cell ขนาดเล็ก ที่

ดูคล้าย Lymphoma cell โดยเฉพาะ MALT lymphoma นอกจากนี้ทั้ง MALT lymphoma และ Reactive process ต่างมี lymphoid follicle ที่มี Germinal centerเหมือนกัน [1] แม้แต่ลักษณะ lymphoepithelial lesion ซึ่งเป็นลักษณะของ MALT lymphoma ยังไม่สามารถบอกได้อย่างแน่นอน เนื่องจากพบได้ในภาวการณ์อักเสบที่ไม่ใช่มะเร็งก็ได้ [2]

2) ลักษณะของ Immunophenotype ยังไม่มี marker ที่จำเพาะที่จะย้อมดูการแสดงออกของ protein เพื่อตัดสินว่าเป็น MALT lymphoma ได้เลย ได้แต่ย้อมเพื่อแยก immunophenotype ของ small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma และ follicular lymphoma ออกไป
3) ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีก้าวหน้ามากขึ้น เช่น endoscopic biopsy จึงทำให้การ biopsy ได้ tissue ที่มีขนาดเล็กเพื่อลดความเจ็บปวดของผู้ป่วยแต่ทำให้เห็น histomorphology ได้ไม่ครบทุกส่วนเนื่องจาก tissue มีปริมาณน้อย โดยเฉพาะไม่เห็นรอยโรค LEL หรือ reactive lymphoid follicle หรือแม้แต่เทคนิคที่ใช้ Fine – needle aspiration (FNA) cytology ที่นำมาตรวจ Lymphoma พบว่าเกิดปัญหา ในเรื่องของจำนวนเซลล์ที่ได้จากการนำมาตรวจเช่นกัน FNA จึงเป็นได้เพียง screening tool เพื่อนำไปสู่การวินิจฉัย lymphoma ที่ชัดเจน โดยตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิต่อไป [1, 2,5]
4) การตรวจทาง histomorphology เพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่สามารถบอกถึงการดำเนินไปของโรคหรือไม่ทราบการเปลี่ยนแปลงของ Reactive cell ไปเป็น Malignant lymphoma ได้ เช่น Sjogren’s syndrome (SS) ซึ่งเป็น autoimmune disease ที่มี generalzed lymphoproliferation มีโอกาสเสี่ยงอย่างมากที่ผู้ป่วยจะเกิดเป็น lymphoma ชนิด MALT lymphoma เพราะฉะนั้นการตรวจด้วย histomorphology เพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำนายได้ [6]

จากข้อจำกัดข้างต้นจึงทำให้การตรวจวินิจฉัย MALT lymphoma นั้นด้วย Histomorphology และ immunophenotype นั้นคงทำได้ยาก จึงนำไปสู่ การตรวจหา clonality ของ lymphoid cells เพื่อแยก lymphomacell ออกจาก reactive lymphoid cell พยาธิกำเนิดของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองเริ่มจากมีการกระตุ้น lymphoid cell กลายเป็น

transformed lymphoid cell และมีการเพิ่มจำนวนจาก clone ดังกล่าวเรียกว่า clonal expansion [1] ซึ่งจัดว่าเป็น monoclonal processเพราะพบว่าเซลล์มะเร็งใน lymphoma มีคุณสมบัติบางอย่างที่สำคัญเหมือนกันทุกประการ เช่นในกรณี MALT lymphoma ที่มีเซลล์ต้นกำเนิดเป็น B cell ที่สามารถผลิต Ig ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการในแต่ละเซลล์ เรียกว่า monoclonal Ig [1, 7] ในขณะที่ reactive lymphoid cells อยู่ในภาวะ polyclonal process โดยจะมีการเพิ่มจำนวน B cell มาจาก clone ต่าง ๆ ที่หลากหลายเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นจากหลากหลาย epitopes บน Ag นั้น โดย Ig ที่สร้างจากเซลล์จากหลาย clones นี้ เรียกว่า polyclonal Ig [1, 7]ภาวะ monoclonal process และ polyclonal process จะเกี่ยวข้องกับ Ig โดยมีรายละเอียดดังนี้

โครงสร้างของ Ig จะประกอบด้วย polypeptide 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สาย ที่มีลักษณะเหมือนกัน และ light (L) chain 2สายที่มีลักษณะเหมือนกัน โดย light chain จะมี 2 ชนิดคือ Kappa และ Lambda ส่วน heavy chain มี 5 ชนิดคือ Gamma (γ), Alpha (α), Mu (μ), Delta (δ) และ Epsilon (ε) และใช้แบ่งประเภท Ig เป็น IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ตามลำดับ Ig แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุล, การเรียงตัวของกรดอะมิโน, ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต, antigenic determinant และ คุณสมบัติทางชีวภาพ แต่ละสายของ L chain และ H chain มีส่วนประกอบที่มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ไม่คงที่เรียก variable (V) region และอีกส่วนที่กรดอะมิโนเรียงตัวคงที่คือ Carboxy terminal constant region [7] Ig gene มี H chain gene อยู่บนโครโมโซมที่ 14q32 โดย V region ของ H chain encoded จาก V (variable) gene 45 segments, J (joining) gene 6 segments, และ D (diversity) gene 23 segments, ส่วน C region ของ H chain encoded โดย 10 gene เรียงลำดับดังนี้ μ, δ, γ3, γ1, ε2, α1, γ2, γ4, ε1 และ α2 ส่วน K light chain gene อยู่บนโครโมโซมที่ 2p12 ประกอบด้วย V gene 35 segments และ J gene 6 segments กับ C_k gene 1 segments Lambda light chain อยู่บนโครโมโซม 22q11 มีการเรียงตัวของ V gene 30 segment และ J segment เรียงต่อกับ C_k segment 4 คู่ [5,8]ขั้นตอนการเจริญของ B lymphocyte ในอวัยวะปฐมภูมิ คือมีการจัดเรียงตัวใหม่ของ gene เรียก VDJ recombination นำไปสู่ความหลากหลายของการเรียงตัวของกรดอะมิโนบน V region ของ Ig ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับ

กับ Ag เพื่อเพิ่มความหลากหลายของ Ig ต่อ Ag ต่างกัน เมื่อเกิด clonal diversity ของ B lymphocyte จากการทำปฏิกิริยากับ antigen หลากหลายชนิดที่กระตุ้น B lymphocyte ทำให้เกิด mutation ของ V gene ของ H chain และ L chain เรียกว่า somatic hypermutation ถ้า Ig ที่มีปฏิกิริยาต่อ Ag ไม่ดี B lymphocyte clone นั้นจะถูกกำจัดโดย apoptosis แต่ถ้ามีปฏิกิริยาต่อ Ag ได้มากขึ้นจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell หรือ memory B cell กระบวนการคัดเลือกเซลล์นี้เรียกว่า clonal selection [9]

การแยก B cell lymphoma รวมถึง MALT lymphoma ออกจาก Reactive cell จะอาศัย clonal selection ดังนี้

Monoclonality จะแยกเป็น light chain คือจะมีการเลือกชนิดของ light chain เป็นชนิดเดียวคือ kappa หรือ Lambda chain เท่านั้น เรียก light chain restriction จะเป็น Lymphoma cell และ ในส่วนของ heavy chain rearrangement ของ V, D, J segment ที่มาชิดกันเป็น exon โดย lymphoma cell จะเกิดมาจาก clone เดียวกันของ lymphoma cell จึงตรวจพบว่าเกิดเป็นแถบหลังจากทำ PCR แล้ว 1 แถบ เรียกว่า monoclonal

Biclonality ในส่วนของ heavy chain rearrangement แล้วตรวจพบ 2 band จัดว่าเป็น Biclonalityจะเป็น lymphoma cell ที่เกิด rearrangement ของ Ig gene ในทั้งคู่ของ chromosome ที่เป็นตำแหน่งที่อยู่ของ gene จึงทำให้เกิดความยาวของ product ต่างกันจึงเห็นเป็น 2 band [10]

Oligoclonality ตรวจพบ 3 band ขึ้นไป เกิดจาก proliferation ของ clone ที่แตกต่างกันจากหลาย clone ที่เกิดความผิดปกติมีการกล่าวถึงว่าอาจเป็นจุดกำเนิดของ MALT lymphoma [10]

Polyclonality คือจะแยกเป็น light chain มีการเกิด light chain ได้ทั้ง Kappa และ Lambda จะเป็น Reactive cell โดย Reactive cell ปกติจะมีการเลือก Kappa: Lambda light chain เป็น 2:1ซึ่งอธิบายได้ด้วยโอกาสที่จะมี rearrangement ของ Ig kappa light chain gene ก่อน ซึ่งถ้าล้มเหลวจึงมี rearrangement ของ Ig lambda light chain gene ต่อไปในการเจริญของ B cell ต่อไป ในส่วนของ heavy chain rearrangement ของ V, D, J segment ที่มาชิดกันเป็น exon โดย reactive cell จะมีการ

ปะปนกันอยู่ของ หลาย ๆ clone จึงวัดผลหลังจากการทำ PCR แล้วพบเป็นหลาย ๆ แถบ หรือเป็นลักษณะ smear เกิดขึ้นเรียกว่า polyclonal [1]

คุณสมบัติของ Ig มีความสำคัญในการช่วยแยก Reactive cell ออกจาก Lymphoma cell ได้อย่างถูกต้องและแน่นอนกว่าการตรวจด้วย histomorphology ร่วมกับ immunophenotype สามารถนำไปสู่การตรวจพบ monoclonality ของ B cell lymphoma

สำหรับ paraffin embedded tissue สามารถตรวจหา clonality โดย 3 วิธีคือ immunhistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization โดยแต่ละวิธีจะมีรายละเอียดดังนี้

1. Immunohistochemistry

วิธี Immunohistochemistry (IHC) คือตรวจห Ag ที่สนใจที่จะพบได้ 3 บริเวณของ cell คือ ที่ cell membrane surface, cytoplasm และ nucleus โดยใช้การทำปฏิกิริยาการจับของ Antigen – antibody reaction แล้วใช้เทคนิคที่ทำให้เกิดสีเพื่อแสดงว่ามีการทำปฏิกิริยาหรือไม่ ถ้าใช้ chromogen ทำให้สามารถแปลผลด้วย light microscope ได้ IHC ที่ใช้ตรวจหา monoclonality ของ MALT Lymphoma นั้นสามารถตรวจย้อมเซลล์ ที่มี cytoplasmic immunoglobulin เพื่อดู light chain expression โดยถ้าเป็น Lymphoma cell จะติดเพียง Kappa หรือ Lambda light chain อย่างใดอย่างหนึ่งในทุก ๆ เซลล์ แต่ถ้าเป็น Reactive cell จะย้อมติด Kappa และ Lambda light chain ปะปนกันไปในกลุ่มเซลล์ [1]

การแปลผล IHC ที่ใช้ในการย้อม kappa และ lambda ใน tissue ที่สนใจจะอัตราส่วน kappa: lambda >10 คือ kappa restrictionหรือ kappa: lambda < 0.2 คือ lambda restriction เป็นอัตราส่วนการแปลผลที่ชัดเจนและน่าเชื่อถือมากที่สุด [11, 12]

IHC จะมีประโยชน์ในเรื่องของวิธีการที่สะดวก เพราะไม่ซับซ้อน โครงสร้างของเซลล์ และเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลาย จึงยังคงเห็นลักษณะของ histomorphology ของเซลล์อยู่ เมื่อนำมาใช้ในการตรวจหา immunoglobulin ซึ่งโดยปกติจะพบได้ทั้งที่ surface และ cytoplasm ของ B cell แต่ Ig ที่ผิวของเซลล์มักถูกทำให้เสื่อมโดย ฟอมร์มาลินทำให้ไม่สามารถตรวจสอบ surface Ig ได้ดังนั้นการตรวจโดยวิธี immunohistochemistry จึงมุ่งตรวจสอบ immunoglobulin ที่อยู่ใน cytoplasm เป็นหลักซึ่งมักพบใน B cell ที่มีการ

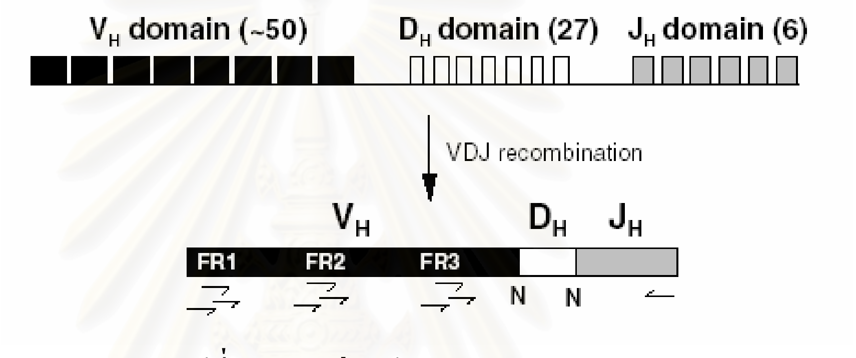
พัฒนาไปเป็น plasma cell [1] แต่ยังพบปัญหาในเรื่องของ background staining ซึ่งจะส่งผลต่อการแปลผล monoclonality

2. Polymerase chain reaction(PCR)

การตรวจหา monoclonality ของ B cell Lymphoma ที่ใช้วิธี PCR เป็นการตรวจหา rearrangement ของ IgH gene โดย IgH gene จะมีอยู่ในนิวเคลียสโดยจะเป็น gene ที่โมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วย segment ต่าง ๆ ที่ DNA sequence แบ่งออกเป็น V, D, J และ C segment [1, 7, 8] โดย V, D และ J gene segment จะเกี่ยวข้องกับการสร้าง variable region ของ IgH molecule และ C gene segment จะเกี่ยวข้องกับการสร้าง constant region ของ IgH molecule [1, 9] การจัดลำดับของ gene ใหม่ (rearrangement) เป็นการนำ V, D, J gene segment มาชิดกันเป็น exon ของ IgH gene เพื่อกำหนดการสร้าง variable region ของ IgH molecule [1]

ในการตรวจหา rearrangement ของ IgH gene ด้วย PCR จะอาศัยการออกแบบ primer ที่จับกับลำดับ nucleotide ที่พบใน V gene segment เป็น consensus region และ J gene segment [1, 13] โดยถ้าไม่มี rearrangement จะไม่สามารถสร้าง DNA ด้วย PCR เพราะ primer อยู่ห่างกันมากกว่า 1 kb PCR จึงสามารถช่วยแยก Reactive (polyclonal) ออกจาก Lymphoma cell (monoclonal) โดยสาย DNA ที่อยู่ระหว่าง primer ของ rearranged IgH gene ในแต่ละ reactive B cell มีความยาวไม่เท่ากัน เนื่องจากจำนวน nucleotide ที่อยู่ระหว่าง primer ไม่เท่ากัน โดยจะแยก Polyclonality ได้จากการที่ B cell มีหลาย clone เมื่อทำ PCR แล้วนำนิวคลีโอไทด์มาตรวจดูแถบ (band) จะพบเป็นลักษณะเป็นแถบเล็ก ๆ ยาว ๆ หลาย ๆ แถบ แต่ถ้าเป็น B cell lymphoma จะพบว่ามีการเกิดมาจาก B cell clone เดียวกัน เมื่อทำ PCR แล้วนำมาตรวจแถบของ IgH gene จะพบแถบเดียวอย่างชัดเจน [1, 7] PCR นั้นเป็นเทคนิคที่มี ร้อยละการตรวจพบ monoclonalityที่สูง แต่ยังไม่ใช่เทคนิคที่สมบรูณ์ในการนำมาตรวจวินิจฉัยในส่วนของ DNA เพื่อหา monoclonality ใน MALT Lymphoma เพราะ MALT lymphoma นั้นพบการเกิด somatic hypermutation ในส่วน ของ V gene [9] จึงทำให้ primer ที่เป็น consensus sequence ที่จำเพาะเกิด False negative ได้ในกรณีที่เป็น DNA ของ Lymphoma cell นั้นเกิด mutation ขึ้น ผลที่ตรวจสอบได้จึงเป็น polyclonality [9]

โดยในส่วนของ V_H จะประกอบไปด้วย 3 framework (FR) region และ 2 ส่วนของ complementarily-determination region (CDRs) .ในขณะที่ FRsพบการเปลี่ยนแปลงน้อย ในส่วนของ heavy chain และ light chain ในขณะที่ CDR มีหน้าที่สำคัญในการจับกับ antigen จึงมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนนี้มากกว่าใน framework region และ CDR จึงเป็นส่วนที่เกิด somatic hypermutationได้มากกว่า แต่ในส่วนของ framework region มีโอกาสเกิด somatic hypermutation ได้น้อยกว่า แต่ก็เกิด mutation ได้โดยมักเกิด nucleotide substitution ได้



รูปที่ 1 แสดง ส่วนประกอบของ Immunoglobulin

ในการทำ PCR จะใช้ V_H consensus primer ของ FR 3 เพราะว่าเป็นช่วงที่อยู่ใกล้กลับส่วน ของ J_H V_H มากที่สุดดังรูปที่ 1 เนื่องมาจาก specimen ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ผ่านการแช่ใน ฟอมร์มาลิน จึงทำให้จำเป็นที่จะต้องลดความยาวของ product ลงเพื่อให้ เกิด amplification ของ product ได้จึงเลือกใช้ primer ที่จำเพาะกับ FR 3 ของ V_H เพราะเป็นช่วงที่อยู่ใกล้กันมากที่สุด แต่ก็มีข้อเสียที่เกิดขึ้นได้เพราะ product ไม่ครอบคลุมทุกส่วนของ heavy chain [14] ลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทดลองคือ

FR3A 5’-ACA CGG C(CT) (GC) TGT ATT ACT GT-3’ เป็น primer ที่จับในส่วนของ V_H consensus [13]

LJH 5’-TGA GGA GAC GGT GAC C-3’ เป็น primer ที่จับในส่วนของ J_H consensus [13]

Product จะอยู่ในช่วง 70-140 bp โดยได้ทำการทดลอง Blast primer คู่นี้ใน http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast แล้ว ได้ (request ID ของ FR3A คือ 1164598529-30808-

19-223866979 และ The request ID ของ LJH คือ 1164598142-12380-139742006359) ปรากฏว่าสามารถจับกับ Ig gene ได้จริงในหลาย ๆ ฐานข้อมูล

3. In situ hybridization mRNA Kappa and Lambda

In situ hybridization (ISH) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาลำดับ nucleic acid ของ DNA และ RNA ของเซลล์ต่าง ๆ โดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลาย ในส่วนของงานวิจัยนี้ใช้ส่วนของ RNA สายเดียวติดฉลาก (labeled single – stranded fragment of RNA) เรียก labeled probe ที่มีการเรียงตัว nucleotide ที่เป็น complementary กับ RNA เป้าหมาย เกิด hybrid ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม [15]

การแปลผล In situ hybridization (ISH) ที่ใช้ในการย้อม kappa และ lambda ใน tissue ที่สนใจจะอัตราส่วน kappa: lambda >10:1 คือ kappa restrictionหรือ kappa: lambda < 0.2 คือ lambda restriction เป็นอัตราส่วนการแปลผลที่ชัดเจนและน่าเชื่อถือมากที่สุดนับอย่างน้อย 500 เซลล์ [11, 12]

มีการพัฒนามาใช้ probe ที่เป็น non – radioactive เพื่อตรวจหา monoclonality โดยใช้ biotinylated synthetic oligonucleotide probe ที่มีความจำเพาะกับ kappa หรือ Lambda mRNA เพื่อตรวจวินิจฉัยของ 2 immunocytochemical ที่เกิด signal ชัดเจนบริเวณที่เป็น specific localization ของการ hybridization ของเซลล์ที่ตรวจพบ จึงนำไปใช้ประโยชน์ในกรณีที่ morphology ไม่สามารถแยกระหว่าง polyclonal และ monoclonal plasma cell [16] In situ hybridization ที่มีการปรับปรุง probe ให้ดีขึ้น ยังสามารถนำไปวินิจฉัยในส่วนของ Plasma cell, germinal centrocyte, centroblast และ immunoblasts ใน formalin – fixed and paraffin – embedded section ของ Lymphoid tissue ได้ โดยถือเป็นการยืนยันถึง specific และ sensitivity ของการตรวจหา kappa หรือ lambda light chain restriction ใน Ig light chain mRNA ของเซลล์ [17]และเมื่อนำ In situ hybridization มาหาความสัมพันธ์ของ Sjogren' syndrome (SS) กับการกลายเป็น MALT lymphoma โดยพบผลบวกของ light chain restriction 7/14 case ของ SS คือ 5 case เป็น Kappa light chain restriction (อัตราส่วนคือ kappa : lambda คือ >8.0) และ 2 case เป็น lambda light chain restriction (อัตราส่วนคือ kappa : lambda คือ <0.6) และผลบวก monoclonality ใน 5 case มีการพัฒนาไปเป็น lymphoma โดย 4/5 case เป็น low grade lymphomas ของ

MALT และมี 1 คนตายจากการแพร่กระจายของ cell Lymphoma จึงกล่าวได้ว่า In situ hybridization เป็นเครื่องมือในการทำนายการดำเนินไปของโรค SS [6]นอกจากนี้ In situ hybridization (ISH) ยังมีข้อดีคือสามารถตรวจผล Ig light chain mRNA ด้วย light microscopic โดยวิธีการคือจะใช้ biotinylated tyramine signal amplification ร่วมกับ streptavidinbiotin horseradish peroxidase complex และ detection ด้วย 3 – 3'diaminobenzidine พบว่าเป็นวิธีที่สะดวกและเสร็จทุกขั้นตอนภายใน 1 วัน และถ้าขั้นตอนสุดท้าย counterstain ด้วย hematoxylin จะประเมิน cellular morphology ได้อีก [18] การศึกษาใน primary gastric MALT lymphoma ทั้งหมด 9 case ตรวจพบผลบวก monoclonality 5/9 คิดเป็นร้อยละ 55 [19] นอกจากนี้เทคนิคIn situ hybridization (ISH) ยังสามารถใช้ specimen จาก fine-needle aspiration (FNA) ได้พบผลบวก monoclonality คิดเป็นร้อยละ 80 ของ B cell lymphoma [20]

In situ hybridization เป็นการตรวจวินิจฉัยในส่วนของ mRNA ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาในเรื่องของ background stain ที่พบในการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry และขจัดปัญหา ของ somatic hypermutation ที่เกิดกับ variable part ที่ primer จับในการตรวจวินิจฉัยด้วย PCR แต่ in situ hybridization ก็มีข้อจำกัดเนื่องจาก mRNA ไม่สามารถอยู่ใน cytoplasm ได้นานและ B cell ไม่ได้ มีการสร้าง mRNA ของ immunoglobulin ตลอดเพราะฉะนั้นถ้าไปตรวจในระยะที่ไม่มี cytoplasmic Ig ก็จะตรวจวินิจฉัยไม่ได้

จากการตรวจหา monoclonality process ใน MALT lymphoma ด้วยวิธี Immunohistochemistry, Polymerase chain reaction(PCR) และ In situ hybridization (ISH) นั้นมีการตรวจหา monoclonality ในส่วนที่แตกต่างกันของเซลล์ คือ immunohistochemistry จะตรวจในส่วนของ protein, polymerase chain reaction จะตรวจในส่วนของ DNA ที่อยู่ในนิวเคลียสและ In situ hybridization (ISH) ตรวจในส่วนของ mRNA ที่จะถูก transcription ออกมาอยู่ใน cytoplasm จึงทำให้ทั้ง 3 วิธีมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันไป และเมื่อต้องการให้ผลการตรวจ monoclonality ให้ได้ร้อยละของผลบวกมากที่สุดใน MALT lymphoma ในรายที่ไม่สามารถวินิจฉัยด้วย histomorphology และ immunophenotype ได้ จึงนำไปสู่การทำวิจัยครั้งนี้ที่ต้องการทราบว่า ทั้ง 3 วิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น วิธีใดจะตรวจร้อยละของผลบวก monoclonality

ได้มากที่สุดในผู้ป่วย MALT lymphoma เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยที่รวดเร็วและลดปัญหาในเรื่องของการให้การรักษาผู้ป่วยที่ไม่เหมาะสม

1.2 คำถามของงานวิจัย (Research Question)

วิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridizationวิธีใดจะให้ร้อยละการตรวจ พบ monoclonality ในผู้ป่วย MALT lymphoma มากที่สุด

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

เพื่อเปรียบเทียบร้อยละในการตรวจหา Monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa – associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) ระหว่างวิธีimmunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization

1.4 สมมติฐานของงานวิจัย (Hypothesis)

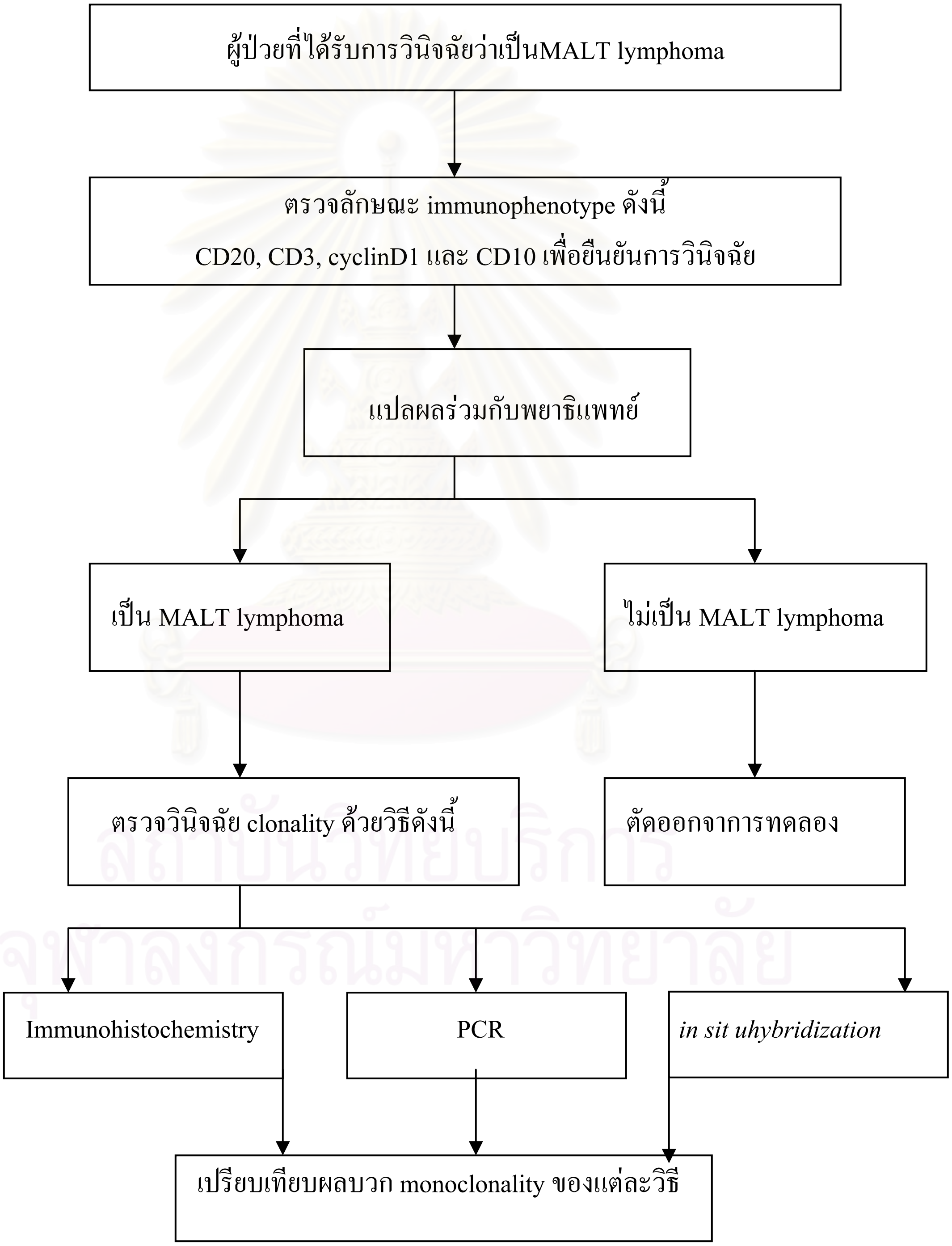
***In situ hybridization* น่าจะเป็นวิธีที่มีร้อยละในการตรวจพบผลบวกของ monoclonality ใน MALT lymphoma ได้ดีที่สุด เหตุผล เนื่องมาจาก**

1. **immunohistochemistry จะประสบปัญหาในเรื่องของ background ที่เกิดจาก serum ในการ biopsy จึงทำให้การแปลผลทำได้ยาก และจะแปลผลได้เฉพาะใน plasma cell differentiation เพราะ specimen ผ่าน formalin จึงทำให้ไม่สามารถแปล surface Ig ได้**
2. **polymerase chain reaction อาจให้ผลลบเนื่องจาก MALT lymphoma เป็น lymphoma ชนิดที่เกิด somatic hypermutation ในส่วนของ variable part ของ Ig gene ซึ่งเป็นส่วนที่ primer จับ ซึ่งถ้าเกิด mutation ขึ้นจะทำให้เกิด false negativeใน case นั้น ๆ รวมถึง MALT lymphoma เป็น lymphoma ชนิดที่มี reactive cell แทรกอยู่ระหว่าง lymphoma cell จึงทำให้ tissue ที่จะนำมาทำ PCR มีทั้ง reactive cell และ lymphoma cell ถ้าเกิดกรณีที่ reactive cell มากกว่า lymphoma cell จะได้ผลเป็น polyclonal บดบัง monoclonal**

จึงนำไปสู่เทคนิค *In situ hybridization* ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยในส่วนของ mRNA ที่อยู่ภายใน cytoplasm ของ cell จึงน่าจะเป็นวิธีที่ตรวจวินิจฉัยใน lymphoma cell ได้โดยไม่จำเป็นต้องตรวจในส่วน plasma cell differentiation เพียงอย่างเดียวเหมือน IHC และลดปัญหาในเรื่องของ background stain ได้ด้วยรวมถึง

ในกรณีที่ DNA transcription เป็น mRNA แล้วเกิด mutation ในช่วง post transcription แล้วไม่ translate เป็น protein จึงไม่สามารถตรวจได้ด้วย IHC นอกจากนี้ยังไม่สามารถตัดปัญหาเรื่อง hypermutation ของ variable part ออกไปได้

1.5 กรอบแนวคิดของงานวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ผลการทดลอง

1.6 ขอบเขตของงานวิจัย

1. **ในการทำวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาในผู้ป่วยชาวไทยที่มารักษาตัวที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma ที่อวัยวะใด ๆ ก็ตามในร่างกายจำนวนทั้งสิ้น 44 ราย**
2. **ตรวจลักษณะ immunophenotype เพื่อยืนยันผลการตรวจวินิจฉัย**
3. **ทำการศึกษาเพื่อตรวจหาผลบวก monoclonality ด้วย 3 วิธีดังนี้ Immunohistochemisty, PCR และ *in situ hybridization* และเปรียบผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ทั้ง 3 วิธีเพื่อหาวิธีที่ดีที่สุดเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยต่อไป**

1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. **Kappa restriction ผลการย้อมติด kappa : lambda light chain >10 จะเรียกว่า Kappa restriction**
2. **Lambda restriction ผลการย้อมติด kappa : lambda light chain < 0.2 จะเรียกว่า lambda restriction**
3. **Monoclonal ต่อ heavy chain นำ products ที่ได้จาก PCR มาวิ่งบน polyacrylamide gel ดูผลโดยใช้แสงUV.การแปลผล ถ้าขึ้น 1-2 แถบ อย่างคงที่ 2 ใน 3 dilutions แปลว่าเป็น monoclonality**
4. **Polyclonal ต่อ heavy chains นำ product ที่ได้จาก PCR มาวิ่งบน polyacrylamide gel ดูผลโดยใช้แสงUV.การแปลผลถ้าขึ้นมากกว่า2 แถบแปลว่า polyclonality**

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. **เป็นการทำวิจัยเพื่อใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดในการปฏิบัติงานจริงของการวินิจฉัย MALT lymphoma**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **นำไปสู่ ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเลือกใช้วิธีที่ตรวจพบ monoclonality สูงในการวินิจฉัย MALT lymphoma ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการบำบัดรักษาและติดตามโรคของผู้ป่วยตามความเป็นจริง**

1.10 ขั้นตอนการวิจัย

1. **การเก็บตัวอย่าง (Sample Collection)ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในการประชุมครั้งที่ 16/2549 วันที่ 8 สิงหาคม 2549**
   - **ผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปี พ.ศ. 2544 ถึง 2549 ที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) อย่างน้อย 34 ราย**
   - **วัตถุตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิจัยคือชิ้นเนื้อของผู้ป่วยดังกล่าวได้จากการทำผ่าตัดแล้วนำมาส่งตรวจที่ภาควิชาพยาธิวิทยาจัดเก็บในรูป paraffin blocks**
   - **การคัดเลือกออกคือ กรณีที่ตรวจ immunophenotype แล้วไม่เป็น MALT lymphoma และกรณีที่ไม่มี specimen ที่เป็น paraffin block เหลืออยู่**
2. **ขั้นตอนการศึกษา (process of study)**
   1) **Immunohistochemistry**
   2) **PCR**
   3) ***In situ hybridization***
3. **รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล (Data collection)**

   เก็บข้อมูลของ Specimen ดังนี้
   - **Pathology Number**
   - **Hospital number (HN)**
   - **ชื่อ,นามสกุลผู้ป่วย**
   - **Organ ของ specimen**
   - **Diagnosis**
   - **ผลการทดลองในการย้อม H&E**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- **ผลการทดลองในการย้อม IHCของ marker(CD20, CD3, Cyclin D1, CD43)**
- **ผลการทดลองในการย้อม IHCของ kappa : lambda**
- **ผลการทดลอง ISH ของ kappa : lambda**
- **ผลการทดลอง polymerase chain reaction ต่อ immunoglobulin gene ในส่วนของ heavy chain**
- **ผลการทดลอง ทำ polymerase chain reaction ต่อ human β globin gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ DNA และ PCR inhibitor**

4. วิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. หลังจากรวบรวมผลการทดลองทั้งหมดแล้วคำนวณหาร้อยละของ ผลบวก monoclonality จาก

$$\frac{\text{จำนวนที่ตรวจพบผลบวก monoclonality}}{\text{จำนวน Specimen ทั้งหมด}}$$

2. นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกันทั้ง 3 วิธี โดยใช้สถิติ Cochran test ซึ่งเป็นการทดสอบทางสถิติที่ใช้กับข้อมูลเชิงลักษณะ (Categorical data) เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบ 3 วิธี ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าทั้ง 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

Extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa-associatedlymphoid tissue (MALT lymphoma) เป็น extranodal lymphoma ที่ประกอบด้วย B cell ขนาดเล็ก ได้แก่ marginal zone (centrocyte-like) cell, monocytoid B cell, small lymphocyte และยังมี cell ขนาดใหญ่ปะปนได้ จัดเป็น lymphoma ชนิดที่ lymphoma cell แทรกปนอยู่กับ Reactive cell มักพบรอยโรคที่เฉพาะคือ มี lymphoma cell แทรกตัวผ่าน epithelium และผ่าน basement memebrane ของ epithetlium เข้าไปอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียก lymphoepithelial lesion (LEL)ในการวินิจฉัย MALT lymphoma ถ้าพบลักษณะของ histomorphology ที่ชัดเจนครบทุกลักษณะของรอยโรคก็จะไม่มีปัญหาในการวินิจฉัยแต่เนื่องจากการ biopsy ที่ได้ tissue ขนาดเล็ก จะทำให้ได้ histomorphology ไม่สมบรูณ์จึงต้องหาวิธีอื่นเข้ามาช่วยในการวินิจฉัยโดการดู immunophenotype แต่เนื่องจาก MALT lymphoma ยังไม่มีลักษณะ immunophenotype ที่ชัดเจนทำได้แค่เพียงตัด lymphoma ชนิดอื่นออกไปเท่านั้น จึงต้องเลือกวิธีวินิจฉัย clonal ของ immunoglobulin gene ที่มี clonal rearrangement และพบว่า MALT lymphoma เป็น lymphoma ชนิดที่เกิด somatic hypermutation ของ variable ได้จึงต้องเลือกวิธีที่จะตรวจหาผลบวก monoclonality ให้ได้ผลบวกมากที่สุด สามารถตรวจได้ทั้งในส่วนของ heavy chain และ light chain ของ immunoglobulin gene และมีวิธีที่จะตรวจวินิจฉัย clonality ดังนี้ คือ immunohitochemistry(IHC), polymerase chain reaction(PCR) และ *in situ hybridization*(ISH)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีงานวิจัยที่กล่าวถึงการตรวจวินิจฉัย Lymphoma คือ immunohistochemistry, polymerase chain reaction (PCR) และ *in situ hybridization*(ISH)

การศึกษาใน MALT lymphoma โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหา monoclonality ใน frozen sample เปรียบเทียบกับใน paraffin wax

embedded tissue ผลการทดสอบสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 86 ใน frozen และใน paraffin wax embedded พบผลบวก monoclonality ร้อยละ 60 [21]

- **Sanya Sukpanichnant และคณะได้ทำการศึกษาในปี 1993 เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบ sensitivity ของ simple PCR และ seminested PCR ในการตรวจวินิจฉัย B cell clonality ใน paraffin embedded endoscopic biopsy จากคนไข้ primary GI lymphoma of MALT type 7 รายพบว่า การใช้ seminested PCR techniques ใน paraffin embedded endoscopic biopsy มี sensitivity ร้อยละ 75 (5/7) และ Simple PCR techniques มี sensitivity ร้อยละ 57 (4/7) [22]**

- **Rose C. และคณะได้ทำการศึกษาในปี 2003 เพื่อตรวจหา monoclonal B cells ด้วยวิธี IHC, flow cytometry และ ISH (automate) โดยคัดเลือกประชากรเป้าหมายทั้งหมด 3 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น MZL 3 ราย และ การแปลผลใช้สัดส่วนดังนี้ kappa:lambda >10 จัดเป็น kappa restriction หรือ kappa:lambda <0.2 จัดเป็น lambda restriction ผลการทดลอง IHC สามารถตรวจสอบผลบวก monoclonality ได้ 2/3 หรือคิดเป็นร้อยละ 66.7 และ ISH ตรวจสอบผลบวก monoclonality ได้ 3/3 หรือคิดเป็นร้อยละ 100 จึงอาจกล่าวได้ว่า Automate CISH สามารถแปลผลได้ง่ายและดีกว่า IHC เนื่องจากตัดปัญหาในเรื่องของ background ออกไป จึงสรุปได้ว่า IHC เป็นเทคนิคที่ตรวจหา monoclonality cytoplasmic Ig แต่จำเป็นจะต้องมีการ express ปริมาณที่สูง และยังมีผลกระทบจาก non specific ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ stroma และการ degenerate ของ tissue ร่วมอีก จึงทำให้เห็นว่า IHC ไม่เหมาะที่จะใช้กับ fixed paraffin embedded tissue แต่เหมาะที่จะใช้กับ frozen lymphoid tissue ในขณะที่ ISH ที่เลือก probe ที่จำเพาะกับ kappa และ lambda light chain เป็นวิธีที่ให้ผลดีมาก เนื่องจากตรวจวินิจฉัย Ig-producing cell ซึ่งผลที่ได้จะถูกต้องและน่าเชื่อถือมากเพราะขจัดปัญหาในเรื่องของ background โดยผลที่ได้จากการทดลองไม่แตกต่างกันระหว่าง paraffin embedded tissue และ frozen tissue จากผลการทดลองที่ปรากฏจึงทำให้เห็นว่าน่าจะใช้ Automated CISH ในการทดสอบหลังจากที่ Ig IHC ไม่ประสบผลสำเร็จหรือแปลผลการย้อมไม่ได้เนื่องจากเกิด high background[12]**

- **Hiroshi Inagaki และคณะได้ทำการศึกษาในปี 1995 เพื่อเปรียบเทียบการวินิจฉัย monoclonality ใน ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็น low grade MALT lymphoma ใน stomach 10 ราย ด้วย 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR เนื่องจากผลการวินิจฉัยด้วย Histomorphology อย่างเดียวค่อนข้างยากเพราะการ biopsy ตัวอย่างจะมีขนาดเล็กและมักจะมี neoplastic และ reactive lymphoid cell อยู่ร่วมกัน โดย IHC เป็นวิธีที่ตรวจสอบ light chain restriction ที่สะดวกแต่เหมาะที่จะใช้กับ fresh tissue มากกว่า tissue process เนื่องจากจะส่งผลต่อการแปลผล monoclonality เพราะจะแปลผลได้เฉพาะ intracytoplasmic immunoglobulin ในขณะที่วิธี ISH ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัย B cell lymphoma โดยการตรวจวินิจฉัย mRNA ใน formalin-fixed paraffin embedded และสุดท้ายคือเทคนิค PCR จะใช้ diversity ของ immunoglobulin heavy-chain (IgH) gene จะเลือกใช้ primer ที่เป็น consensus V และ J region มีลำดับเบสดังนี้**

Fr3 5’ ACACGGC(C/T)(G/T)TGTATTACTGT 3’

LJH 5’ TGAGGAGACGGTGACC 3’

VLJH 5’ GTGACCAGGGT (N) CCTTGGCCCCAG 3’

Product จะอยู่ในช่วง 80-150 bp ผลการทดลองของการศึกษานี้พบว่าเทคนิค IHC ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 4/10 หรือคิดเป็นร้อยละ 40 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 1 ราย เทคนิค ISH ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 5/10 หรือคิดเป็นร้อยละ 50 แยกเป็น kappa restriction 4 ราย และ lambda restriction 1 ราย และเทคนิค PCR ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 7/10 หรือคิดเป็นร้อยละ 70 จากผลการทดลองสรุปได้ว่า IHC เป็นวิธีที่มี sensitivity น้อยที่สุดจาก 3 วิธีเป็นเพราะการแปลผลมีปัญหาในเรื่องของ background มารบกวนและสามารถแปลผลได้ในเซลล์ที่เป็น intracytoplasmic immunoglobulin เท่านั้นจึงทำให้ sensitivity น้อย และเทคนิค ISH มี sensitivity น้อยกว่า PCR อาจเป็นเพราะ ISH ขึ้นอยู่กับจำนวน mRNA ที่ transcription ออกมา และเหตุผลในเรื่องของ RNA นั้นง่ายที่จะถูกย่อยด้วย RNase ที่อาจเกิดปฏิกิริยาได้ในระหว่าง processing specimen [23]

หลังจาก ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง แล้วพบว่า จากการศึกษาการตรวจวินิจฉัยใน Lymphoma แต่ละชนิดนอกจากการตรวจด้วย histomorphology จะมี 3 วิธีหลักในการให้ข้อมูลเพื่อวินิจฉัยคือ immunohistochemistry, polymerase chain reaction

และ in situ hybridization ซึ่งทั้งหมดไม่สามารถตอบคำถามงานวิจัยของเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization ได้ด้วยเหตุผลดังนี้

1. **จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดที่สืบค้นข้อมูลผ่านฐานข้อมูล www. Pubmed . com นั้นพบว่าไม่สามารถตอบคำถามของงานวิจัยได้มีเพียงงานวิจัยเดียวคือเรื่อง Monoclonality in gastric lymphoma detected in formalin-fixed, paraffin-embedded endoscopic biopsy specimens using immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction ที่ทำการศึกษาในปี 1995 เท่านั้นที่มีการเปรียบเทียบ 3 วิธีที่จะตรวจหาผลบวก Monoclonality แต่กลุ่มประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในเรื่องนี้เป็น Gastric lymphoma เพียงที่เดียว ไม่ได้มีการศึกษาใน MALT lymphoma บริเวณอื่น เนื่องจาก MALT lymphoma ที่เกิดขึ้นแต่ละตำแหน่งจะมี biology ที่แตกต่างกันจึงทำให้งานวิจัยเรื่องนี้ไม่สามารถขยายผลเพื่อที่จะนำไปใช้ได้ครอบคลุม และงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ผ่านมาจะเป็นการเปรียบเทียบเพียง 2 วิธีเท่านั้น**
2. **ในการศึกษาในแต่ละเอกสารงานวิจัยแต่ละเรื่องมีความแตกต่างกันในเรื่องของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่เลือกมาทำการศึกษาจึงทำให้ผลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เช่น diffuse large B cell lymphoma และ follicular cell lymphoma จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่เป็น MALT lymphoma เพื่อเลือกวิธีการตรวจหาผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดได้**
3. **วิธีการทดลองที่เคยมีการศึกษาแล้วในงานวิจัยที่ผ่านมาแตกต่างกับเทคนิคที่จะใช้ในการศึกษาวิจัยในเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization ดังนี้**

3.1 เทคนิค IHC และ ISH ที่ใช้ในการทดลองนี้จะใช้ Automate system (Ventana medical system) เพื่อขจัดปัญหาในเรื่องของ background และเพิ่มความ stable ของ ตัวอย่างเนื่องจากควบคุมเวลาในการย้อมสไลด์แต่ละแผ่นได้เท่า ๆ กัน

3.2 เทคนิค PCR ในทุก ๆ งานวิจัยที่ผ่านมาจะใช้เป็น seminested PCR เพื่อช่วยเพิ่ม yield ให้สูงขึ้นแต่ก็จะเกิดปัญหาในเรื่องของ contaminate และ nonspecific และมีค่าใช้จ่ายในการทดลองสูงขึ้นเนื่องจากจะต้องทำปฏิกิริยา 2 รอบจึงทำให้งานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization เลือกที่จะใช้ simple PCR เพื่อลดปัญหาที่เกิดใน seminested PCR แต่ simple PCR ก็ยังอาจมีการเกิด nonspecific band อยู่ได้แม้จะน้อยกว่า จึงต้องแก้ปัญหาโดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อเป็นการยืนยันการแปลผลการทดลองว่า band ที่เกิดขึ้นไม่ใช่ nonspecific band

จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะทำงานวิจัยครั้งนี้เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาผลบวก monoclonality ให้ได้ดีที่สุดใน MALT lymphoma

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบ Descriptive study ชนิด retrospective

3.2 ประชากรที่ใช้ศึกษา

ประชากรเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปี พ.ศ. 2544 ถึง 2549 ที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) อย่างน้อย 34 ราย

1) การคำนวณจำนวนประชากรคำนวณจาก การศึกษาในคน 2 กลุ่มที่ไม่เป็นอิสระ (Two related group) ชนิดข้อมูลนับ

$$n\ pair = [Z_{\alpha/2} \sqrt{P_1Q_1} + Z_\beta \sqrt{(P_2Q_2)}]^2 / (P_1-P_2)^2 \ [24]$$

มีวิธีการคำนวณดังนี้

กำหนดค่า $\alpha = 0.05$ และ $\beta = 0.20$

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ และ $Z_\beta = 0.84$

I. เปรียบเทียบระหว่างวิธี polymerase chain reaction และ in situ hybridization [13]

ISH มีเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 90% [P1], P1 = 0.90, Q1 = 0.10

PCR มีเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 62% [P2], P2 = 0.62, Q2 = 0.38

แทนค่าในสูตรจะได้ n = 13

II. เปรียบเทียบระหว่างวิธี in situ hybridization และ Immunohistrochemistry [12]

ISH มีเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 69% [P1], P1 = 0.69, Q1 = 0.31

IHC มีเปอร์เซนต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 46% [P2], P2 = 0.46, Q2 = 054

แทนค่าในสูตรจะได้ n = 34

III. เปรียบเทียบระหว่างวิธี polymerase chain reaction และ Immunohistrochemistry [23]

ISH มีเปอร์เซนต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 75% [P1], P1 = 0.75, Q1 = 0.25

IHC มีเปอร์เซนต์ที่ตรวจพบ monoclonality ในผู้ป่วยทั้งหมดที่เลือกมา 20% [P2], P2 = 0.20, Q2 = 0.80

แทนค่าในสูตรจะได้ n = 5

จึงใช้จำนวนประชากรที่นำมาศึกษาอย่างน้อย 34 คน

2) การคัดเลือกกลุ่มประชากรเพื่อศึกษาเลือกโดยไม่อาศัยทฤษฎีความน่าจะเป็น (non – probability sampling) แบบ Quota Sampling

I. เกณฑ์การคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria)

1. ค้นหาผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิในปี พ.ศ. 2544 ถึง 2550 ที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) ที่มี paraffin blocks

2. ค้นหา H&E stained slides ของผู้ป่วย นำมาดูเพื่อยืนยันและคัดเลือกตัวแทนชิ้นเนื้อที่เหมาะสม

3 .ค้นหา paraffin blocks ที่ตรงกับ slides ที่คัดเลือก

4. Review ผลการทดลองโดยพยาธิแพทย์ผู้มีความรู้ความชำนาญในการวินิจฉัย lymphoma ได้แก่ รศ. นพ. พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ ผศ. นพ. ธรรมธร อาศนะเสน เพื่อยืนยันการวินิจฉัยว่า case ที่เลือกมาเป็น MALT lymphoma จริงโดยดำเนินการตรวจสอบ marker ต่าง ๆ เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัยเดิมอีกครั้งเพื่อป้องกันการนำ case ที่ไม่ใช่ MALT lymphoma เข้ามาในการทดลองและจากการศึกษาทาง morphology แล้วพบว่าจะมี Lymphoma 2 ชนิดที่มีโอกาสเจอร่วมในการวินิจฉัย MALT lymphoma คือ

follicular lymphoma และ mantle cell lymphoma จึงเลือกใช้ immunophenotype ที่เป็นลักษณะจำเพาะของ lymphoma ทั้ง 2 ชนิดมาย้อม โดย primary antibody ทั้งหมดเป็นของ DAKO เพื่อเป็นการยืนยันผลการวินิจฉัยเดิมอีกครั้ง

- **ย้อม CD 20 เป็น marker ของ B cell**
- **ย้อม CD 3 เป็น marker ของ T cell**
- **ย้อม Cyclin D1 เพื่อแยก mantle cell lymphoma ออกจาก MALT**
- **ย้อม CD43 เพื่อแยก B cell malignancy [25]**

3) การวัดข้อมูลเป็นข้อมูลเชิงลักษณะ(Categorical data) ชนิด 2 กลุ่ม (monoclonal, non – monoclonal)เป็นแบบ Nominal scale

3.3 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. **Freezer -20°C**
2. **Refrigerator 4°C**
3. **Digital balance**
4. **pH meter**
5. **Microwave**
6. **Microscope with CCD camera**
7. **Water bath**
8. **Autopipet ขนาด 0.5-10 μl ,10-40 μl, 20-200μl และ 200-1000μl**
9. **Pipette tip:10μl, 100μl, 200μl, และ 1000μl**
10. **Vortex misetin**
11. **Forceps ปลายแหลม**
12. **Microtome**
13. **Hot air oven**
14. **Incubator**
15. **Hood**

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16. **Vertical Electrophoresis**
17. **Gel documentation**
18. **Thermal cycles**
19. **Microcentrifuge**
20. **Block /heater**
21. **Thermo–shaker**
22. **timer**
23. **Spectrophotometers**
24. **Parafilm**
25. **Glove**
26. **Stricker for label**
27. **Slide superfrost plus**
28. **Cover slip**
29. **Disposable microtome blade**
30. **VENTANA รุ่น BenchMark LT IHC/ISH Staining Module**

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. **Absolute ethanol**
2. **95% ethanol**
3. **70% ethanol**
4. **Xylene**
5. **Digestion buffer**
6. **protinase K**
7. **phenol-chloroform-isoamyl alcohol**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. **Chloroform**

9. **3M sodiumacitate**

10. **Ethidium bromide**

11. **20 base pair DNA ladder**

12. **. Polyacrylamide**

13. **Temed (Tetramethylethylenediamide)**

14. **10%APS (ammoniumpersulfate)**

15. **10X PCR buffer**

16. **Magnesium chloride**

17. **Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)**

18. **Oligonucleotide primers**

19. **Tag DNA polymerase**

20. **Genomic DNA samples**

21. **Autoclave H_2O (DW Dwase RNase)**

22. **EZ prep(Ventana)**

23. **SSC(Ventana)**

24. **cell conditioner#1 buffer (CC 1) (Ventana)**

25. **UV INHIBITOR (Ventana)**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26. **Primary antibody (kappa, lambda, CD20, CD3, CD10, cyclin D1,IgG และ IgM)**

27. **Reaction buffer (Ventana)**

28. **secondary antibody คือ UV HRP UNIV MULT(Ventana)**

29. **DAB (di-amino benzidine) (Ventana)**

30. **UV DAB H_2O_2 (Ventana)**

31. **Hematoxylin II (Ventana)**

32. **BLUING REAGENT (Ventana)**

33. **LCS (ligules coverslip) (Ventana)**

34. **TBE Buffer 5x**

35. **ISH-PROTEASE 2 (Ventana)**

36. **Probe คือ kappa หรือ lambda (Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled probe cocktails) (Ventana)**

37. **iVIEW ANTI-FLUOR (Ventana)**

38. **iVIEW-BLUE BIOT (Ventana)**

39. **iVIEW-BLUE SA-AP (Ventana)**

40. **iVIEW-BLUE ENHAN (Ventana)**

41. **iVIEW-BLUE NTB (Ventana)**

42. **Red stain II (Ventana)**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

43. Mounting media

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1) **ค้นหาผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิในปี พ.ศ. 2544 ถึง 2550 ที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa–associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) และมี paraffin blocks**

2) **Review ผลการทดลองเพื่อยืนยันการวินิจฉัยว่า case ที่เลือกมาเป็น MALT lymphoma จริงโดยดำเนินการตรวจสอบ marker ต่าง ๆ เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัยเดิมอีกครั้งเพื่อป้องกันการนำ case ที่ไม่ใช่ MALT lymphoma เข้ามาในการทดลองและจากการศึกษาทาง morphology แล้วพบว่าจะมี Lymphoma 2 ชนิดที่มีโอกาสเจอร่วมในการวินิจฉัย MALT lymphoma คือ follicular lymphoma และ mantle cell lymphoma จึงเลือกใช้ immunophenotype ที่เป็นลักษณะจำเพาะของ lymphoma ทั้ง 2 ชนิดมาย้อม โดย primary antibody ทั้งหมดเป็นของ DAKO เพื่อเป็นการยืนยันผลาการวินิจฉัยเดิมอีกครั้งเนื่องมาจากอาจมีการวินิจฉัยเดิมแล้วผิด ดังนี้**

   - **ย้อม CD 20 เป็น marker ของ B cell**
   - **ย้อม CD 3 เป็น marker ของ T cell**
   - **ย้อม Cyclin D1 เพื่อแยก mantle cell lymphoma ออกจาก MALT**
   - **ย้อม CD43 เพื่อแยก B cell malignancy [25]**

3) **นำตัวอย่างที่คัดเลือกได้มาทำการศึกษาดังนี้**

   1. **Immunohistochemistry (IHC) ด้วย VENTANA รุ่น BenchMark LT IHC/ISH Staining Module**

ขั้นที่ 1 Slide preparation

1) **นำชิ้นเนื้อที่อยู่ใน paraffin block มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 2-3 μm แล้วนำไปลอยบน น้ำกลั่น เพื่อให้ชิ้นเนื้อแผ่ตรึงจะทำให้เห็นเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น แล้วช้อนชิ้นเนื้อไว้บน slide plus**

2) **อบที่ 56 องศาเซลเซียส (°C) นาน 30 นาที**

3) **Deparaffinize และ Rehydrate ด้วย EZ prep หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 75 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที ล้าง EZ prep ออกด้วย SSC แล้วเติม EZ prepหลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 76 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที (Ventana)**

ขั้นที่ 2 Epitope retrieval, Block endogenous peroxidase and Block non - specific background

1) **ใช้ Heat-induced epitope retrieval (HIER)**
2) **บ่ม (incubate) ใน cell conditioner#1 buffer (Ventana) เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 95 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 8 นาที และเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
3) **ล้างด้วย Reaction buffer(Ventana) และ ลดอุณหภูมิลงเป็น 37 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที และเติม UV INHIBITOR (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที และล้างออกด้วย Reaction buffer อีกครั้ง**

ขั้นที่ 3 Antibody Application

1) **หยด primary antibody ที่จำเพาะกับที่ต้องการย้อมลงไป คือ kappa, lambda, CD20, CD3, CD10, cyclin D1,IgG และ IgM บ่ม (incubate) นาน 32 นาที**
2) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที 2 ครั้ง**
3) **หยด secondary antibody คือ UV HRP UNIV MULT (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 8 นาที**
4) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana)**

ขั้นที่ 4 Color Development

1) **เติม DAB (di-amino benzidine) (Ventana) กับ UV DAB H_2O_2 (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 8 นาที**
2) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana)**
3) **เติม UV COPPER (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
4) **ล้างด้วย Reaction buffer(Ventana)**
5) **Counterstain ด้วย Hematoxylin II (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
6) **Post- Counterstain ด้วย BLUING REAGENT (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
7) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana)**
8) **Mount slide**

ขั้นที่ 5 การแปลผลการทดลอง

1) **คือการตรวจหา antigen ที่สนใจคือ คือ kappa, lambda, CD20, CD3, CD10, cyclinD1, IgG และ IgM ที่จะติดในส่วนของ cytoplasm หรือ nucleus ของเซลล์**
2) **หา light chain restriction โดยดูผลว่าติดเพียง Kappa หรือ Lambda ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือไม่ ถ้าพบว่าติดชนิดเดียว (light chain restriction) แปลผลว่าเป็น monoclonal โดยมีเกณฑ์ดังนี้ Kappa: Lambda = > 10:1 หรือ Kappa: Lambda = < 0.2 [11, 12]**
3) **ถ้าย้อมแล้วติดทั้ง Kappa และ Lambdaไม่เป็นไปตามอัตราส่วน Kappa: Lambda = > 10:1 หรือ Kappa: Lambda = < 0.2 แสดงว่าเป็น polyclonal [11, 12]**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Polymerase chain reaction (PCR)

ขั้นที่1 การสกัด ดีเอ็นเอ(DNA extraction)

1) **นำชิ้นเนื้อที่อยู่ใน paraffin block มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 20 µm ให้ได้ปริมาณ 60 µm ใส่ลงใน Microcentrifuge tubeขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml)**
2) **Deparaffinize โดยเติม Xylene 800 ไมโครลิตร (µl) ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที**
3) **เท ส่วนใส (supernatant) ทิ้งเก็บตะกอนไว้**
4) **ทำซ้ำข้อ 2-3 อีก 3 ครั้ง**
5) **เติม 100% ethanol 800 ไมโครลิตร (µl)ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที**
6) **เท ส่วนใส (supernatant) ทิ้งเก็บตะกอนไว้**
7) **เปิดฝาแล้ววางลงบน thermo block โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง**
8) **เติม working Digertion buffer (Digertion buffer 1มิลลิลิตร (ml): protinase K(20 mg/ml) 100 ไมโครลิตร (µl)) 300 ไมโครลิตร (µl)**
9) **เขย่า 30 วินาที และปิดด้วย parafilm วางลงบน thremocycle shaker ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 53 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่งโมง**
10) **หยุดปฏิกิริยา (Denature) ของ protinase Kที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที**
11) **spin down โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลาสั้นๆ เพื่อให้ mixture ลงมารวมกันที่ก้นหลอด และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที**
12) **เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol 600 ไมโครลิตร (µl) เขย่าเป็นเวลา 45วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที**

13) **ดูดส่วนบนใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml)**
14) **ทำซ้ำข้อ 12-13อีก 2 ครั้ง**
15) **เติม Chroloform 500 ไมโครลิตร (μl) เขย่าเป็นเวลา 45วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที**
16) **ดูดส่วนบน (aqueous phase)ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml)**
17) **เติม 3M sodiumacitate 50 ไมโครลิตร (μl) เขย่าเป็นเวลา 45วินาที จากนั้นนำไปspin down โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลาสั้นๆ**
18) **เติม 1 มิลลิลิตร (ml)ของ 100% cold ethanol (-20องศาเซลเซียส) เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน**
19) **นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่งโมง**
20) **นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที**
21) **ดูด 100% cold ethanol ออก**
22) **เติม 1 มิลลิลิตร (ml)ของ 70% cold ethanol (-20องศาเซลเซียส) เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน**
23) **นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที**
24) **ดูด 70% cold ethanol ออก จนเหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ (DNA)**
25) **ระเหยแอลกอฮอล์ โดยวางใน Thermo-blockที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที**
26) **ละลายตะกอนดีเอ็นเอ (DNA) ด้วย น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร (μl) ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง**
27) **นำไปวัดเพื่อตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (DNA) และคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการใช้คือ 20 นาโนกรัม (ng), 40นาโนกรัม (ng), และ 60 นาโนกรัม (ng)**

ขั้นที่2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA)โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

1) ทำ PCR reaction ต่อ human β-globin gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA) ที่สกัดได้จากตัวอย่าง โดยใช้ primer ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดและลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทดลองของ ต่อ human β-globin gene [26]

Primer	Sequence	ทิศทาง
PC03	5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3'	Forward
PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'	Reverse

- **Product จะมีขนาด 110 bp โดยได้ทำการทดลอง Blast primer คู่นี้ ใน 1http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast แล้ว ได้ request ID ของ PC03 คือ 1164598685-560145938426990 และ request ID ของ PC04 คือ 1164598771-2573-1135082176979**
- **เตรียม mixture ตามตารางที่ 2**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (invitrogen)</u>

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา (ul)
น้ำกลั่น	-	18.625
10×buffer(5 Mg)	1 X	2.5
$MgCl_2$(50mM)	1.5 mM	0.75
10mM dNTPs	200 µM	0.5
PC03 (primer forward)	0.1 µM	0.25
PC04 (primer reverse)	0.1 µM	0.25
Taq	0.625 unit	0.125
DNA template	40 ng	2
ปริมาตรรวม	-	25

- **เขย่าให้เข้ากันแล้ว spin down โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลาสั้นๆ เพื่อให้ mixture ลงมารวมกันที่ก้นหลอด**
- **นำ mixture ที่ได้เข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะ ดังตารางที่**

<u>ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อ human β-globin gene</u>

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (ºC)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	94	5	1
Denature Annealing(touch down) Extension	94 65 ⟶ 59 72	0.40 0.30 1	7
Denature Annealing Extension	94 58 72	0.40 0.30 1	38
Final extension	72	10	1
Hold	4	∞	-

- **นำ PCR products ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 5X loading dye ปริมาตร 1 µl ไป run ใน 8% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ 140 volts และ 25 mA/gel 1 แผ่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที**
- **ย้อม gel ด้วย Ethidium bromide นาน 5 นาที**
- **Destain ด้วยน้ำกลั่น 3 นาที**
- **Product จะมีขนาด 110 bp ถ่ายรูปและบันทึกผลการทดลอง**

2) ทำ PCR reaction ต่อ Immunoglobulin heavy chain rearrangement โดยใช้ primer ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในการทดลอง ต่อ Immunoglobulin heavy chain gene rearrangement [13]

Primer	Specific	Sequence	ทิศทาง
FR3A	V_H	5'-ACA CGG C(C/T) (G/C) TGT ATT ACT GT-3'	Forward
LJH	J_H	5'-TGA GGA GAC GGT GAC C-3'	Reverse

- **Product จะอยู่ในช่วง 70-140 bp โดยได้ทำการทดลอง Blast primer คู่นี้ใน 2http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast แล้ว ได้ The request ID ของ FR3A คือ 1164598529-30808-19-223866979 และ The request ID ของ LJH คือ 1164598142-12380-139742006359**
- **เตรียม mixture ตามตารางที่ 5**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงอัตราส่วนของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (invitrogen)

	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยา (ul)
น้ำกลั่น	-	16.2
10×buffer(5 Mg)	1 X(1.5mM)	2.5
$MgCl_2$(50mM)	2.5 mM	1.175
10mM dNTPs	200 µM	0.5
FR3A (primer forward)	0.5 µM	1.25
LJH (primer reverse)	0.5 µM	1.25
Taq	0.625 Unit	0.125
DNA template	20 ng, 40 ng, 60 ng	2
ปริมาตรรวม	-	25

- **เขย่าให้เข้ากันแล้ว spin down โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเป็นเวลาสั้นๆ เพื่อให้ mixture ลงมารวมกันที่ก้นหลอด**
- **นำ mixture ที่ได้เข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะ ดังตารางที่ 6**

ตารางที่ 6 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อ Immunoglobulin heavy chain gene rearrangement

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initiation	94	5	1
Denature Annealing Extension	94 58 72	0.40 0.30 1	45
Final extension	72	10	1
Hold	4	∞	-

- **นำ PCR products ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 5X loading dye ปริมาตร 1 µl ไป run ใน 8% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ 140 volts และ 25 mA/gel 1 แผ่น เป็น เวลา 1 ชั่วโมง 20 นาที**
- **ย้อม gel ด้วย Ethidium bromide นาน 5 นาที**
- **Destain ด้วยน้ำกลั่น 3 นาที**
- **Product จะอยู่ในช่วง 70-140 bp ถ่ายรูปและบันทึกผลการทดลอง**

3. วิธี In situ hybridization for mRNA ด้วย VENTANA รุ่น BenchMark LT IHC/ISH Staining Module

ขั้นที่ 1 Slide preparation

1) **นำชิ้นเนื้อที่อยู่ใน paraffin block มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 2-3 µm แล้วนำไปลอยบน 25% alcohol เพื่อให้ชิ้นเนื้อแผ่ตรึงจะทำให้เห็นเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น แล้วช้อนชิ้นเนื้อไว้บน slide plus**
2) **อบที่ 56 องศาเซลเซียส (°C) นาน 30 นาที**
3) **Deparaffinize และ Rehydrate ด้วย EZ prep หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 75 องศาเซลเซียส (°C) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที ล้าง EZ prep (Ventana) ออกด้วย SSC แล้วเติม EZ prep (Ventana) หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 76 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**

ขั้นที่ 2 Pretreatment

1) **เติม ISH-PROTEASE 2 (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 8 นาที เพื่อ pretreatment cell**
2) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana)**

ขั้นที่ 3 Hybridization

1) **เติม Probe คือ kappa หรือ lambda (Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled probe cocktails)ลงไปและเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 85**

องศาเซลเซียส (°C) บ่ม (incubate) นาน 12 นาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงเป็น 47 องศาเซลเซียส (°C) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที และบ่ม (incubate) นาน 1 ชั่วโมง

2) **ล้างด้วย 2×SSC (Ventana) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C)บ่ม (incubate) นาน 4 นาที 3 ครั้ง**
3) **เติม iVIEW ANTI-FLUOR (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 20 นาที**
4) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana) 2 ครั้ง**

ขั้นที่ 4 Color Development

1) **เติม iVIEW-BLUE BIOT (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 8 นาที**
2) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana) 2 ครั้ง**
3) **เติม iVIEW-BLUE SA-AP (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 16 นาที**
4) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana) 2 ครั้ง**
5) **เติม iVIEW-BLUE ENHAN (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
6) **เติม iVIEW-BLUE NTB (Ventana) และ เติม iVIEW-BLUE BCIP บ่ม (incubate) นาน 32 นาที**
7) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana) 2 ครั้ง**
8) **Counterstain ด้วย Red stain II (Ventana) บ่ม (incubate) นาน 4 นาที**
9) **ล้างด้วย Reaction buffer (Ventana)**
10) **Mount slide**

ขั้นที่ 5 การแปลผลการทดลอง

1) **เป้าหมายในการตรวจสอบ Kappa และ Lambda (mRNA) mRNA probes complementary กับ kappa light chain และ Lambda light chain mRNAs**

2) หา light chain restriction โดยดูผลว่าติดเพียง Kappa หรือ Lambda ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือไม่ ถ้าพบว่าติดชนิดเดียว (light chain restriction) แปลผลว่าเป็น monoclonal โดยมีเกณฑ์ดังนี้ Kappa: Lambda = > 10:1 หรือ Kappa: Lambda = < 0.2 [11, 12]

4) ถ้าย้อมแล้วติดทั้ง Kappa และ Lambdaไม่เป็นไปตามอัตราส่วน Kappa: Lambda = > 10:1 หรือ Kappa: Lambda = < 0.2 แสดงว่าเป็น polyclonal [11, 12]

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลของ ตัวอย่าง ดังนี้

1. Organ ของ specimen
2. Diagnosis
3. ผลการทดลองในการย้อม H&E
4. ผลการทดลองในการย้อม IHCของ marker (CD20, CD3, Cyclin D1,CD43)
5. ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ kappa : lambda
6. ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ IgG และ IgM ในตัวอย่างที่ผลการย้อม IHC เกิด restriction light chain เพื่อยืนยันผลการทดลอง
7. ผลการทดลอง ISH ของ kappa: lambda
8. ผลการทดลอง polymerase chain reaction ต่อ human β globin gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ DNA และ inhibitor DNA
9. ผลการทดลอง polymerase chain reaction ต่อ immunoglobulin gene ในส่วนของ heavy chain

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หลังจากรวบรวมผลการทดลองทั้งหมดแล้วคำนวณหาร้อยละของผลบวก monoclonality จาก

$$\frac{\text{จำนวนที่ตรวจพบผลบวก monoclonality}}{\text{จำนวน Specimen ทั้งหมด}}$$

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกันทั้ง 3 วิธี โดยใช้สถิติ Cochran test ซึ่งเป็นการทดสอบทางสถิติที่ใช้กับข้อมูลเชิงลักษณะ (Categorical data) เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบ 3 วิธี ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าทั้ง 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการทดลองการคัดเลือกประชากรเข้าศึกษาโดยการย้อม immunohistochemistry เพื่อตรวจสอบลักษณะ immunophenotype ดังตารางที่ 7

<u>ตารางที่7 แสดงข้อมูลของประชากรเป้าหมายที่ถูกคัดเลือกโดยลักษณะ immunophenotype</u>

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
1	Soft tissue mass; immunohistology: - Malignant lymphoma, B-cell likely to be MALT lymphoma of soft tissue.******	No	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
2	Gastric biopsy: - Malignant lymphoma (non-Hodgkin's), small to medium sized cells, consistent with MALT lymphoma.** Duodenal biposy: - Malignant lymphoma (non-Hodgkin's), small to medium sized cells, consistent with MALT lymphoma.	cyclinD1+	หลังจาก review ทาง histomorphology ร่วมกับลักษณะทาง immunophenotype แล้วสรุปได้ว่าเป็น Mantle cell lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
3	Breast, excision; MALT lymphoma.	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
4	Right neck mass, incisional biopsy ; - Malignant lymphoma, morphologically compatible with MALT or monocytoid B-cell lymphoma.****	No	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
5	Left and right lobes of thyroid, subtotal thyroidectomy; Non hodgkin's lymphoma of the right lobe, partial involvement, morphologically consistent with MALT type.	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
6	Small intestine (segmental resection): - Malignant lymphoma (non-Hodgkin's), B-cell type, consistent with Low-grade MALT lymphoma involving small intestine and mesenteric lymph nodes (4/40). NOTE: 2545002801A: ' Gastric biopsy: - Malignant lymphoma (non-Hodgkin's), B-cell type, consistent with low-grade MALT lymphoma.	CD20+ CD3- cyclinD1- CD10-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
7	Rectum, biopsy: - Consistent with MALT lymphoma.****	CD20+,Cyclin D1+,CD3-	หลังจาก review ทาง histomorphology ร่วมกับลักษณะทาง immunophenotype แล้วสรุปได้ว่าเป็น Mantle cell lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
8	Gastric biopsy: - Atypical lymphoid infiltration.- Highly suggestive of MALT lymphoma.****	CD20-	หลังจาก review ทาง histomorphology ร่วมกับลักษณะทาง immunophenotype แล้วพบว่า CD20 ไม่สามารถ highlight sheet B cell ได้ดีเท่ากับ T cell แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
9	Lacrimal mass, right; -Atypical lymphoid infiltration, suggestive of MALT lymphoma. Immunohistochemical study is needed. Lacrimal mass, left; - Lymphoid aggregation, suggestive MALT lymphoma.	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
10	Lacrimal gland, right, excision: - Consistent with MALT lymphoma. See description****	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
11	Soft tissue, biopsy; -Malignant lymphoma, B-cell, low grade lymphoma of MALT type.****	No	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
12	Soft tissue, paravertebral, immunohistochemistry; - Malignant lymphoma, B-cell, possibly MALT lymphoma with large cell transformation. MT/PW****	No	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
13	Lacrimal gland, right (excision); - Malignant lymphoma, B-cell, extranodal of MALT type.****	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
14	Duodenum, immunostains: - Malignant lymphoma, B cell, low grade lymphoma of MALT type.****	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
15	Orbit lesion, cranitomy with near total removal; - Atypical B-cell proliferation, suggestive of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymphoma).Comment: Limitation of interpretation is due to degenerative artifacts of tissue	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
16	Mass Buccal space Extranodal marginal zone B-cell lymphoma (MALT lymphoma). CD3 - negative, CD5- negative, CD10 -negative, CD20- positive, CD23- negative, CD43- negative, CD 79a - positive, Cyclin D1 - negative.	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
17	Gastric biopsy (ulcer): - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-assoicated lymphoid tissue (MALT- lymphoma).****	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
18	Pleural biopsy: - Atypical B-lymphoid cells infiltration, most likely non-Hodgkin lymphoma B-cell type, small to medium sized cell.DDx: 1. Extranodal margin zone B-cell lymphoma, MALT type. 2. Lymphoplasmacytic lymphoma.****	No	เนื่องจากค้น Block และ slide ไม่เจอ จึงต้องตัดออกจากการทดลอง

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
19	Mass, left and right side base of tongue (incisional biopsy); - Atypical lymphoid infiltrate, compatible with extranodal marginal zone B-cell of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).****	No	เนื่องจากค้น Block และ slide ไม่เจอ จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
20	Orbital mass, BE (incisional biopsy): - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).****	CD20+ CD3- cyclinD1- Bcl2+	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
21	Left ethmoid sinus tissue: - Atypical lymphoplasmacytic cell infiltration, most likely extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymphoid) Left orbital mass: - Atypical lymphoplasmacytic cell infiltration, most likely extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymhoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
22	Small intestine (resection): - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue (MALT-lymphoma).****	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
23	Gastric, antrum (biopsy); - Non-Hodgkin lymphoma, diffuse large cell. Gastric , body (mass) (biopsy); - Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
24	Lacrimal gland, right, incisional biopsy: - Extranodal maginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).****	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
25	Mass, subconjucntiva (RE): - Lymphoproliferative disease, consistent with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).****	NO	เนื่องจากไม่มี block จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
26	Mass, right anticubital fossa of right arm (block No 828-47).; - Amyloid lymphadenopathy with atypical clonal lymphoplasmacytic B-cell proliferation.DDx 1. MALT-lymphoma. (extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue) 2. Lymphoplasmacytic lymphoma with increased immunoblasts	No	เนื่องจากไม่มี block จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
27	Lacrimal gland, right (biopsy): - Lymphoproliferative disorder, most likely extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoma tissue (MALT-lymphoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
28	Gastric biopsy: - Consistent with MALT lymphoma.	CD20+ CD3- cyclinD1-	หลังจาก review ทาง histomorphology แล้วไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น MALT lymphoma จึงต้องตัดออกจากการทดลอง
29	Eyelid, right lower (biopsy): MALT lymphoma (Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosal associated lymphoid tissue).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
30	Soft tissue from right eyelid, excision: - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymphoma)พ.อนพัช/พญ.พฐ/อ.ธรรมธร****	No	เนื่องจากไม่มี block จึงต้องตัดออกจากการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
31	Gastric biopsy (SP47-9473): - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymphoma).- Presence of bacterial organism, morphologically compatible with H.pylori.****	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
32	Lacrimal gland, left (SP47-10887): - Consistent with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-lymphoma).****	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
33	Lacrimal gland, right (excision): - Atypical lymphoid proliferation. DDx: 1 MALT lymphoma. 2 Reactive lymphoid hyperplasia.****	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
34	Soft tissue mass, left lower lid, excision (SP48-5514): - Consistent with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. (MALT lymphoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
35	Soft tissue mass, left lower eyelid(SP48-6279A) : - Non-Hodgkin lymphoma, B-cell diffuse mixed small and large cell, compatible with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associatad lymphoid tissue (MALT-lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
36	Skin, biopsy: - Mature B-cell neoplasm with maturation to plasma cell containing cytoplasmic lg. DDX. 1.Lymphoplasmacytic 2.MALT lymphoma with plasmacytic differenitiation. 3.Plasma cell neoplasm. 4.Follicular lymphoma with plasmacytic differentiation.	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
37	Ttissue, labelled left lacrimal gland, biopsy: - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucuosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
38	Salivary gland, submental, S-49-15688: - Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
39	Mass, cardia of the stomach, S-49-2917: - Atypical small B-lymphoid cell proliferation suggtive of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma).	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
40	Stomach, total gastectomy: -Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue of the stomach. (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
41	Tissue labelled "lacrimal gland" (right) incisional biopsy:extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
42	Mass, right upper eyelid, Monoclonal resul of PCR - based detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangment, Equivalent to extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
43	Mass, right breast S49-29677:extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
44	1 SOFT TISSUE (LEFT LOWER EYELID), submuscular mass, biopsy: Extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue(MALT lymphoma) No moclonal results of PCR - base detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement (FRIII) 2.Soft tissue (right lower conjunctival fornix), biopsy: Atypical B lymphoproliferation, mature small cell, suggestive but not diagnotic of extranodal marginal zone B - cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue(MALT lymphoma) No moclonal results of PCR - base detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement (FRIII)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
45	Mass, left lacrinal gland, incusional biopsy : Atypical B cell to medium B - cell, suggestive of extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
46	Mass, ring, orbit, incisional biopsy:Atypical lympholiferation, diffuse small B - cell, suggestive but not diagnotic of extranodal marginal zone b-cell lymphoma of mucosaassociated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+, CD3-, cyclinD1-, bcl2+	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
47	Gastric biopsy, paraffin block No S49-33761A, Extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa - associated lymphoid tissue(MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
48	Eye, right, incisional biopsy: Atypical small - to meedium - size lymphoid proliferation, suggestive of extranoda marginal zone b cell lymphoma mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
49	Skin, left side of neck Low grade B cell non Hodgkin lymphoma with plasmacytic differentiation, suggestive of primary cutaneous marginal zone B cell lymphoma	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
50	Lung (right lower lobe), transbronchial biopsy, paraffin block 484797:extranodal marginal zone b-cell lymphoma of mucosaassociated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
51	Soft tissue (left upper eye lid), S49-11332:Non-hodgkin lymphoma, diffuse small to medium-sized B-cell, suggestive of extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
52	Conjunctiva, right eye (salmon patch),S-50-2003: Atypical B-cell lymphoproliferation, small cell, suggestive of extranodal marginal zone B cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
53	Mass, left upper eyelid: Malignant lymphoma, likely to be low grade lymphoma of MALT type	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
54	Gastric biopsy, around PEJ: benign ulcer, Gastric biopsy; posterior curvature: Malignant lymphoma, consistent with MALT lymphoma	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

Number	Organ and Diagnosis	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	Conclusion
55	Soft tissue mass;left cheek; slide for review: Malignant lymphoma, most likely MALT lymphoma	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
56	Parotid mass, right:Suggestive of MALT lymphoma	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
57	Gastric biopsy(oxyntic): Atypical lymphomaplasmacytic infiltration, MALT lymphoma cannot be excluded, IHC is required	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
58	monoclonal result on polyclonal background of PCR - base dection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
59	Gastric biopsy: Mild chronic gastritis with atypical lymphoid cell infiltration, MALT lymphoma cannot be excluded, immunohistochemical staining may be helpful(S47-28621)Consistent with MALT lymphoma No H.pylori seen(S47-29130)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
60	Duodenal biopsy: Moderate acut erosive duodenitis, No malignancy seen, Gastric biopsy: Presence of atypical lymphoid cells, malignant lymphoma cannot be excluded, Immunohistochemical staining is required(S48-11749) Duodenal biopsy: Moderate acute erosive duo denitis Nomalignancy seen, Gastric biopsy MALT lymphoma(S48-11938)	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
61	Gastric biopsy: suspicious lymphoid infiltrate, probably reactive, Colonic biopsy (retum): Nonspecific chang, mild hyperplastic mucosa	CD20+ CD3- cyclinD1-	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype
62	Thyroid gland, right lobe: Non-Hodgkin lymphoma, medium size cell, immunophenotype study is required for futher classification	CD20+ CD3- cyclinD1	วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphoma หลังการตรวจทาง histomorphology และ immunophenotype

4.2 ผลการทดลองเพื่อตรวจหา monoclonality ทั้ง 3 วิธีที่ทำการศึกษาได้ผลดังนี้

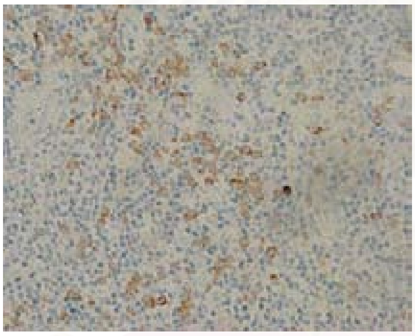
1. ผลการทดลอง immunohistochemistry

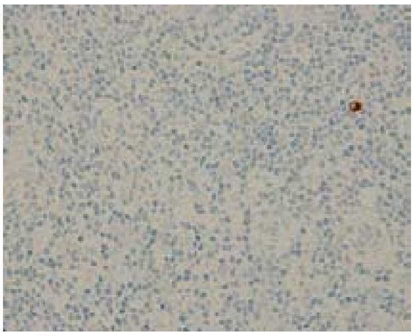
<u>ตอนที่ 1 แสดงผลการย้อม IHC ของ ผู้ป่วยที่เกิด light chain restriction</u>

พบว่าในผู้ป่วยที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 43ราย ตรวจพบว่าวิธี immunohistochemistry สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ทั้งหมด 23 รายใน 43 คิดเป็นร้อยละ 53.5พบว่าเป็นชนิด kappa light chain ทั้งหมด 13 รายใน 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 56.5 และเป็นชนิด lambda light chain ทั้งหมด 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.5

- **ผลการย้อมเป็น monoclonal ชนิด Kappa restriction โดยจะมีอัตราส่วนการย้อมของ Kappa: lambda > 10 โดยในงานวิจัยนี้พบว่ามีช่วของการเกิด Kappa restriction ตั้งแต่ 14.7-181**

1. ผู้ป่วยหมายเลข 3

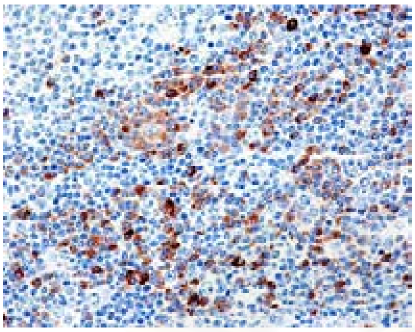


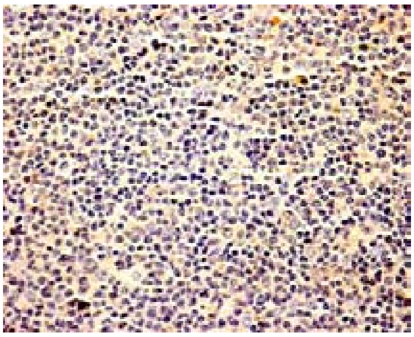


รูปที่ 2 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 3 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 165(165:1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

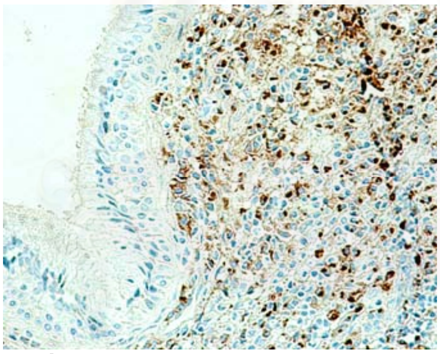
2. ผู้ป่วยหมายเลข 5

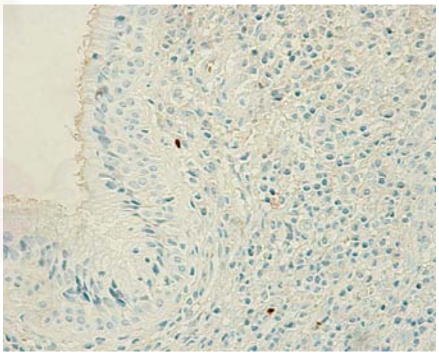




รูปที่ 3 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 5 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 18.1(107:6)

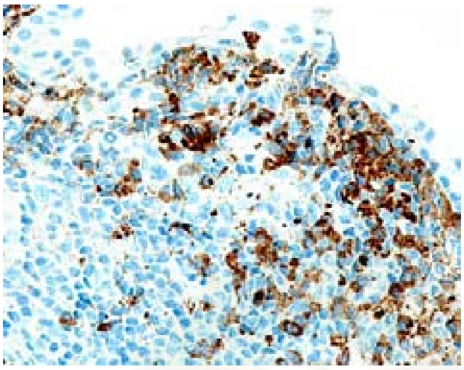
3. ผู้ป่วยหมายเลข 21

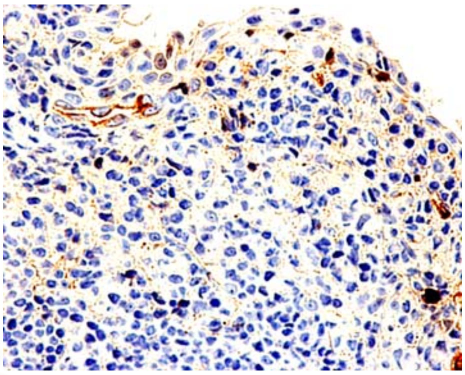




รูปที่ 4 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 21 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 37.3(112:3)

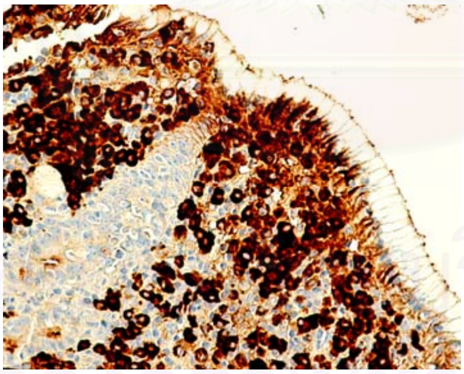
4. ผู้ป่วยหมายเลข 29

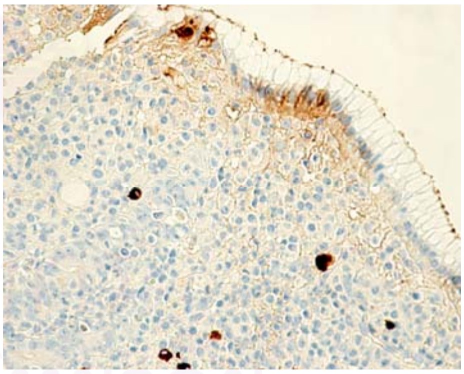




รูปที่5 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 29 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 16.7(50:3)

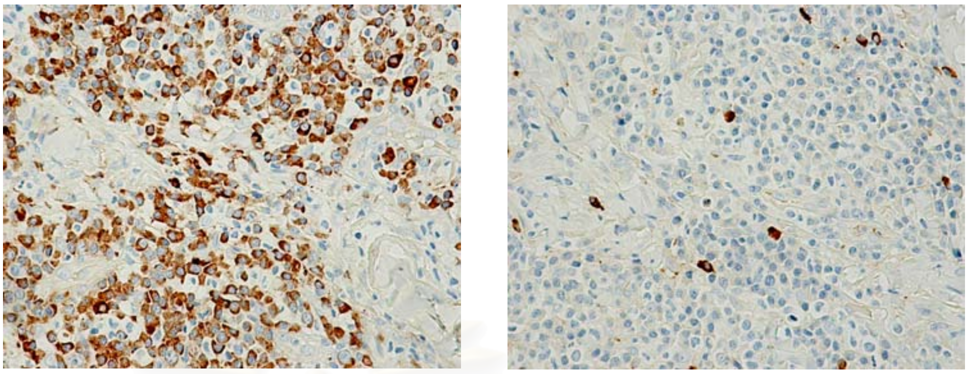
4. ผู้ป่วยหมายเลข 31





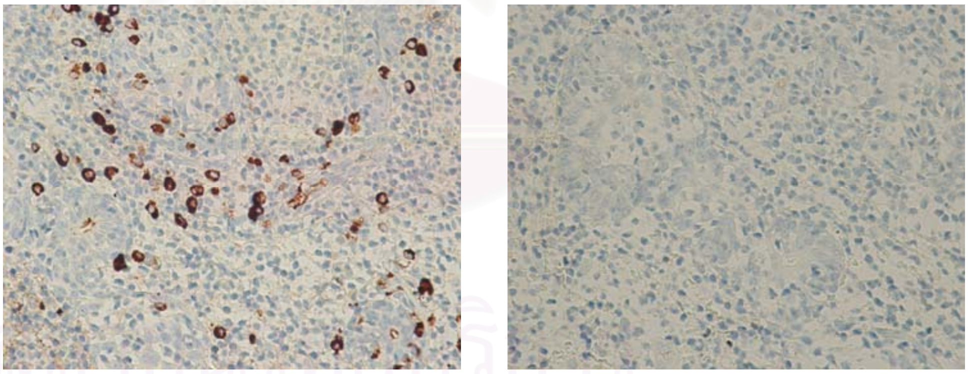
รูปที่6 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 31 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 57.5(230:4)

5. **ผู้ป่วยหมายเลข 36**



รูปที่7 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 36 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 35.4(318:9)

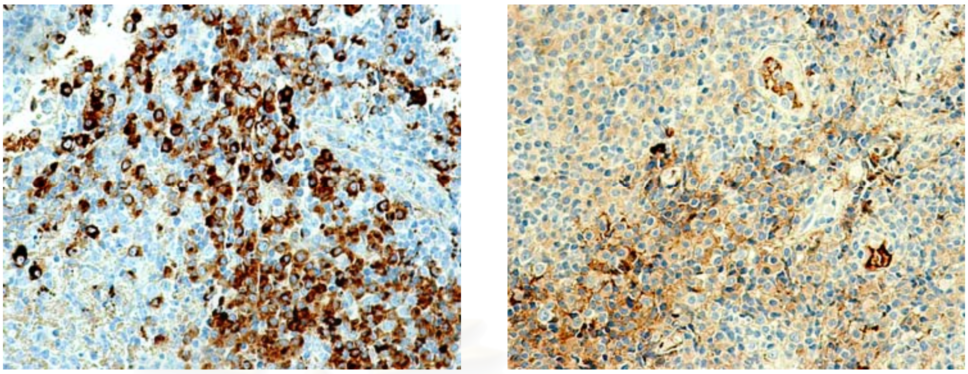
6. **ผู้ป่วยหมายเลข 38**



รูปที่8 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 38 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 60(60:1)

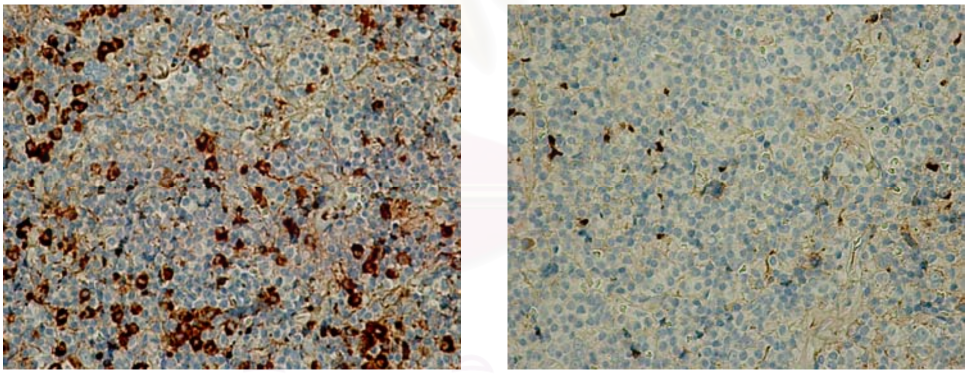
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. **ผู้ป่วยหมายเลข 41**



รูปที่9 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 41 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 103(206:2)

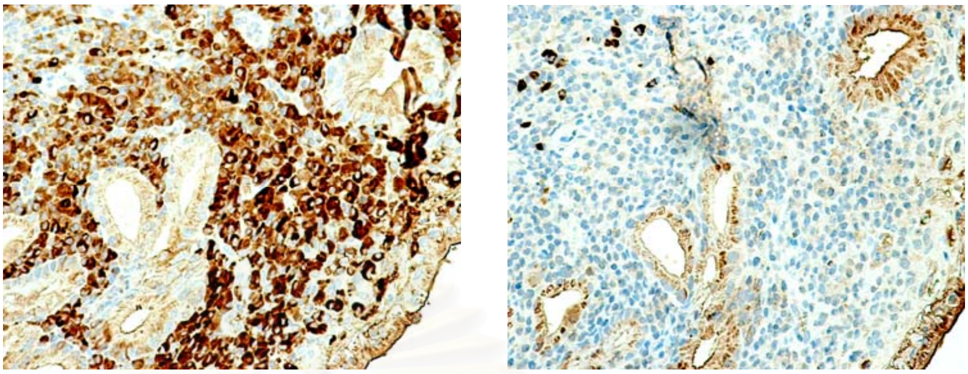
8. **ผู้ป่วยหมายเลข 44**



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

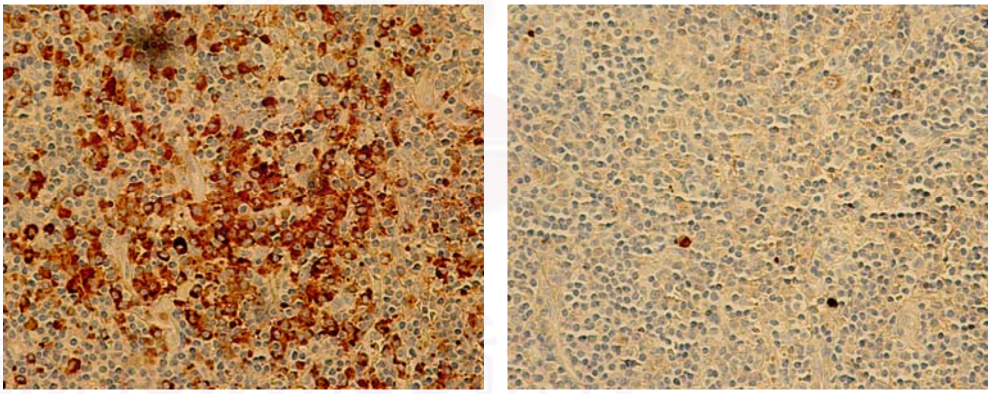
รูปที่10 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 44 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 38.3(115:3)

9. ผู้ป่วยหมายเลข 47



รูปที่11 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 47 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 18.2(182:10)

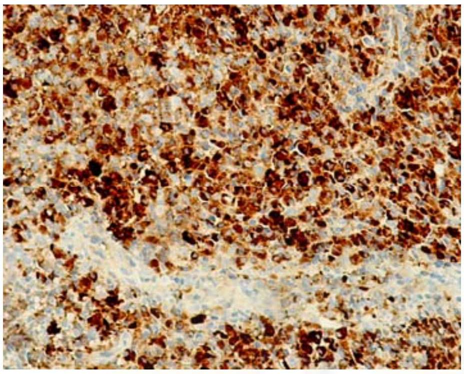
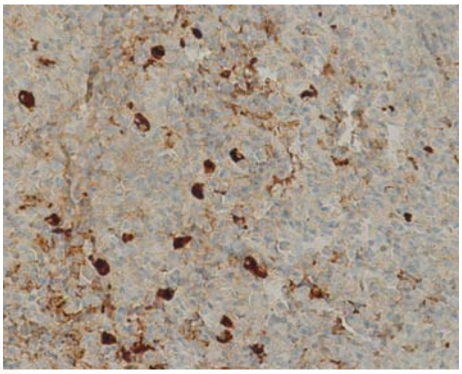
10. ผู้ป่วยหมายเลข 55



รูปที่12 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 55 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 61.3(245:4)

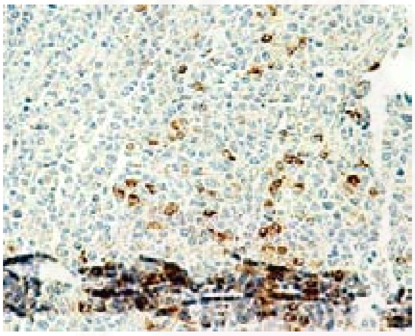
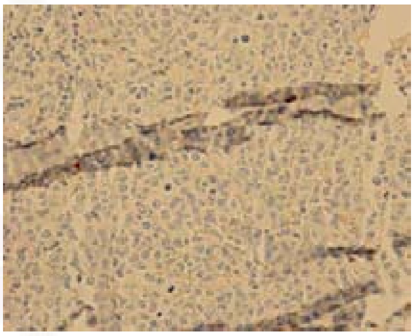
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ผู้ป่วยหมายเลข 57

รูปที่13 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 57 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 14.7 (235:16)

12. ผู้ป่วยหมายเลข 62

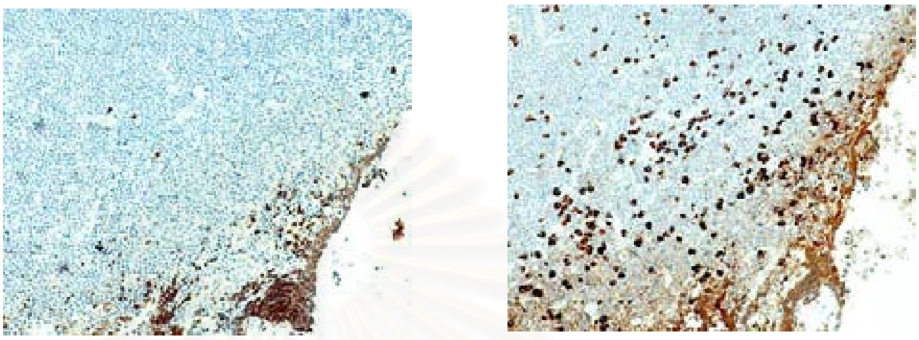



รูปที่14 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 62 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 181 (181:1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

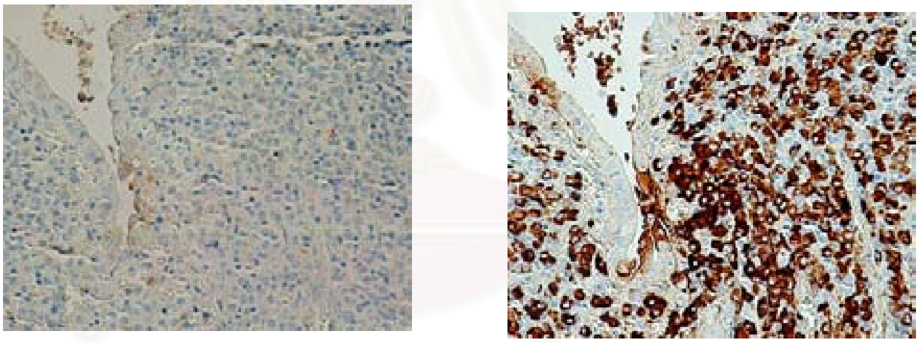
- ผลการย้อมเป็น monoclonal ชนิด Lambda restriction โดยจะมีอัตราส่วนการย้อมของ Kappa:lambda < 0.2โดยในงานวิจัยนี้พบว่ามีช่วงของการเกิด Kappa restriction ตั้งแต่ 0.0005 ถึง 0.08

1. ผู้ป่วยหมายเลข 16



รูปที่15 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 16 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.08 (6:70)

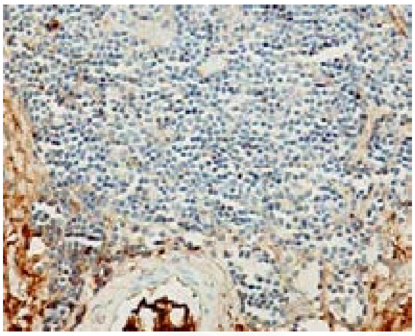
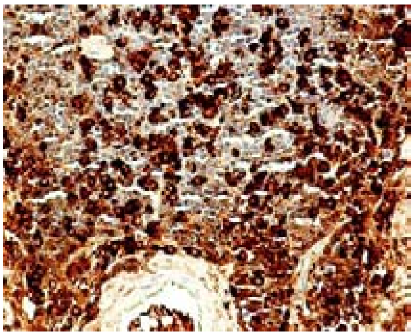
2. ผู้ป่วยหมายเลข 22



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

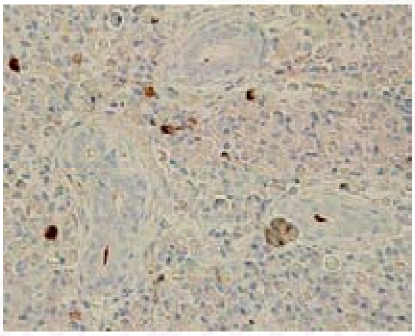
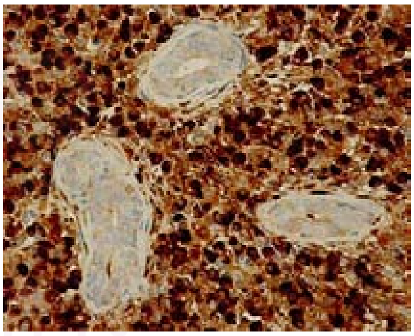
รูปที่16 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 22 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.0005 (1:190)

3. ผู้ป่วยหมายเลข 34

รูปที่17 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 34 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.02 (4:264)

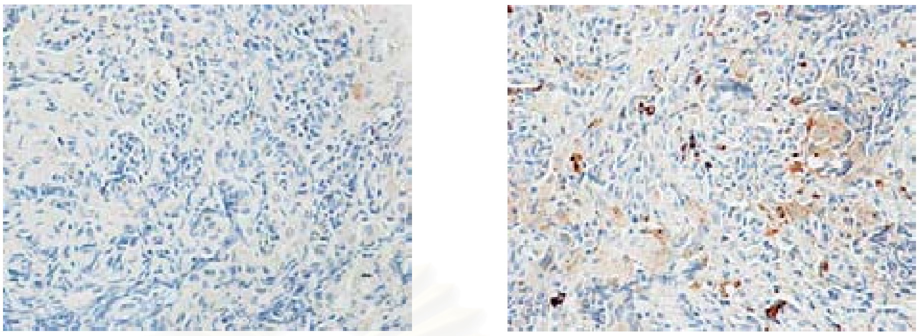
4. ผู้ป่วยหมายเลข 43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

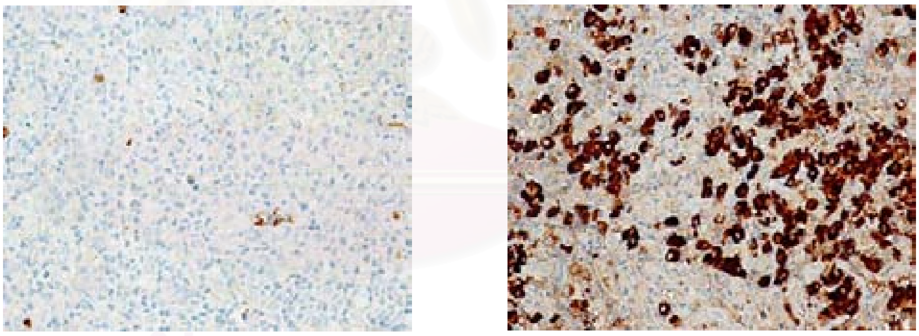
รูปที่18 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 43 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.03 (7:275)

5. **ผู้ป่วยหมายเลข 50**



รูปที่19 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 50 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.03 (1:33)

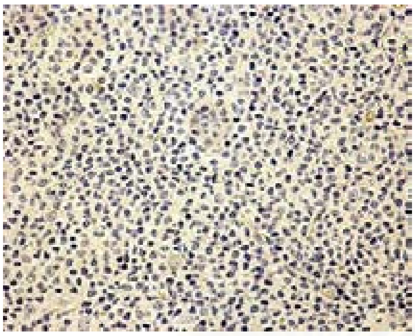
6. **ผู้ป่วยหมายเลข 51**

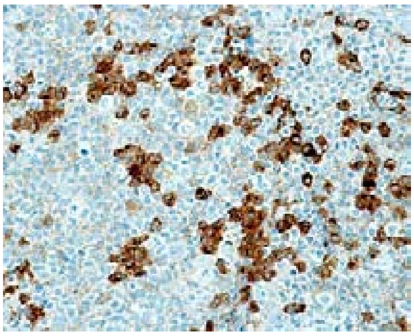


รูปที่20 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 51 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.04 (6:134)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

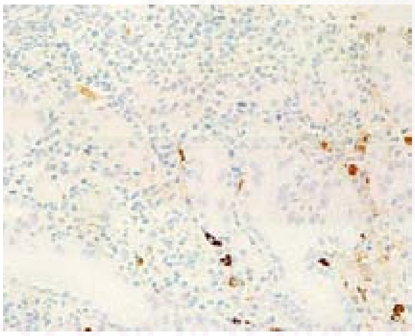
7. ผู้ป่วยหมายเลข 53

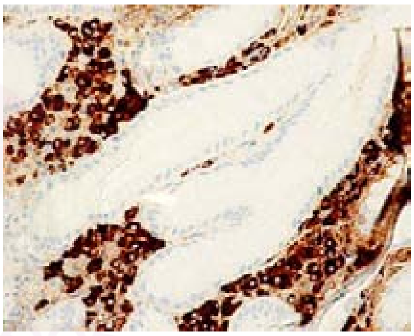




รูปที่21 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 53 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.01 (1:180)

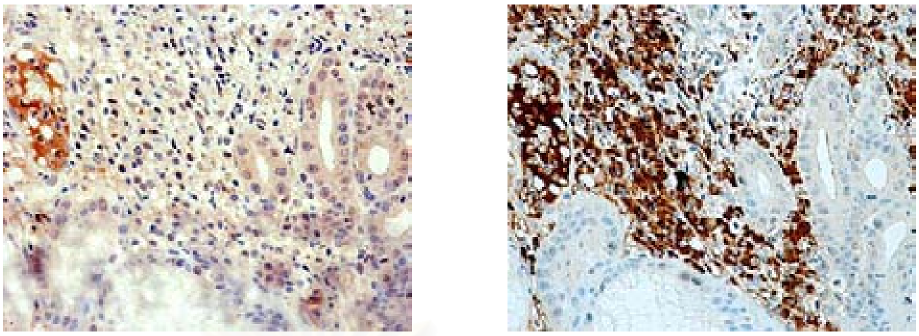
8. ผู้ป่วยหมายเลข 54





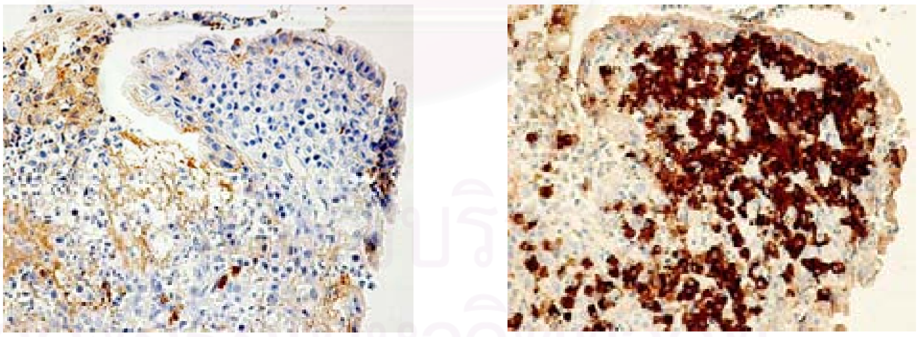
รูปที่22 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 54 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ0.025 (12:126)

9. ผู้ป่วยหมายเลข 60



รูปที่23 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 60 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.03 (3:103)

10. ผู้ป่วยหมายเลข 61

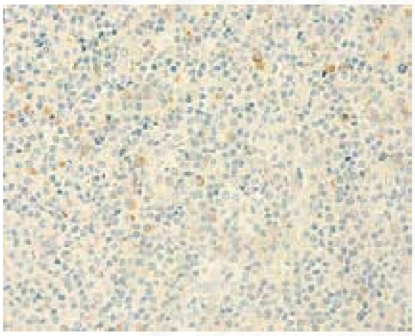


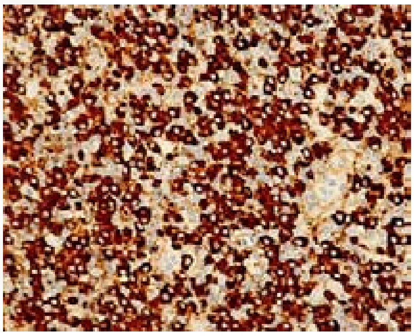
รูปที่24 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 61 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.02 (6:280)

<u>**ตอนที่ 2 แสดงผลการทดลองการยืนยันผลการตรวจพบผลบวก monoclonality โดยตรวจ heavy chain ของ IgG และ IgM**</u>

นำกลุ่มประชากรเป้าหมายทั้งหมด 43 ราย ที่พบว่าเกิด light chain restriction 28 ราย มาทดสอบผลโดยการตรวจ heavy chain ชนิด IgG และ IgM พบว่าเป็นชนิด IgM 16 รายคิดเป็นร้อยละ 57.2 และ IgG 12รายคิดเป็นร้อยละ 42.8 แต่ในรายที่ตรวจสอบด้วย IHC แล้วเกิด light chain restriction มีทั้งหมด 23 รายแยกเป็น IgM 14 รายคิดเป็นร้อยละ 60.8 และ IgG 9 รายคิดเป็นร้อยละ 39.1 ซึ่งผลการวิจัยเป็นดังนี้

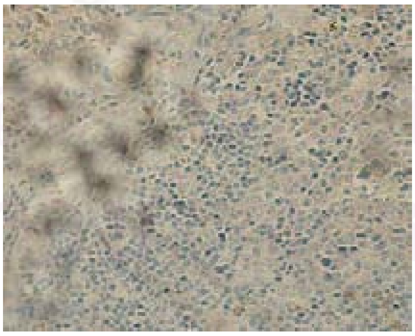
1. ผู้ป่วยหมายเลข 3

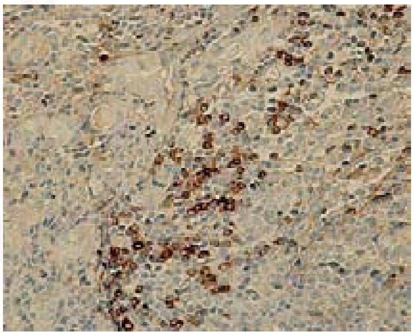




รูปที่25 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 3 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 16 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 305

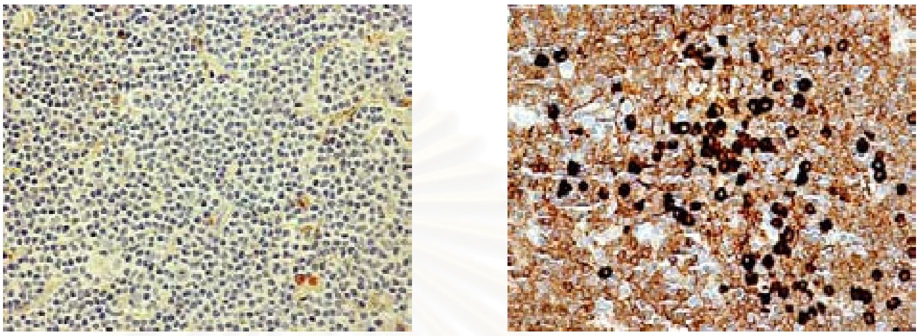
2. ผู้ป่วยหมายเลข 5





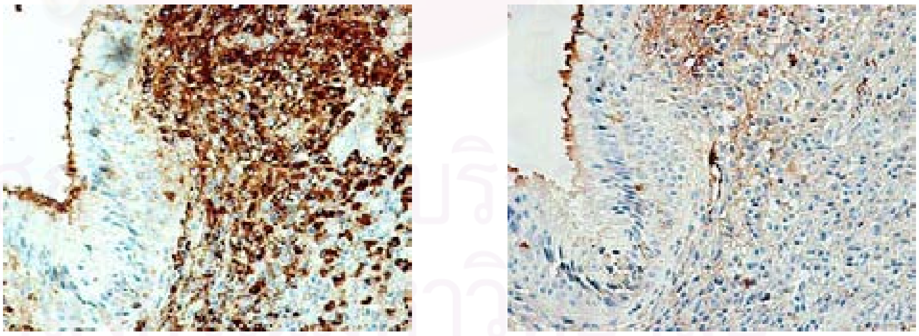
รูปที่26 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 5 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 1 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 94

3. ผู้ป่วยหมายเลข 16



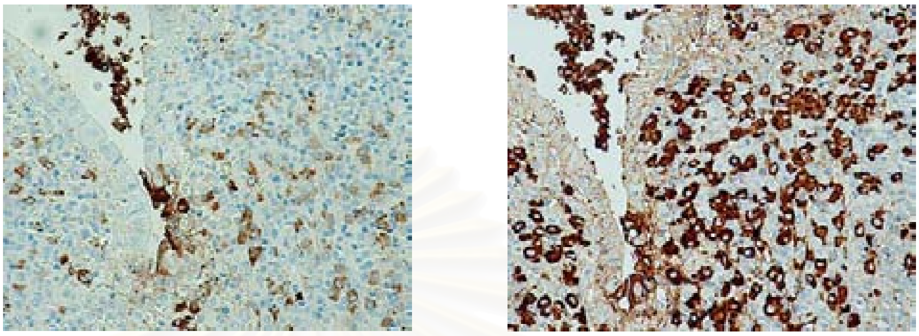
รูปที่27 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 16 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 11 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 90

4. ผู้ป่วยหมายเลข 21



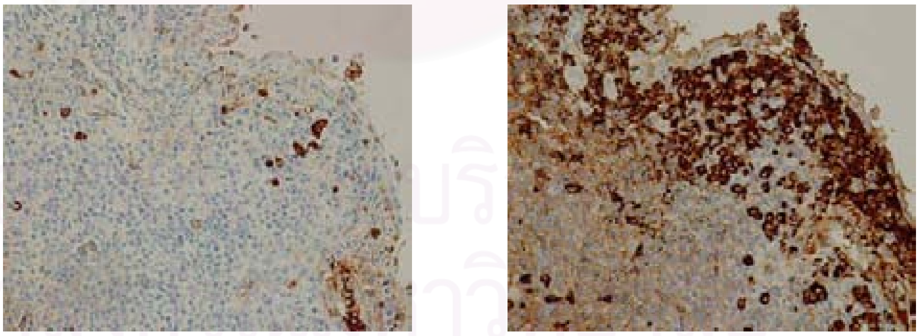
รูปที่28 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 21 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 109 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 2

5. ผู้ป่วยหมายเลข 22



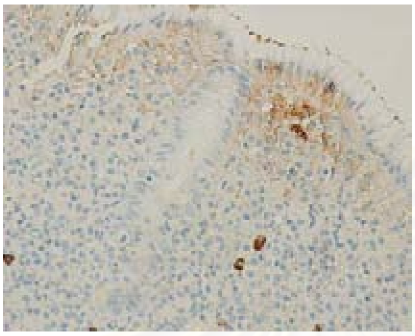
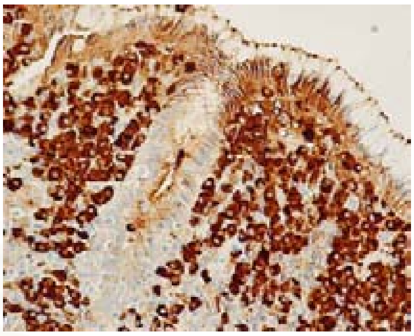
รูปที่29 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 22 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 20 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 104

6. ผู้ป่วยหมายเลข 29



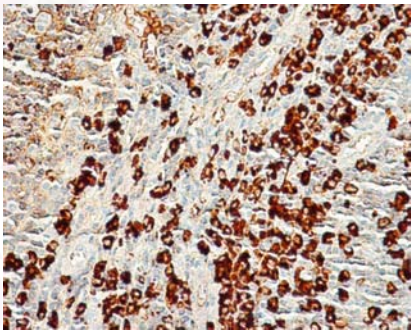
รูปที่30แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 29 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 12 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 176

7. ผู้ป่วยหมายเลข 31

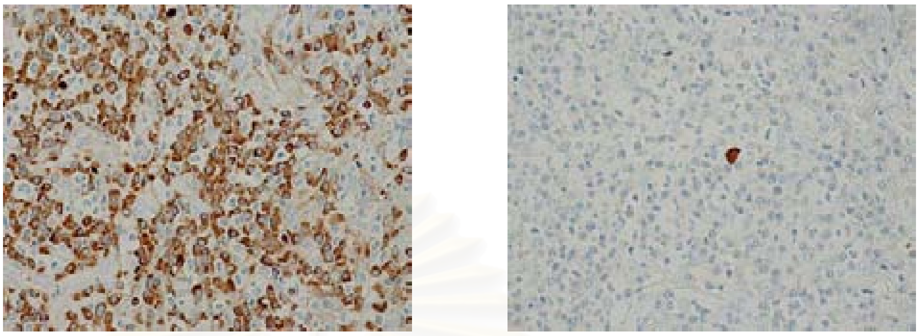
รูปที่31 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 31 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 4 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 245

8. ผู้ป่วยหมายเลข 34



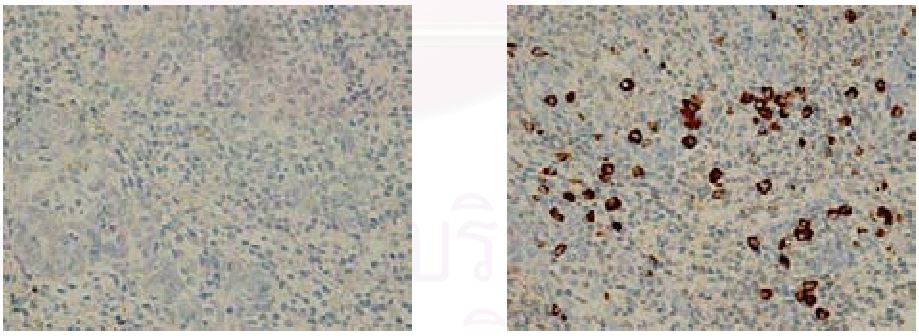
รูปที่32 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 34 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 5 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 206

9. ผู้ป่วยหมายเลข 36



รูปที่33แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 36 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 314 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 1

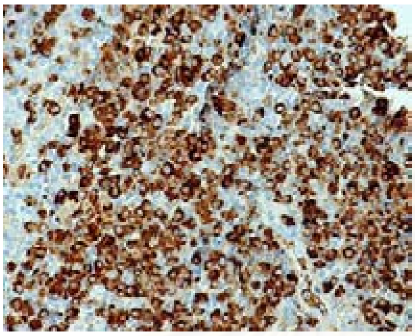
10. ผู้ป่วยหมายเลข 38

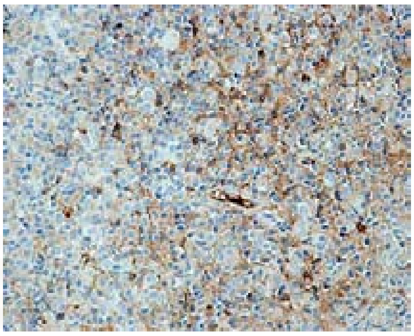


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่34 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 38 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 1 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 67

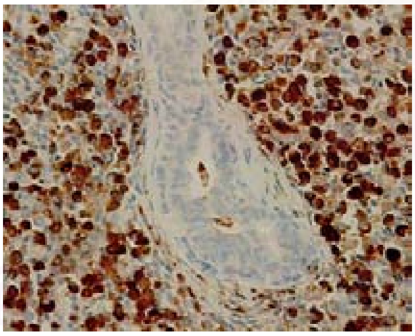
11. ผู้ป่วยหมายเลข 41

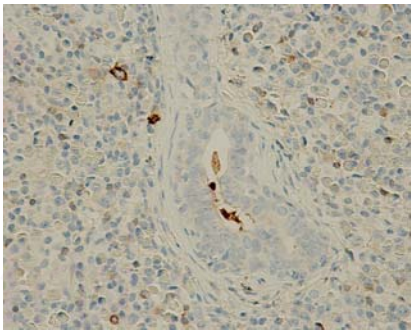




รูปที่35 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 41 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 451 และ IgM (ขวา) เท่ากับ1

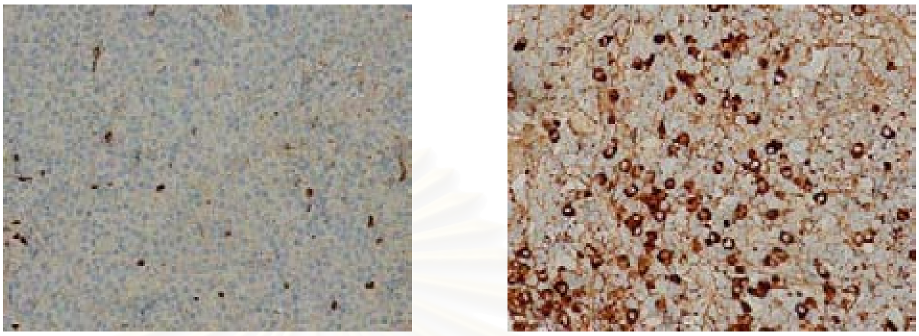
12. ผู้ป่วยหมายเลข 43





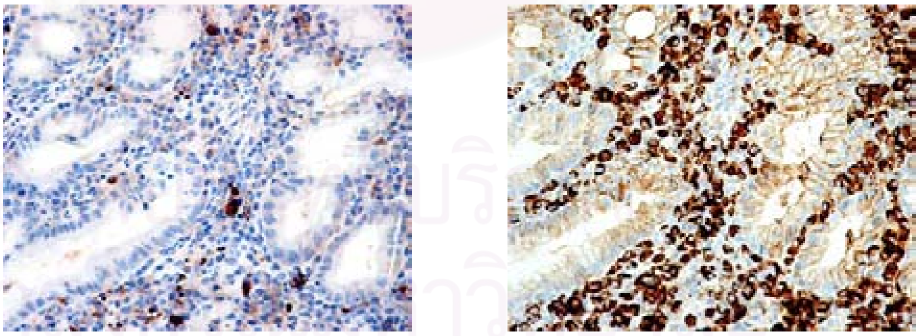
รูปที่36 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 43 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 247 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 2

13. ผู้ป่วยหมายเลข 44



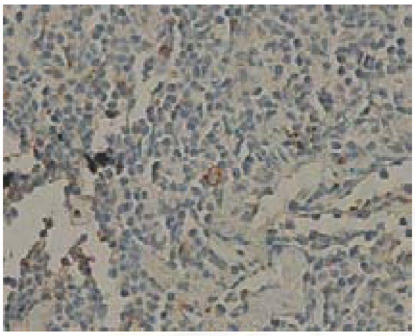
รูปที่37 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 44 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 10 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 120

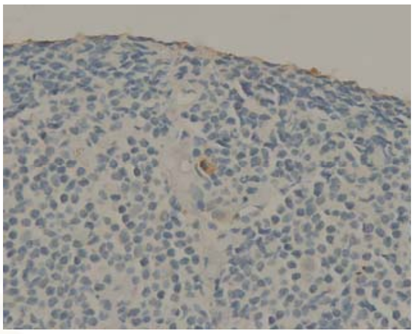
14. ผู้ป่วยหมายเลข 47



รูปที่38 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 47 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 9 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 255

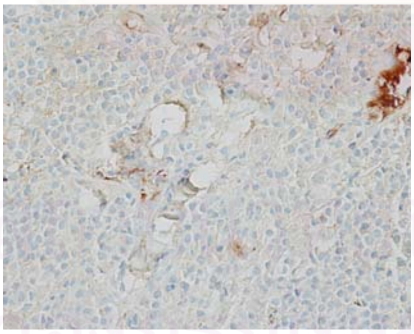
15. ผู้ป่วยหมายเลข 50

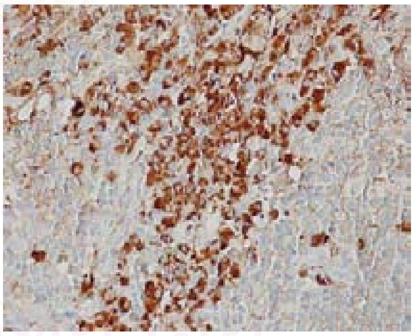




รูปที่39แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 50 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 4 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 1

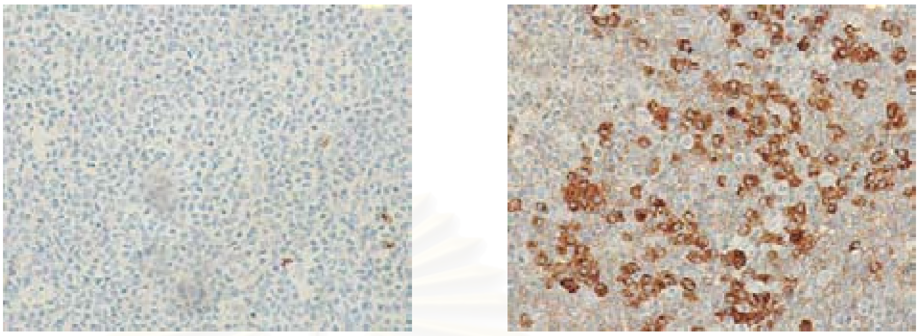
16. ผู้ป่วยหมายเลข 51





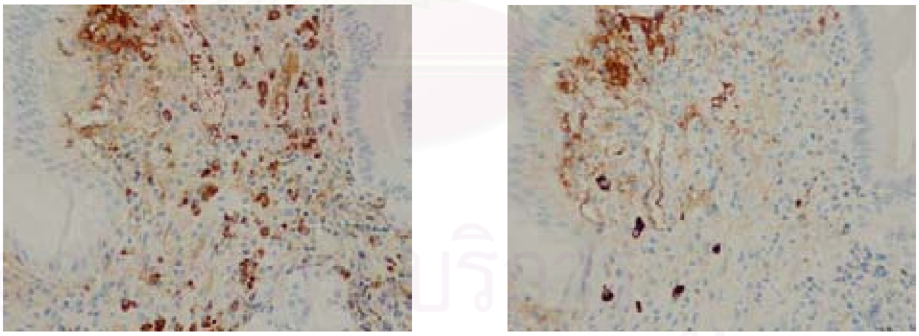
รูปที่40 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 51 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 1 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 87

17. ผู้ป่วยหมายเลข 53



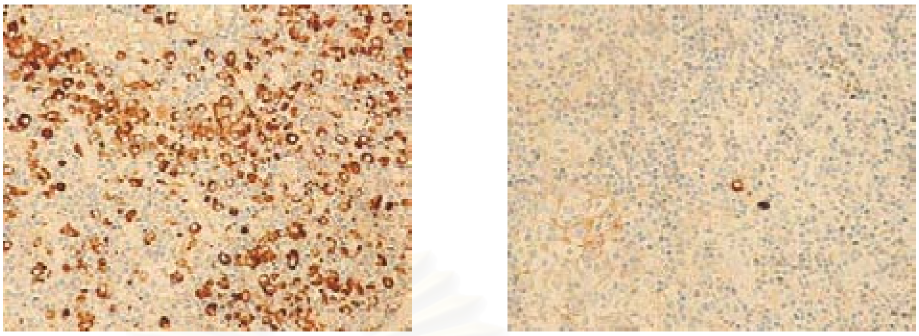
รูปที่41 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 53 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 4 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 196

18. ผู้ป่วยหมายเลข 54



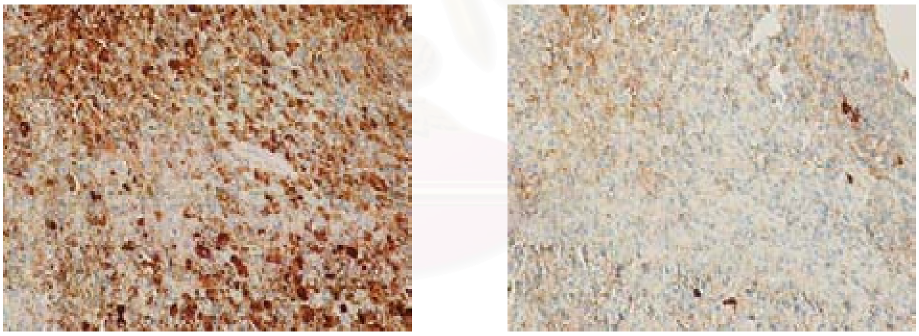
รูปที่42 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 54 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 47 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 5

19. ผู้ป่วยหมายเลข 55



รูปที่43 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 55
IgG (ซ้าย) เท่ากับ 227 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 2

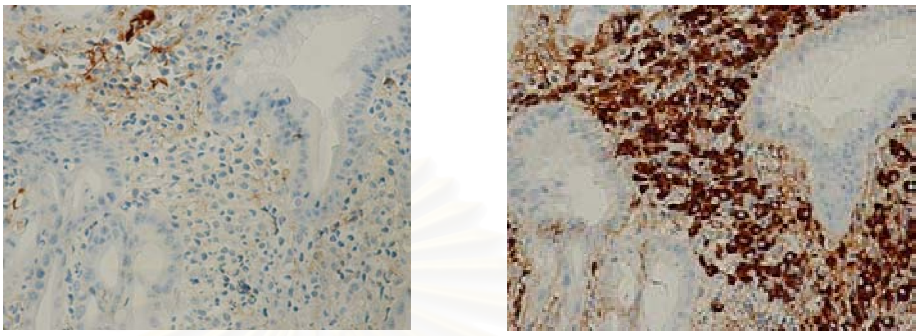
20. ผู้ป่วยหมายเลข 57



รูปที่44แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 57
IgG (ซ้าย) เท่ากับ97 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 3

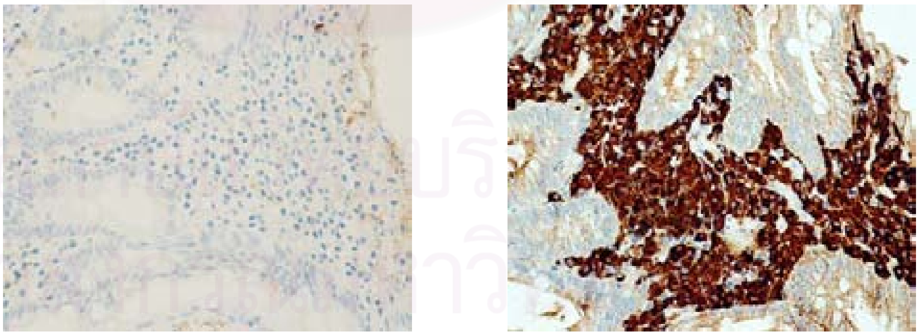
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

21. ผู้ป่วยหมายเลข 60



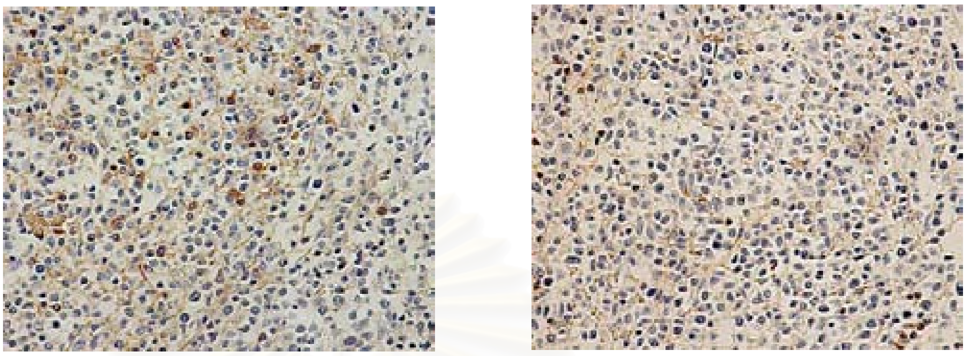
รูปที่45 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 60
IgG (ซ้าย) เท่ากับ 1 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 150

22. ผู้ป่วยหมายเลข 61



รูปที่46 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 61
IgG (ซ้าย) เท่ากับ 1 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 146

23. ผู้ป่วยหมายเลข 62



รูปที่ 47 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม IHC ของผู้ป่วยหมายเลข 62 IgG (ซ้าย) เท่ากับ 14 และ IgM (ขวา) เท่ากับ 3

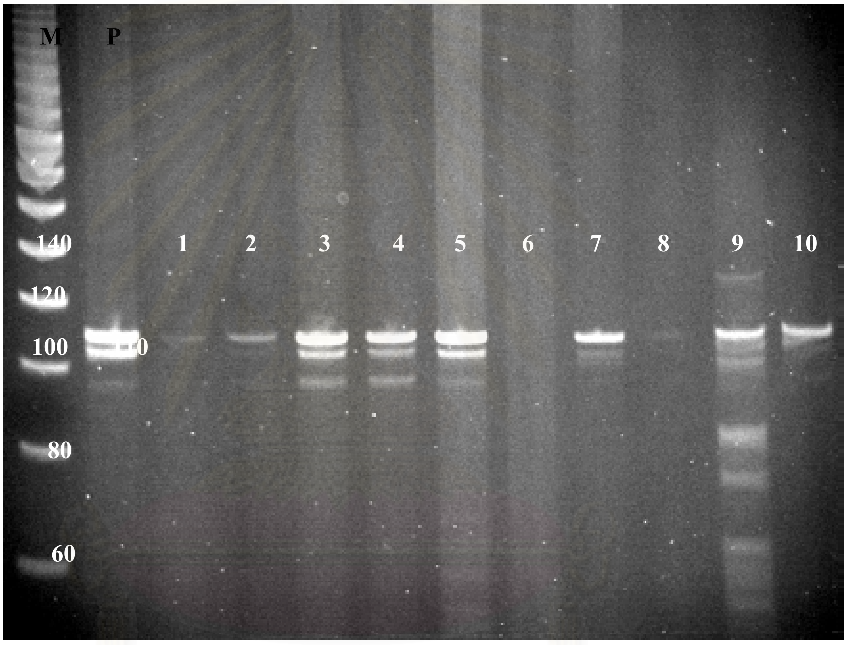
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการทดลอง Polymerase chain reaction

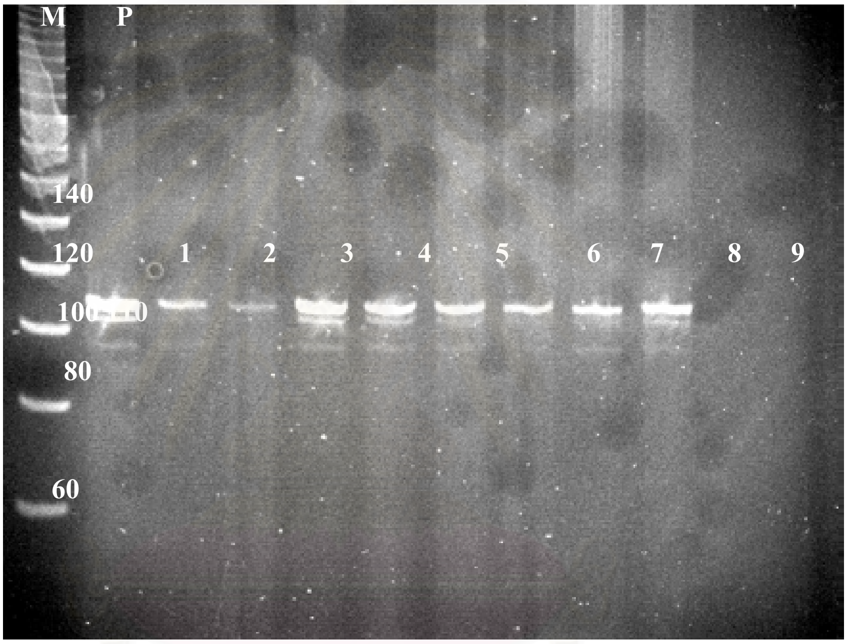
<u>ตอนที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ DNA ด้วย human B Globin gene</u>

พบว่าในผู้ป่วยที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 43 ราย ทำ PCR reaction ต่อ human β-globin gene เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA) ที่สกัดได้จากตัวอย่าง มีคุณภาพของ DNA ได้ผลบวกครบทั้ง 43 ราย

Product ของ PCR reaction ต่อ human β-globin gene จะมีขนาด 110 bp ได้ผลการวิจัยดังนี้

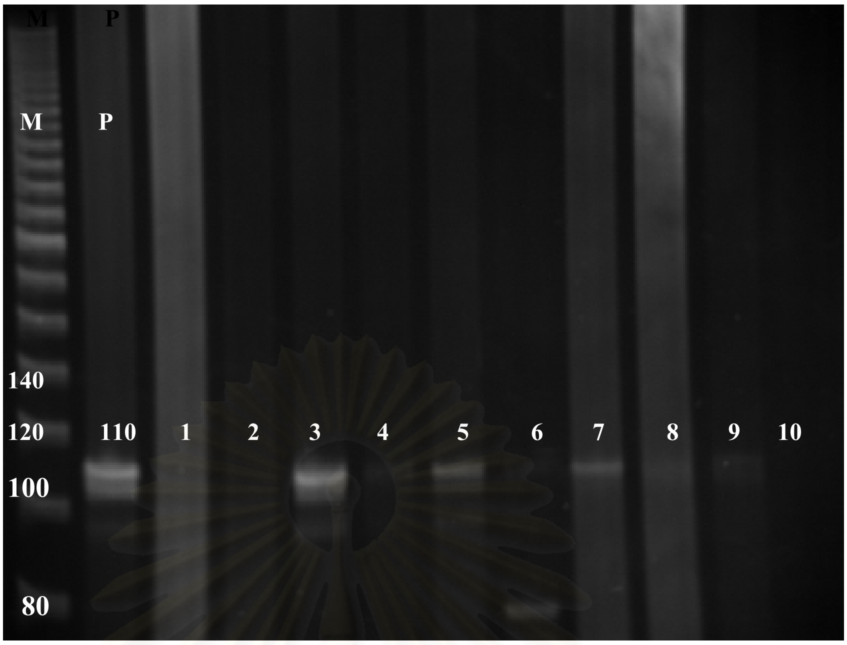


รูปที่ 48แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1 คือ 13, 2 คือ 14, 3 คือ 27, 4 คือ 32, 5 คือ 33, 6 คือ 41, 7 คือ 48, 8 คือ 58, 9 คือ46 และ 10 คือ 50

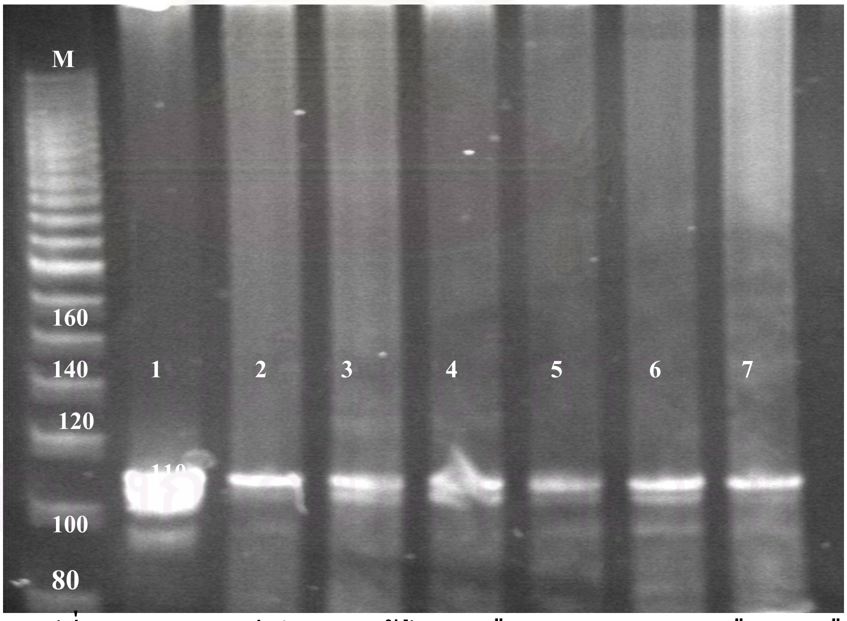


รูปที่49 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1 คือ 38, 2 คือ 17, 3 คือ 44, 4 คือ 54, 5 คือ 55, 6 คือ 57, 7 คือ 43, 8 คือ 61, 9 คือ negative control (No template)

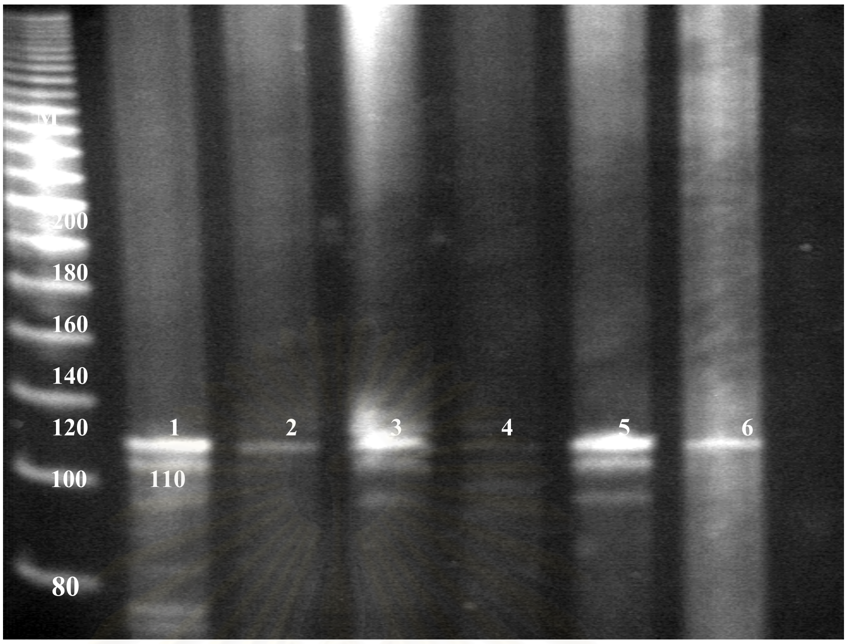
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



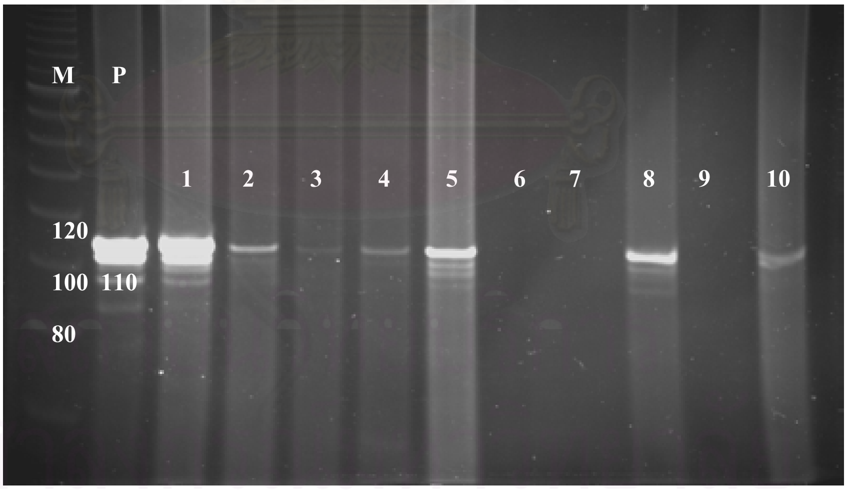
รูปที่ 50 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1 คือ 15, 2 คือ 41, 3 คือ 56, 4 คือ 59, 5 คือ 20, 6 คือ 21, 7 คือ 22, 8 คือ 34, 9 คือ 53 และ 10 คือ negative control(No template)



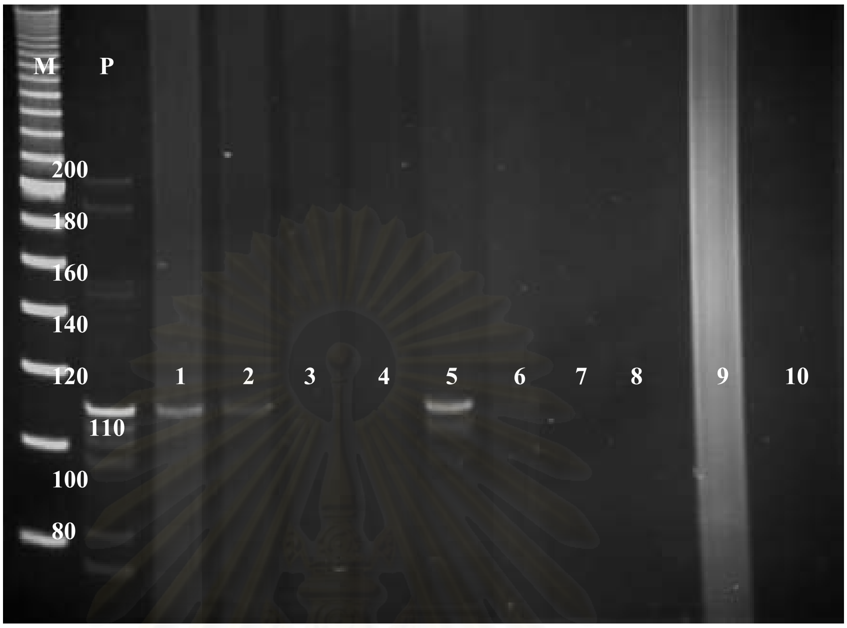
รูปที่ 51 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1 คือ49, 2 คือ 51, 3 คือ35, 4 คือ 36, 5 คือ 15, 6 คือ 41, และ 7 คือ 29



รูปที่ 52 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1 คือ 33, 2 คือ 33, 3 คือ 40, 4 คือ 37, 5 คือ 24,และ 6 คือ 24



รูปที่ 53 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1 คือ 16, 2 คือ 3, 3 คือ 10, 4 คือ 6, 5 คือ 9, 6 คือ 9, 7 คือ 23, 8 คือ 27, 9 คือ23 และ 10 คือ 17



รูปที่ 54 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1 คือ 9, 2 คือ 23, 3 คือ 24, 4 คือ 45, 5 คือ 48, 6 คือ 31, 7 คือ 14, 8 คือ 14, 9 คือ 14 และ 10 คือ คือ negative control(No template)

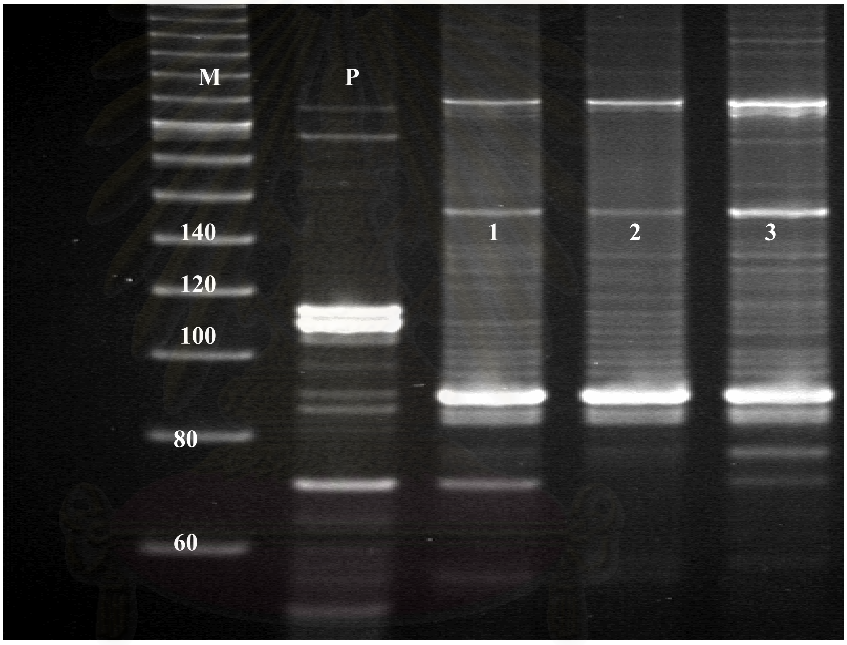
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ตอนที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบ Monoclonality ด้วยเทคนิค PCR</u>

พบว่าในผู้ป่วยที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 44 ราย ตรวจพบว่าวิธี Polymerase chain reaction สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ทั้งหมด 21 รายใน 44 คิดเป็นร้อยละ47.7 ผลการวิจัยเป็นดังนี้

Product ของ PCR reaction ต่อ immunoglobulin gene rearrangement จะอยู่ในช่วง 70-140 bp ได้ผลการวิจัยดังนี้

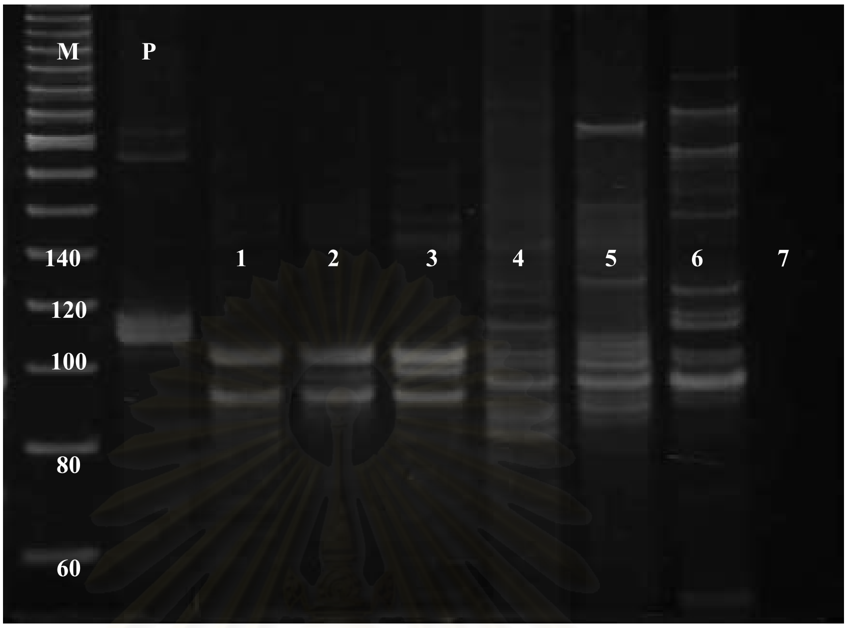
1. ผู้ป่วยหมายเลข 38



รูปที่ 55 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 38

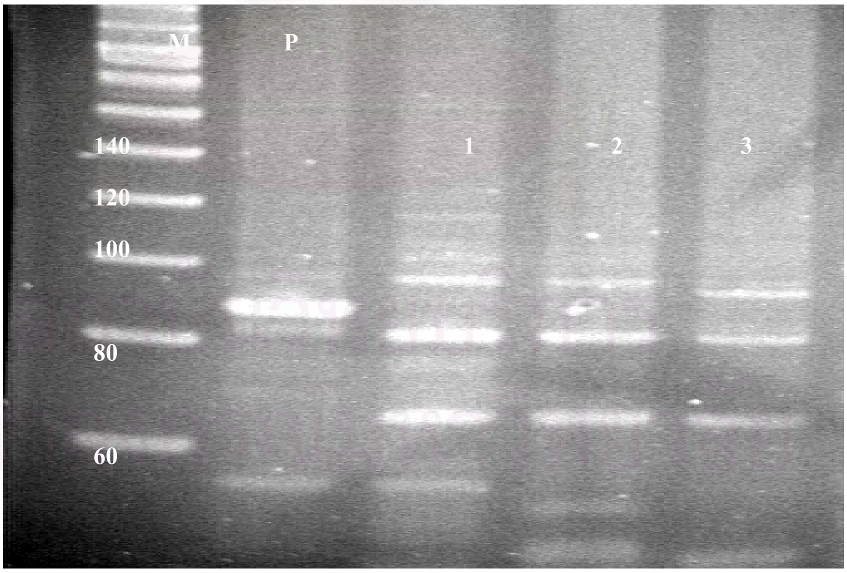
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผู้ป่วยหมายเลข 46, 58



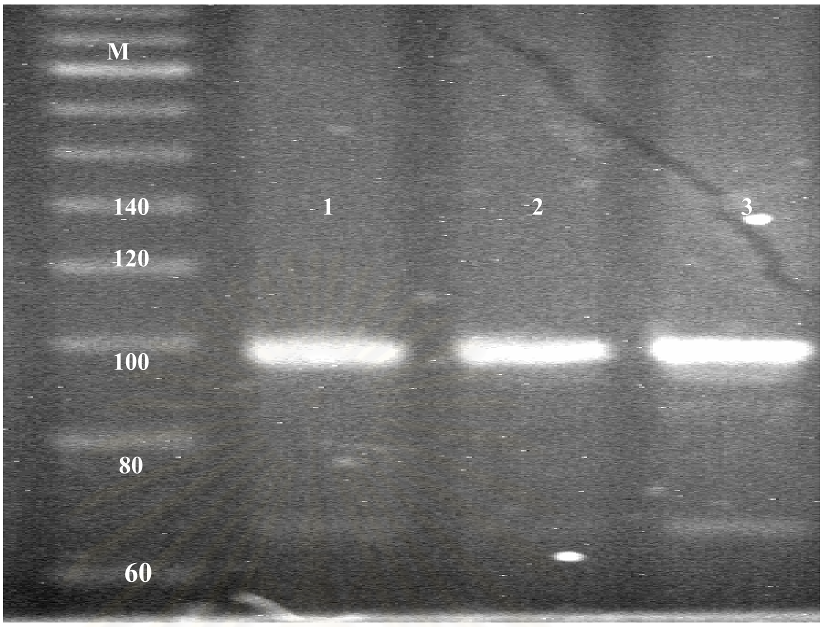
รูปที่ 56 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 46, 4, 5, 6 คือ 58, 7 คือ negative control (No template)

3. ผู้ป่วยหมายเลข 35



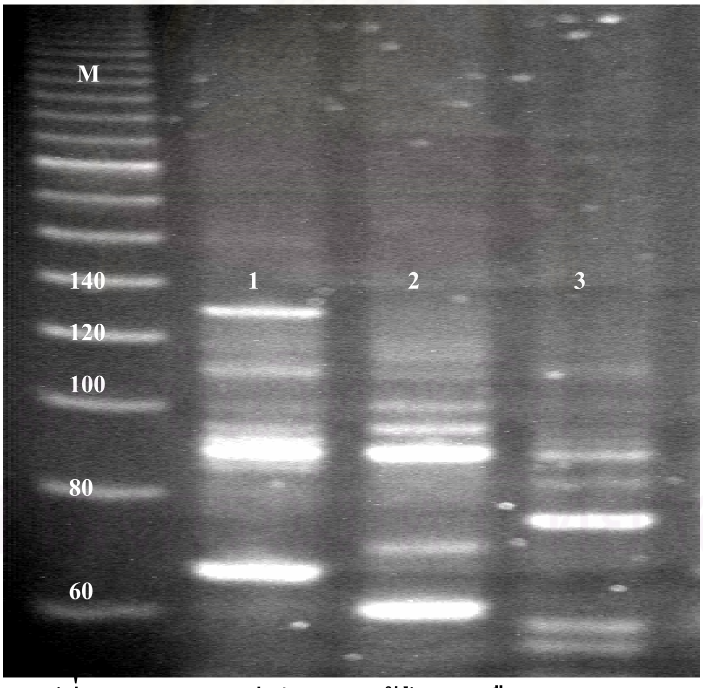
รูปที่ 57 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 35

4. ผู้ป่วยหมายเลข 29



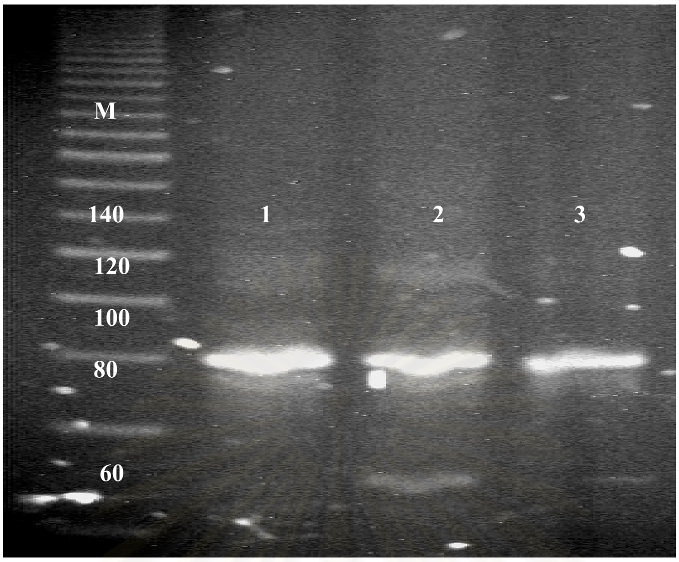
รูปที่ 58 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1, 2, 3 คือ 29

5. ผู้ป่วยหมายเลข 32



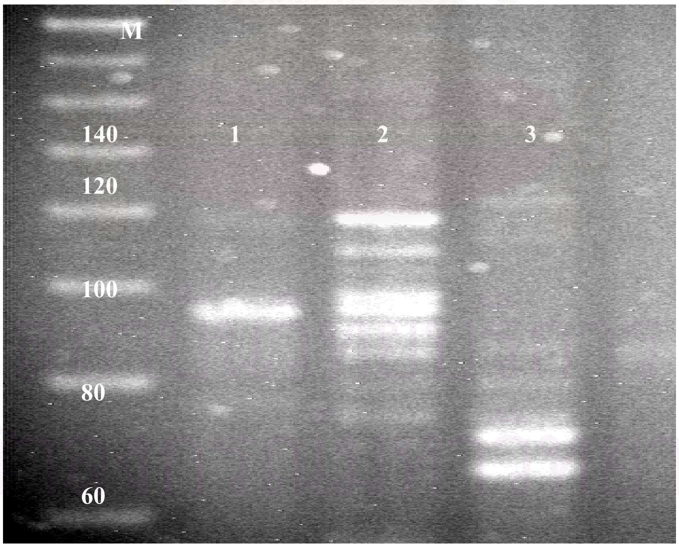
รูปที่ 59 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1, 2, 3 คือ 32

6. ผู้ป่วยหมายเลข 39



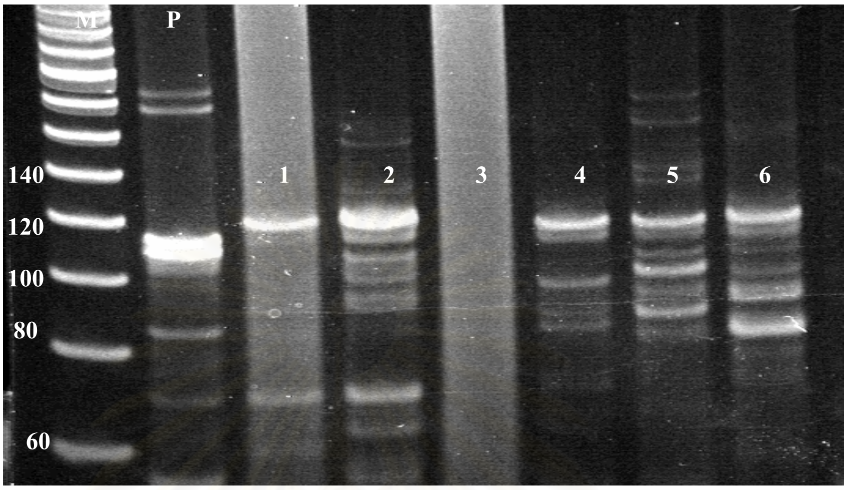
รูปที่ 60 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1, 2, 3 คือ 39

7. ผู้ป่วยหมายเลข 37



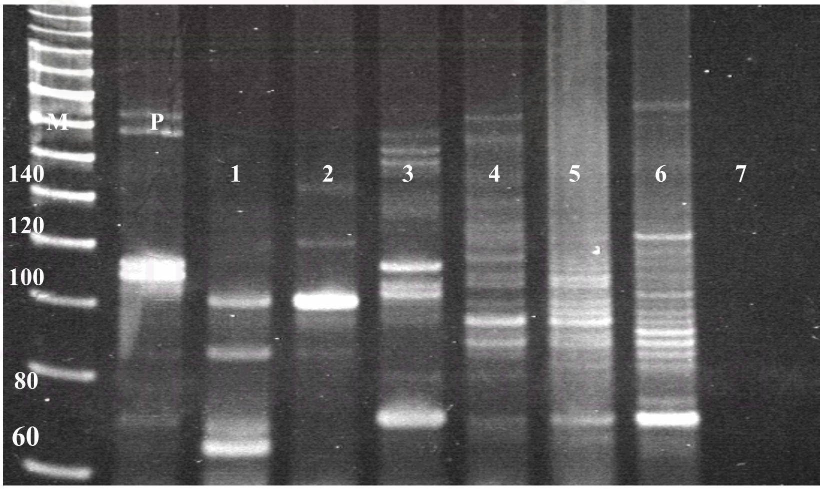
รูปที่ 61 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, 1, 2, 3 คือ 37

7. ผู้ป่วยหมายเลข 16, 3



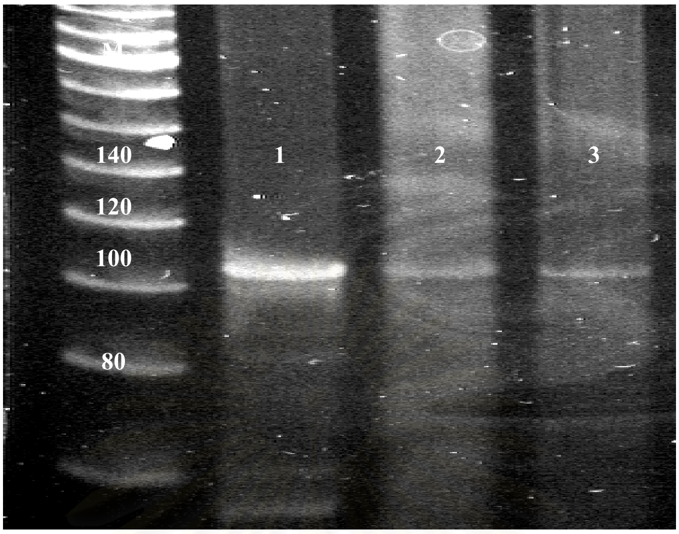
รูปที่ 62 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 16, 4, 5, 6 คือ 3

8. ผู้ป่วยหมายเลข 5, 9



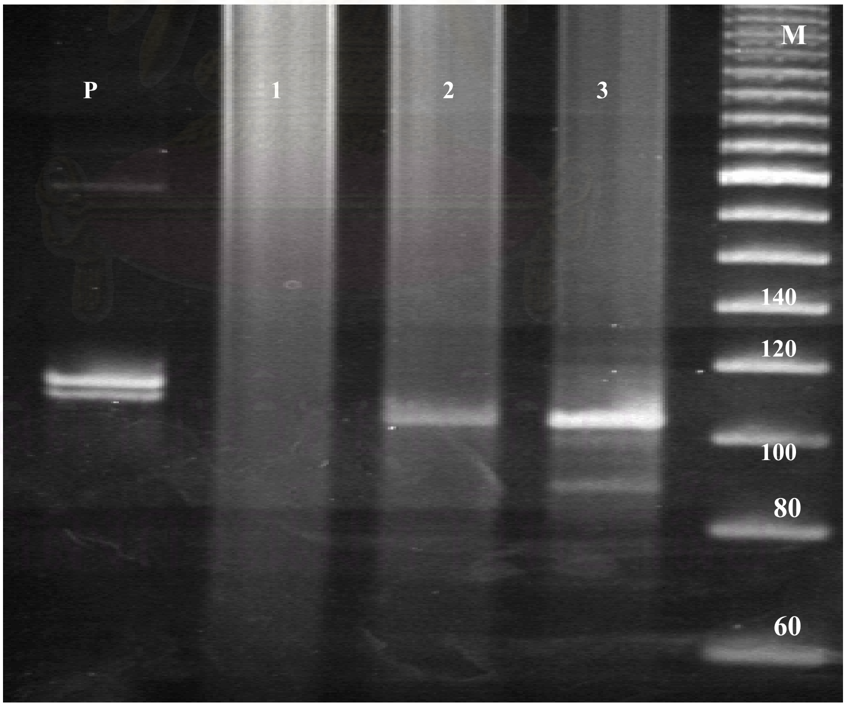
รูปที่ 63 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 5, 4, 5, 6 คือ 9, 7 คือ negative control (No template)

9. ผู้ป่วยหมายเลข 17



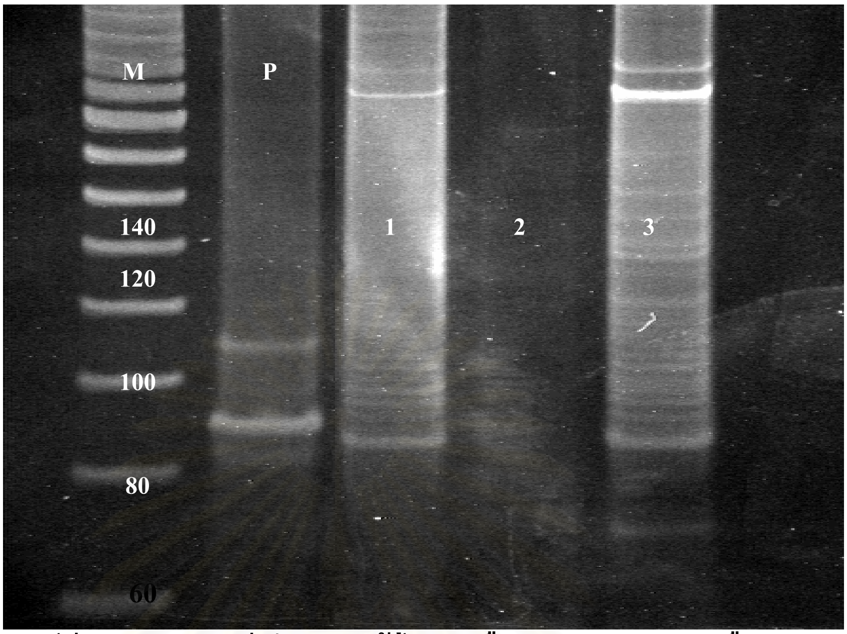
รูปที่64 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 17

8. 42



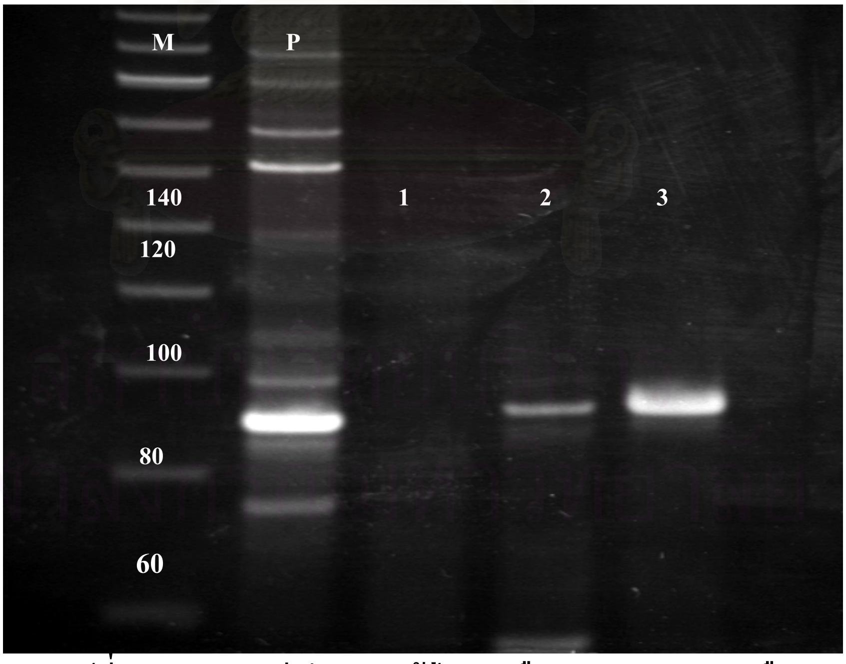
รูปที่65 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 42

10. ผู้ป่วยหมายเลข 49



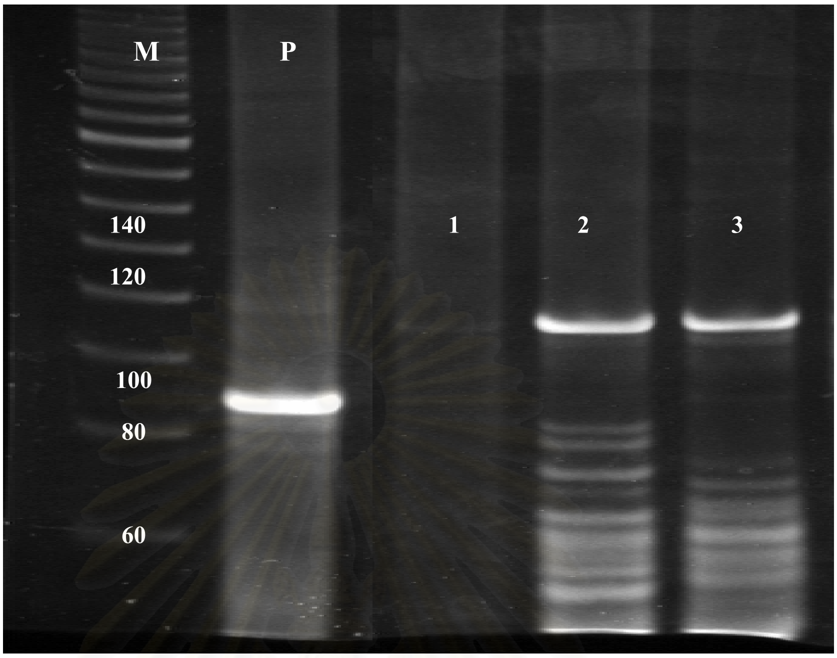
รูปที่66 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 49

11. ผู้ป่วยหมายเลข 50



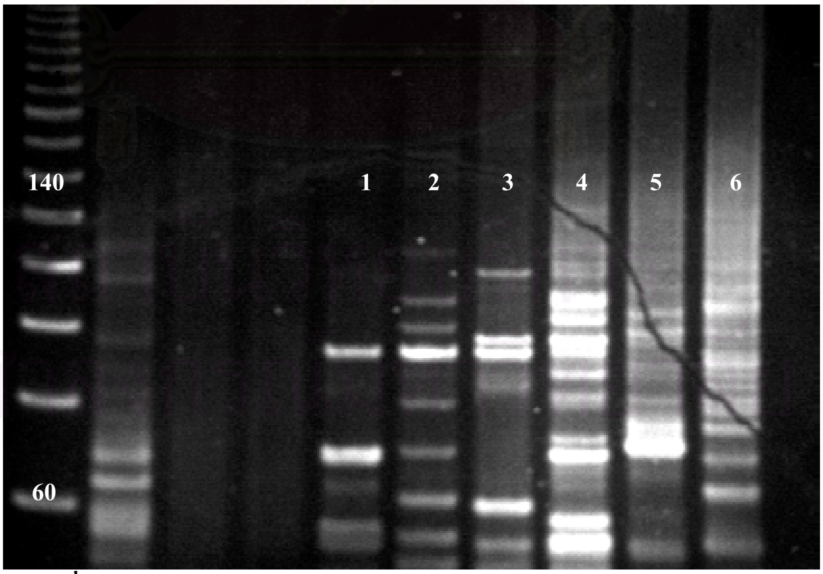
รูปที่67 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 50

12. ผู้ป่วยหมายเลข 51



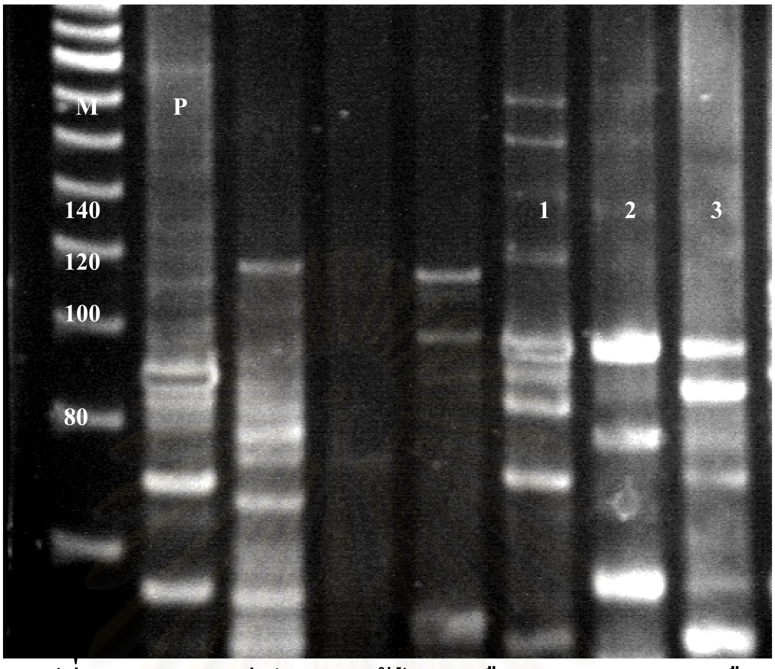
รูปที่ 68แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 51

9. ผู้ป่วยหมายเลข 54, 56



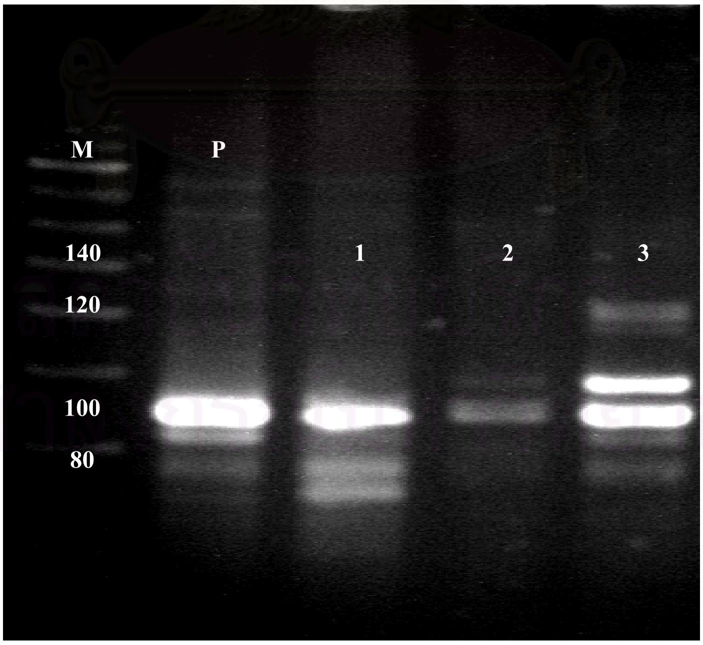
รูปที่ 69แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 54 และ 4, 5, 6 คือ 56

13. ผู้ป่วยหมายเลข 57



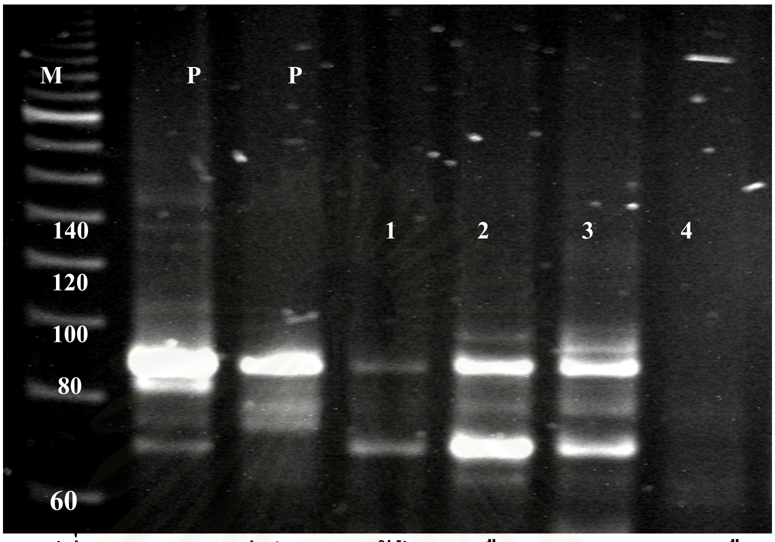
รูปที่70 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 57

14. ผู้ป่วยหมายเลข 59



รูปที่71 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 59

15. ผู้ป่วยหมายเลข 61



รูปที่72 แสดง แถบดีเอ็นเอของผู้ป่วย M คือ marker 20 bp, P คือ positive control, 1, 2, 3 คือ 61 และ 4 คือ negative control (No template)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

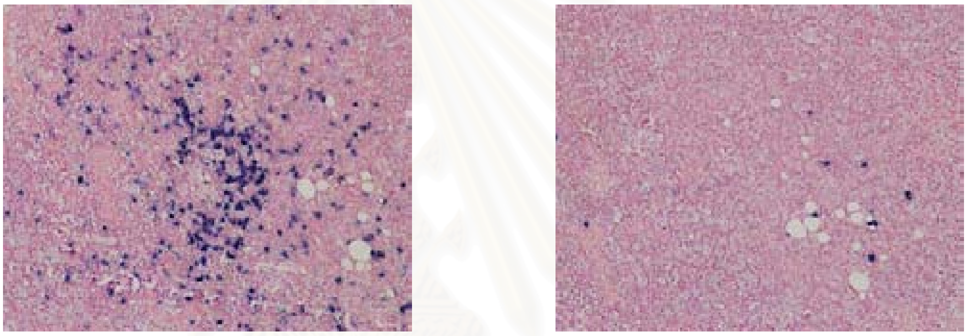
3. ผลการทดลอง In situ hybridization

<u>ตอนที่ 1 แสดงผลการย้อม ISH ของ ผู้ป่วยที่เกิด light chain restriction</u>

พบว่าในผู้ป่วยที่ถูกคัดเลือกมาศึกษาทั้งหมด 43 ราย ตรวจพบว่าวิธี In situ hybridization สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ทั้งหมด 28 รายใน 43 คิดเป็นร้อยละ 65.1 พบว่าเป็นชนิด kappa light chain ทั้งหมด 17 รายใน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.7 และเป็นชนิด lambda light chain ทั้งหมด 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.3

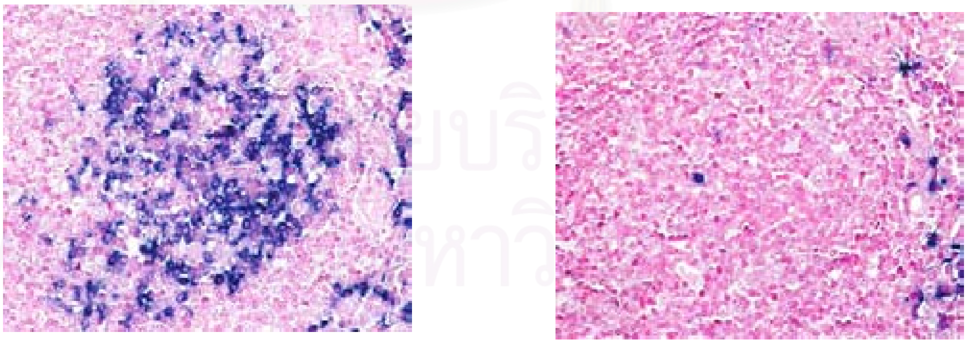
- ผลการย้อมเป็น monoclonal ชนิด Kappa restriction โดยจะมีอัตราส่วนการย้อมของ Kappa: lambda > 10 โดยในงานวิจัยนี้พบว่ามีช่วงของการเกิด Kappa restriction ตั้งแต่ 13.25 ถึง ∞

1. ผู้ป่วยหมายเลข 3



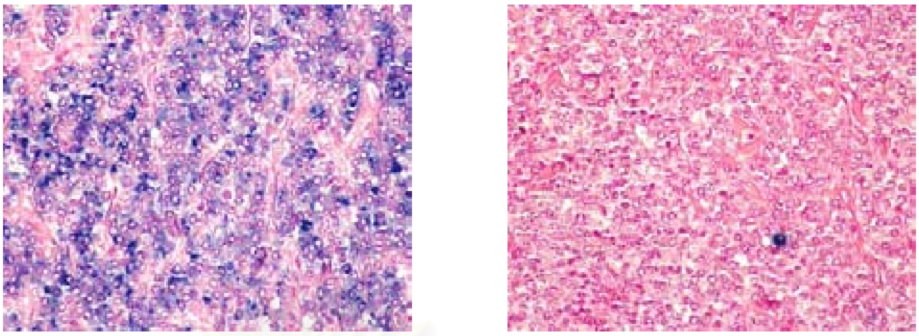
รูปที่73 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 3 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 25.13 (201:8)

2. ผู้ป่วยหมายเลข 5



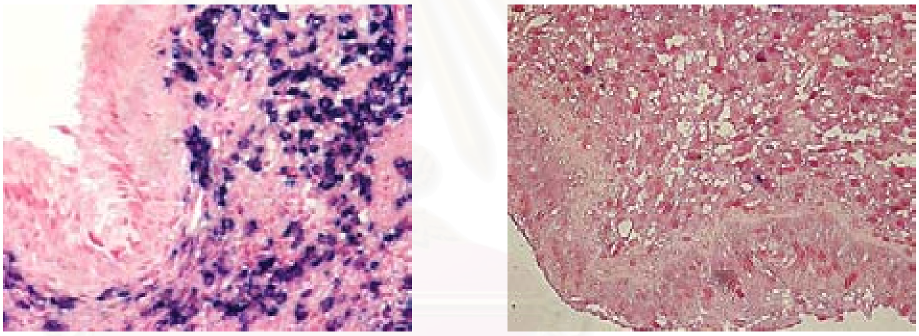
รูปที่74 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 5 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 13.25 (107:6)

3. ผู้ป่วยหมายเลข 6



รูปที่75แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 6 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 405 (405:1)

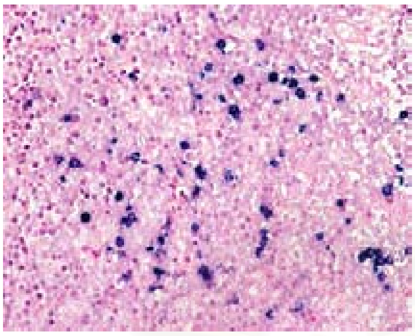
4. ผู้ป่วยหมายเลข 21

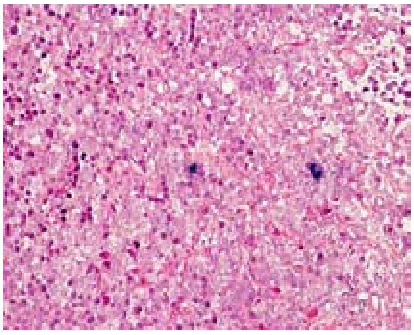


รูปที่76แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 21 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 245 (245:1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

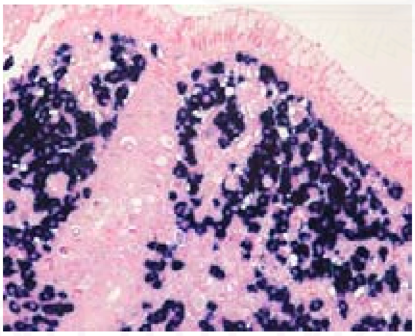
5. ผู้ป่วยหมายเลข 29

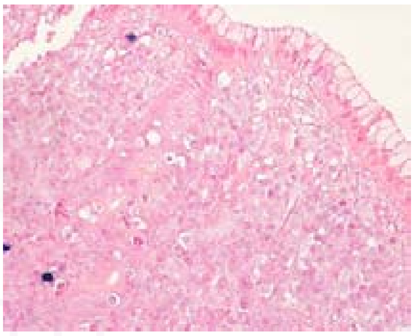




รูปที่77 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 29 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 38.5 (77:2)

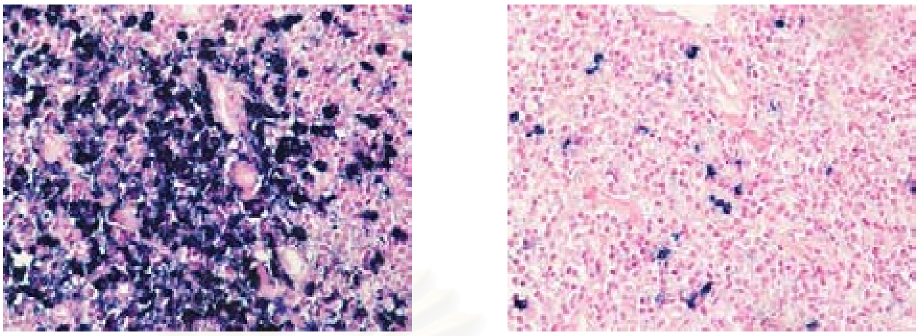
6. ผู้ป่วยหมายเลข 31





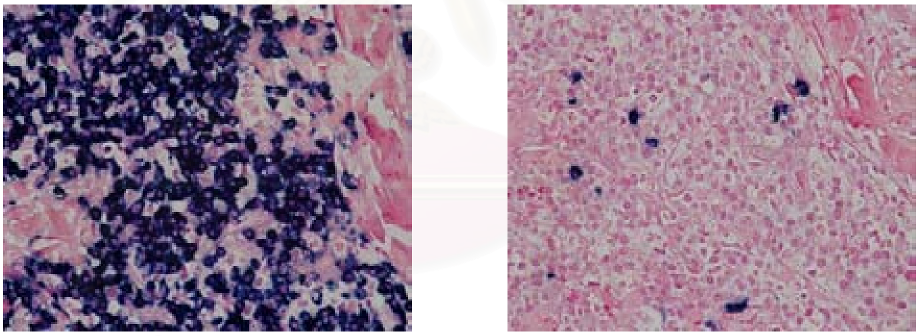
รูปที่ 78 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 31 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 111.67 (335:3)

7. ผู้ป่วยหมายเลข 33



รูปที่79 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 33 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 19.95 (399:20)

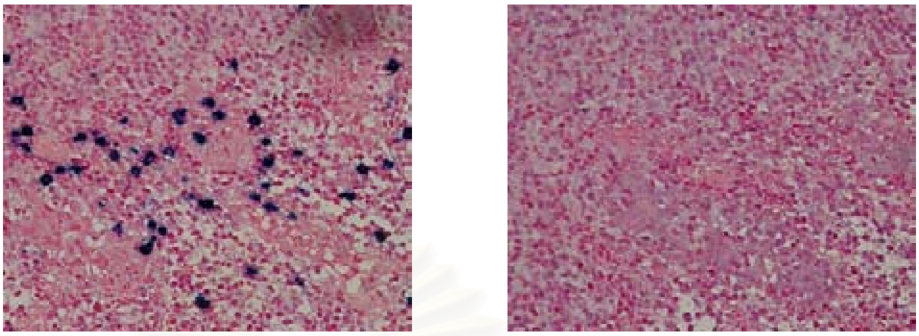
8. ผู้ป่วยหมายเลข 36



รูปที่80 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 36 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 35.3 (318:9)

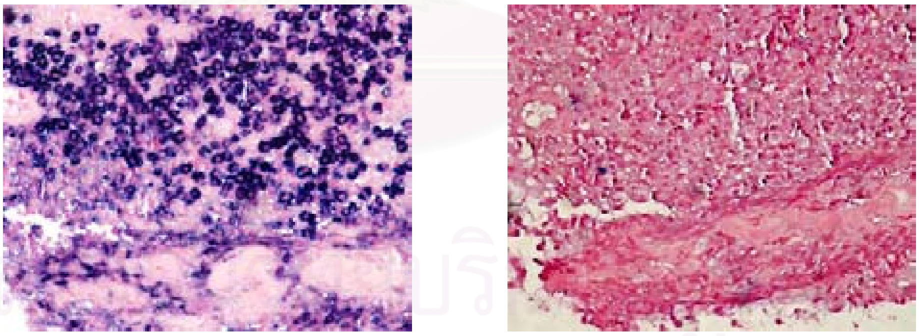
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ผู้ป่วยหมายเลข 38



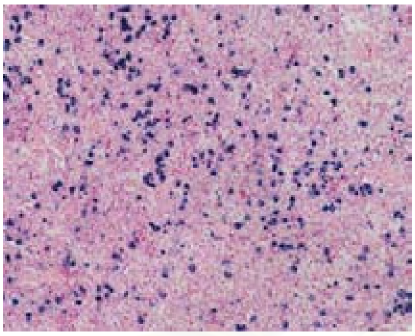
รูปที่81 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 38 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ ∞ (49:0)

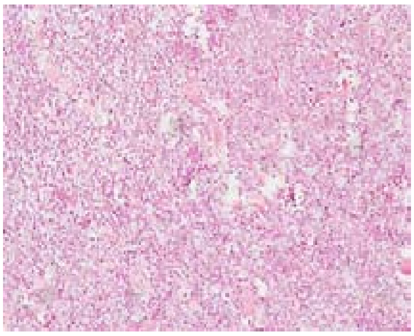
10. ผู้ป่วยหมายเลข 41



รูปที่82 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 41 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 112 (112:1)

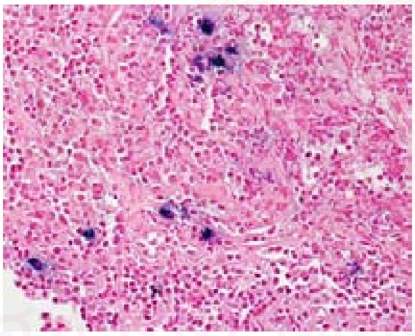
11. ผู้ป่วยหมายเลข 44

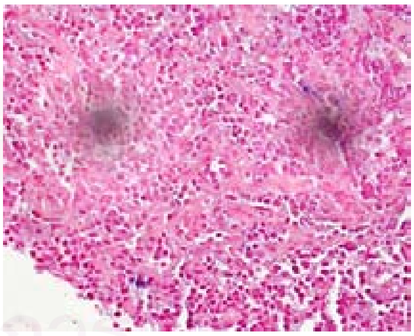




รูปที่83 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 44 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ ∞ (343:0)

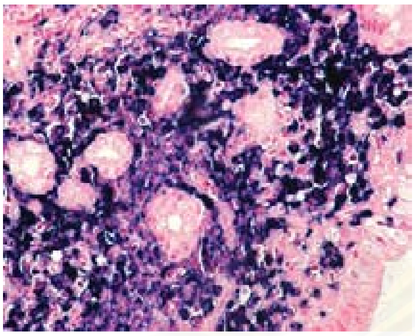
12. ผู้ป่วยหมายเลข 46

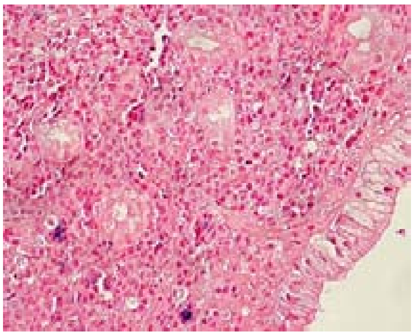




รูปที่84 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 46 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 14 (14:1)

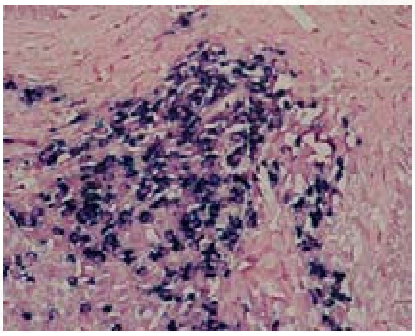
13. ผู้ป่วยหมายเลข 47

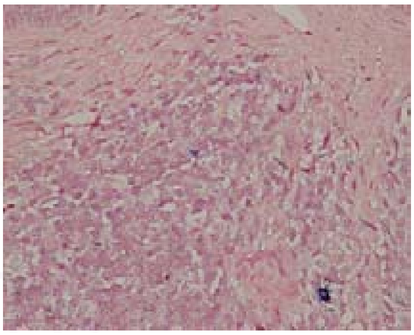




รูปที่85แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 47 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 275.5 (551:2)

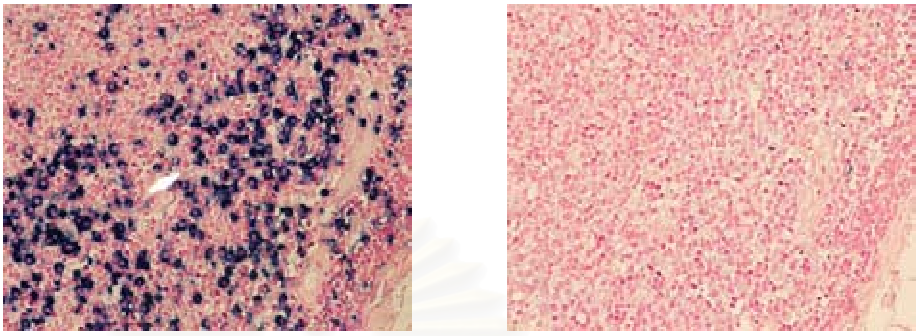
14. ผู้ป่วยหมายเลข 49





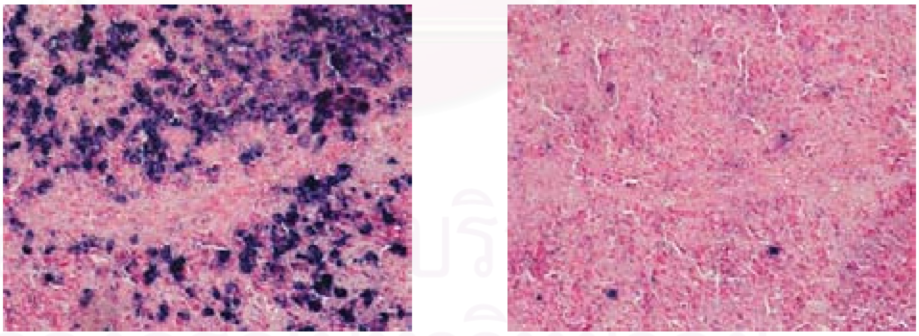
รูปที่86 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 49 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 110 (110:1)

15. ผู้ป่วยหมายเลข 55



รูปที่87 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 55 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 247 (247:1)

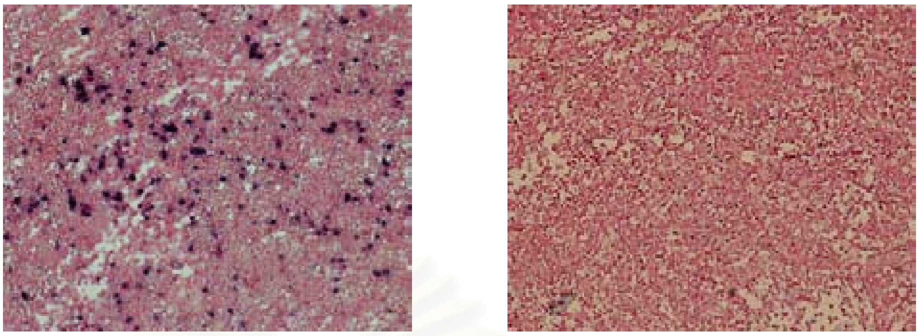
16. ผู้ป่วยหมายเลข 57



รูปที่88แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 57 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 47.6 (333:7)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

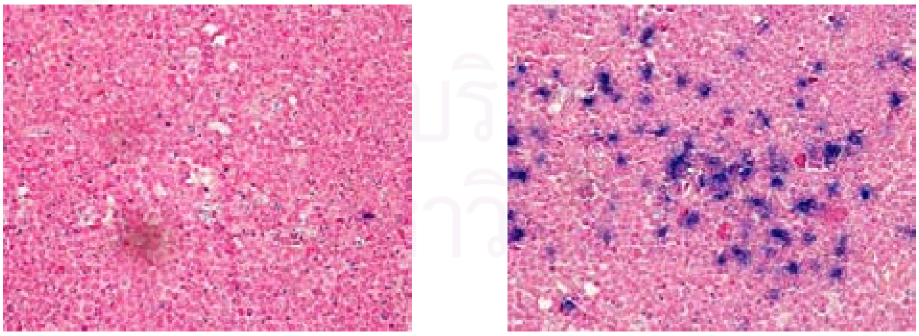
17. ผู้ป่วยหมายเลข 62



รูปที่89 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 62 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 181 (181:1)

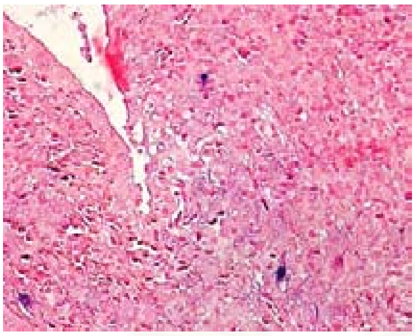
- **ผลการย้อมเป็น monoclonal ชนิด Lambda restriction โดยจะมีอัตราส่วนการย้อมเป็นKappa: lambda < 0.2 โดยในงานวิจัยนี้พบว่ามีช่วงของการเกิด Kappa restriction ตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.12**

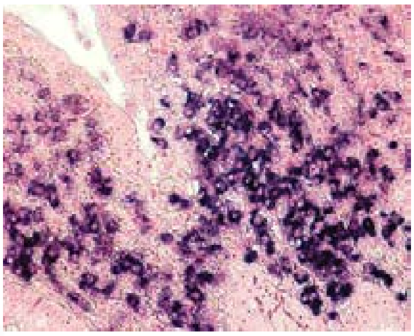
1. ผู้ป่วยหมายเลข 16



รูปที่90 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 16พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.01 (1:97)

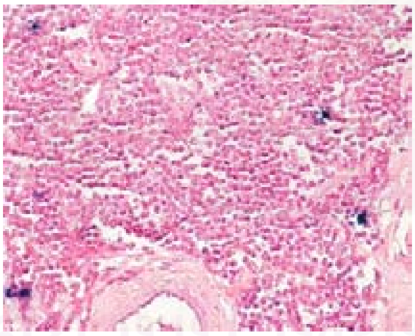
2. ผู้ป่วยหมายเลข 22

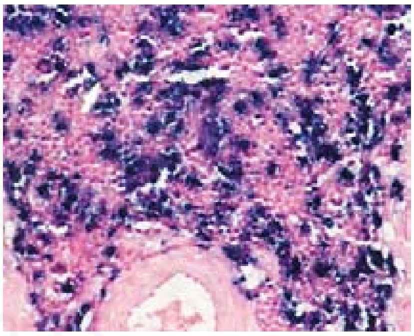




รูปที่91 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 22 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.07 (19:207)

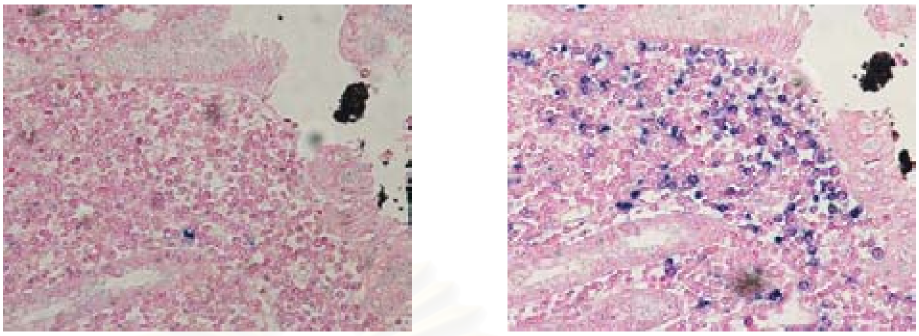
3. ผู้ป่วยหมายเลข 34





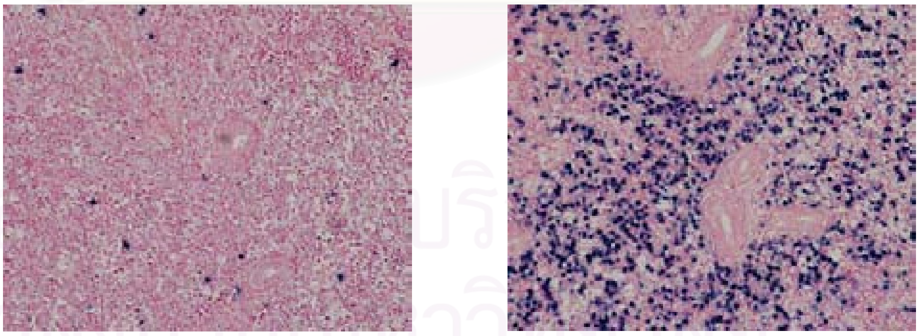
รูปที่92 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 34 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.02 (4:264)

4. ผู้ป่วยหมายเลข 40



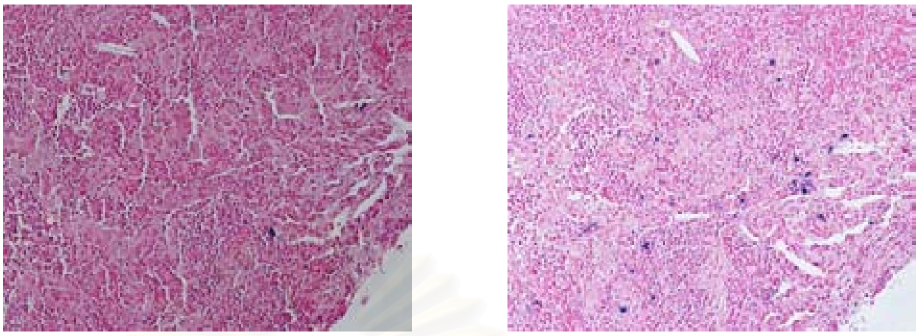
รูปที่93 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 40 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.01 (1:121)

5. ผู้ป่วยหมายเลข 43



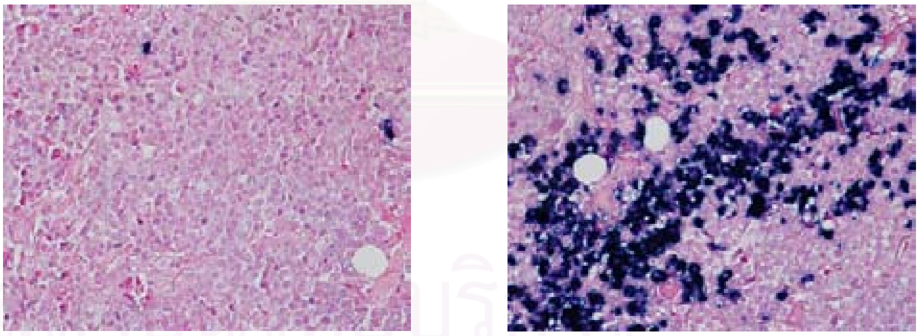
รูปที่94 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 43 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.02 (14:641)

6. ผู้ป่วยหมายเลข 50



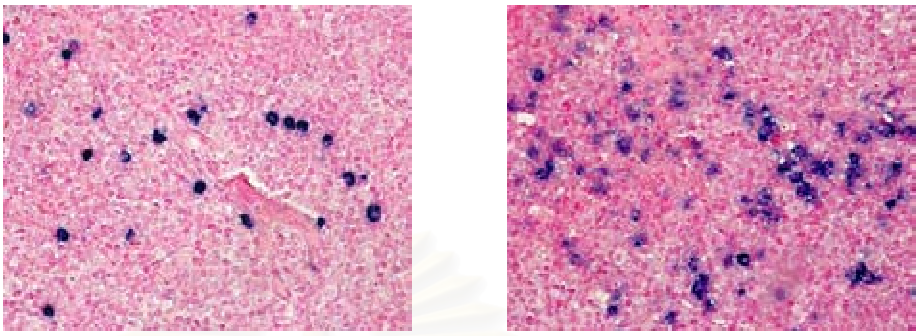
รูปที่95 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 50 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.03 (1:33)

7. ผู้ป่วยหมายเลข 51



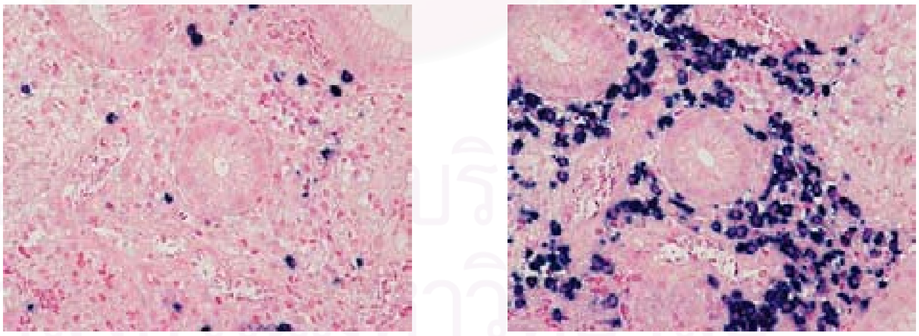
รูปที่96 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 51 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.01 (2:193)

8. ผู้ป่วยหมายเลข 53



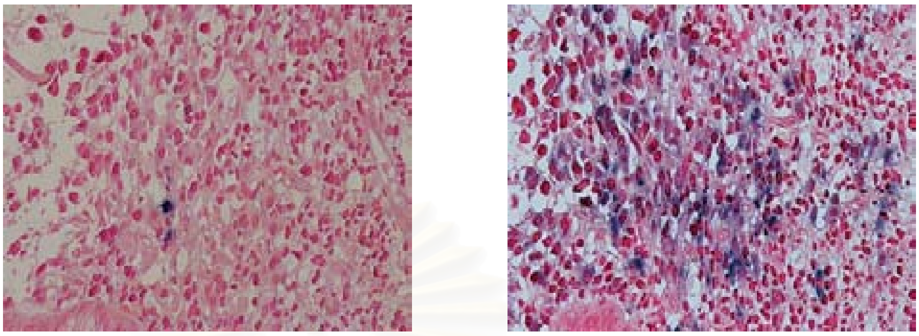
รูปที่97 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 53 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.03 (5:135)

9. ผู้ป่วยหมายเลข 54



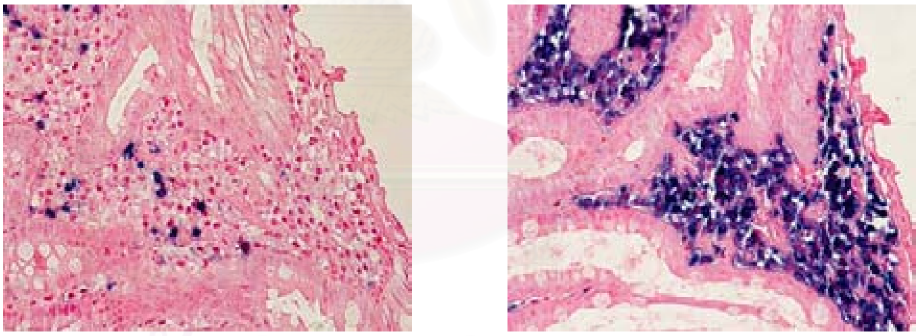
รูปที่98 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 54 พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.09 (18:192)

10. ผู้ป่วยหมายเลข 60



รูปที่99 แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 60
พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.02 (1:55)

11. ผู้ป่วยหมายเลข 61



รูปที่100แสดง การเปรียบเทียบผลการย้อม ISH ของผู้ป่วยหมายเลข 61
พบว่ามีอัตราส่วนของ Kappa (ซ้าย): lambda (ขวา) เท่ากับ 0.12 (25:210)

4.3 ผลสรุปการทดลองทั้งหมด 43 ราย ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 8

<u>ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ของทั้ง 3 วิธี</u>

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgGและ IgM	ผลการทดลองISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
3	MALT lymphoma	165 (165:1)	IgM	25.13 (201:8)	Positive	Monoclonal	CD43-
5	MALT lymphoma	18 (107:6)	IgM	13.25 (265:20)	Positive	Monoclonal	CD43-
6	MALT lymphoma	4.75 (19:4)	IgG	405 (405:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
9	MALT lymphoma	1.89 (227:120)	NA	3.49 (377:108)	Positive	Monoclonal	CD43-
16	MALT lymphoma	0.08 (6:70)	IgM	0.06 (1:97)	Positive	Monoclonal	CD43-
17	MALT lymphoma	2.76 (105:38)	NA	2.06 (62:30)	Positive	Monoclonal	CD43-
21	MALT lymphoma	37.3(112:3)	IgG	245(245:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
22	MALT lymphoma	0.005(1:190)	IgG	0.024(3:219)	Positive	Polyclonal	CD43-
23	MALT lymphoma	1.15(31:27)	NA	3.33(40:12)	Positive	Polyclonal	CD43-
27	MALT lymphoma	0.8(4:5)	NA	2(12:6)	Positive	Polyclonal	CD43-
29	MALT lymphoma	16.7(50:3)	IgM	38.5(77:2)	Positive	Monoclonal	CD43-
31	MALT lymphoma	57.5(230:4)	IgM	111.67(335:3)	Positive	Polyclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgGและ IgM	ผลการทดลองISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
32	MALT lymphoma	2.31(104:45)	NA	5.12(200:39)	Positive	Monoclonal	CD43-
33	MALT lymphoma	0.34(20:59)	IgG	19.95(399:20)	Positive	Polyclonal	CD43-
34	MALT lymphoma	0.01(1:153)	IgM	0.02(4:264)	Positive	Polyclonal	CD43-
35	MALT lymphoma	5.5(11:2)	NA	3.14(22:7)	Positive	Monoclonal	CD43-
36	MALT lymphoma	28.6(286:10)	IgG	35.33(318:9)	Positive	Polyclonal	CD43-
37	MALT lymphoma	1.2(29:24)	NA	1.6(60:36)	Positive	Monoclonal	CD43-
38	MALT lymphoma	60(60:1)	IgM	49(49:1)	Positive	Biclonal	CD43-
39	MALT lymphoma	2.57(18:7)	NA	5.34(43:8)	Positive	Monoclonal	CD43-
40	MALT lymphoma	0.25(12:48)	IgM	0.01(1:121)	Positive	Polyclonal	CD43-
41	MALT lymphoma	103(206:2)	IgG	112(112:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
42	MALT lymphoma	3.5(7:2)	NA	2.78(25:9)	Positive	Monoclonal	CD43-
43	MALT lymphoma	0.03(7:275)	IgG	0.02(14:641)	Positive	Polyclonal	CD43-

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgGและ IgM	ผลการทดลองISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
44	MALT lymphoma	38.33(115:3)	IgM	343(343:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
45	MALT lymphoma	0.97(34:35)	NA	2.28(41:18)	Positive	Polyclonal	CD43+
46	MALT lymphoma	7.5(15:2)	IgM	14(14:1)	Positive	Monoclonal	CD43-
47	MALT lymphoma	18.2(182:10)	IgM	350(350:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
48	MALT lymphoma	1.92(23:12)	NA	3.71(26:7)	Positive	Polyclonal	CD43-
49	MALT lymphoma	6.5(13:2)	IgG	110(110:1)	Positive	Monoclonal	CD43-
50	MALT lymphoma	0.03(1:33)	IgG	0.03(1:33)	Positive	Monoclonal	CD43-
51	MALT lymphoma	0.04(6:134)	IgM	0.01(2:193)	Positive	Monoclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgGและ IgM	ผลการทดลองISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
52	MALT lymphoma	1.5(15:10)	NA	2(12:6)	Positive	Polyclonal	CD43-
53	MALT lymphoma	0.01(1:180)	IgM	0.03(5:135)	Positive	Polyclonal	CD43-
54	MALT lymphoma	0.025(12:126)	IgG	0.09(18:192)	Positive	Monoclonal	CD43-
55	MALT lymphoma	61.25(245:4)	IgG	247(247:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
56	MALT lymphoma	1(13:13)	NA	1.54(67:44)	Positive	Polyclonal	CD43-
57	MALT lymphoma	14.69(235:16)	IgG	47.57(333:7)	Positive	Monoclonal	CD43-
58	MALT lymphoma	4.5(63:14)	NA	1.23(16:13)	Positive	Monoclonal	CD43-
59	MALT lymphoma	0.8(72:90)	NA	0.83(99:119)	Positive	Monoclonal	CD43-
60	MALT lymphoma	0.03(3:103)	IgM	0.02(1:55)	Positive	Polyclonal	CD43-
61	MALT lymphoma	0.02(6:280)	IgM	0.12(25:210)	Positive	Monoclonal	CD43-
62	MALT lymphoma	46(46:1)	IgG	181(181:1)	Positive	Polyclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 สรุปผลการทดลองผลบวกการตรวจหาผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR ของแยกตามอวัยวะที่เกิด MALT lymphoma

1. <u>ผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ของ MALT lymphoma ที่เกิดบริเวณ Orbit</u>

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น Orbit มีทั้งหมด 17 ราย โดย IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.3 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 3 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 8 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 47 แยกเป็น kappa restriction 6 ราย และ lambda restriction 2 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 8 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 47

<u>ตารางที่ 9 แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน orbit MALT lymphoma ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR</u>

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ IgGและ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองPCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลองPCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
9	MALT lymphoma	1.89 (227:120)	NA	3.49 (377:108)	Positive	Monoclonal	CD43-
27	MALT lymphoma	0.8(4:5)	NA	2(12:6)	Positive	Polyclonal	CD43-
29	MALT lymphoma	16.7(50:3)	IgM	38.5(77:2)	Positive	Monoclonal	CD43-
32	MALT lymphoma	2.31(104:45)	NA	5.12(200:39)	Positive	Monoclonal	CD43-
33	MALT lymphoma	0.34(20:59)	IgG	19.95(399:20)	Positive	Polyclonal	CD43-
34	MALT lymphoma	0.01(1:153)	IgM	0.02(4:264)	Positive	Polyclonal	CD43-
35	MALT lymphoma	5.5(11:2)	NA	3.14(22:7)	Positive	Monoclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ IgGและ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองPCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลองPCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
37	MALT lymphoma	1.2(29:24)	NA	1.6(60:36)	Positive	Monoclonal	CD43-
41	MALT lymphoma	103(206:2)	IgG	112(112:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
42	MALT lymphoma	3.5(7:2)	NA	2.78(25:9)	Positive	Monoclonal	CD43-
44	MALT lymphoma	38.33(115:3)	IgM	343(343:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
45	MALT lymphoma	0.97(34:35)	NA	2.28(41:18)	Positive	Polyclonal	CD43+
46	MALT lymphoma	7.5(15:2)	IgM	14(14:1)	Positive	Monoclonal	CD43-
48	MALT lymphoma	1.92(23:12)	NA	3.71(26:7)	Positive	Polyclonal	CD43-
51	MALT lymphoma	0.04(6:134)	IgM	0.01(2:193)	Positive	Monoclonal	CD43-
52	MALT lymphoma	1.5(15:10)	NA	2(12:6)	Positive	Polyclonal	CD43-
53	MALT lymphoma	0.01(1:180)	IgM	0.03(5:135)	Positive	Polyclonal	CD43-

2. <u>ผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ของ MALT lymphoma ที่เกิดบริเวณ Gastrointestinal tact</u>

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น Gastrointestinal tact มีทั้งหมด 13 รายแยกเป็น Stomach 10 ราย และ Small intestine 3 ราย ใน Small intestine IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 2 ใน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.7 แยกเป็น lambda restriction ทั้ง 2 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 3 ใน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ100 แยกเป็น kappa restriction 1 ราย และ lambda restriction 2 ราย และ PCR ไม่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ใน Small intestine ส่วน MALT lymphoma ที่เกิดที่ Stomach IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 5 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ50 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 2 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 3 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 60

<u>ตารางที่ 10 แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน stomach MALT lymphoma ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR</u>

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgG และ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
17	MALT lymphoma	2.76 (105:38)	NA	2.06 (62:30)	Positive	Monoclonal	CD43-
23	MALT lymphoma	1.15(31:27)	NA	3.33(40:12)	Positive	Polyclonal	CD43-
31	MALT lymphoma	57.5(230:4)	IgM	111.67(335:3)	Positive	Polyclonal	CD43-
39	MALT lymphoma	2.57(18:7)	NA	5.34(43:8)	Positive	Monoclonal	CD43-
40	MALT lymphoma	0.25(12:48)	IgM	0.01(1:121)	Positive	Polyclonal	CD43-

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ IgGและ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
47	MALT lymphoma	18.2(182:10)	IgM	350(350:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
54	MALT lymphoma	0.025(12:126)	IgG	0.09(18:192)	Positive	Monoclonal	CD43-
57	MALT lymphoma	14.69(235:16)	IgG	47.57(333:7)	Positive	Monoclonal	CD43-
59	MALT lymphoma	0.8(72:90)	NA	0.83(99:119)	Positive	Monoclonal	CD43-
61	MALT lymphoma	0.02(6:280)	IgM	0.12(25:210)	Positive	Monoclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน small intestine MALT lymphoma ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม marker: IHC	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgG และ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองPCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
6	MALT lymphoma	CD20+ CD3- CyclinD1- CD10-	4.75 (19:4)	IgG	405 (405:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
22	MALT lymphoma	CD20+ CD3- CyclinD1-	0.005(1:190)	IgG	0.024(3:219)	Positive	Polyclonal	CD43-
60	MALT lymphoma	CD20+ CD3- CyclinD1-	0.03(3:103)	IgM	0.02(1:55)	Positive	Polyclonal	CD43-

2. ผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ของ MALT lymphoma ที่เกิดบริเวณ อื่น ๆ นอกเหนือจาก Gastrointestinal tact และ Orbit

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น บริเวณอื่น มีทั้งหมด 13 ราย โดย IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 10 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 76.9 แยกเป็น kappa restriction 7 ราย และ lambda restriction 3 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 11 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.6 แยกเป็น kappa restriction 8 ราย และ lambda restriction 3 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 7 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.8

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดลองการตรวจหา monoclonality ใน บริเวณ อื่น ๆ นอกเหนือจาก Gastrointestinal tact และ Orbit ด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR

Number	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHC ของ IgGและ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
50	MALT lymphoma	0.03(1:33)	IgG	0.03(1:33)	Positive	Monoclonal	CD43-
58	MALT lymphoma	4.5(63:14)	NA	1.23(16:13)	Positive	Monoclonal	CD43-
36	MALT lymphoma	28.6(286:10)	IgG	35.33(318:9)	Positive	Polyclonal	CD43-
49	MALT lymphoma	6.5(13:2)	IgG	110(110:1)	Positive	Monoclonal	CD43-
16	MALT lymphoma	0.08 (6:70)	IgM	0.06 (1:97)	Positive	Monoclonal	CD43-
21	MALT lymphoma	37.3(112:3)	IgG	245(245:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
55	MALT lymphoma	61.25(245:4)	IgG	247(247:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
38	MALT lymphoma	60(60:1)	IgM	49(49:1)	Positive	Biclonal	CD43-
56	MALT lymphoma	1(13:13)	NA	1.54(67:44)	Positive	Polyclonal	CD43-
5	MALT lymphoma	18 (107:6)	IgM	13.25 (265:20)	Positive	Monoclonal	CD43-

PathoNo	ผลการทดลองในการย้อม H&E	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ Kappa:Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ IgGและ IgM	ผลการทดลอง ISH ของ Kappa:Lambda	ผลการทดลอง PCR ของ beta human globin gene	ผลการทดลอง PCR ของ Kappa and Lambda	ผลการทดลองในการย้อม IHCของ CD43
62	MALT lymphoma	46(46:1)	IgG	181(181:1)	Positive	Polyclonal	CD43-
3	MALT lymphoma	165 (165:1)	IgM	25.13 (201:8)	Positive	Monoclonal	CD43-
43	MALT lymphoma	0.03(7:275)	IgG	0.02(14:641)	Positive	Polyclonal	CD43-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ

5.1. สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

กลุ่มประชากรที่คัดเลือกเข้ามาศึกษาโดยใช้ลักษณะทาง histomorphology คือจะตรวจพบลักษณะของ Maginal zone cell ที่คล้ายกับ centrocyte และอาจพบ monocytoid cell บ้าง นอกจากนี้ยังพบรอยโรคที่สำคัญคือลักษณะของ lymphoepithelial lesion (LEL) และมี immunophenotype ดังนี้ CD20+, CD3-, CyclinD1- และ ตรวจ CD 10 – เฉพาะในรายที่สงสัยว่าเป็น follicular lymphoma [1,2] คัดเลือกกลุ่มประชากรเป้าหมายได้ 43 รายซึ่งได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็น MALT lymphoma แยกเป็น MALT lymphoma ที่ตำแหน่ง Gastrointestinal tact 13 รายแยกเป็นตำแหน่งที่เป็น Stomach 10 ราย และ Small intestine 3 ราย , ตำแหน่ง orbit 17 ราย และ MALT lymphoma ที่ตำแหน่งอื่น ๆ อีก 13 ราย โดยแบ่งเป็น skin 2 ราย, lung 2 ราย, upper aerodigestive mucosa 3 ราย, salivary gland (submental) 2 ราย, thyroid 2 รายและ breast อีก 2 ราย

ประชากรเป้าหมายถูกนำไปทดสอบด้วย 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR เพื่อเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ของทั้ง 3 วิธี ได้ผลดังนี้ IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 23 ใน 43 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.5 แยกเป็น kappa restriction 13 ราย คิดเป็นร้อยละ56.5 และ lambda restriction 10 รายคิดเป็นร้อยละ 43.5, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 28 ใน 43ราย คิดเป็นร้อยละ 65.1 แยกเป็น kappa restriction 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 60.7 และ lambda restriction 11 รายคิดเป็นร้อยละ 39.3 และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 21 ใน 43ราย คิดเป็นร้อยละ 48.8 ได้ผลสรุปดังตารางที่ 13

<u>ตารางที่ 13 แสดง ผลสรุปการตรวจพบผลบวก monoclonality ของแต่ละวิธีใน MALT lymphoma ทั่วร่างกาย</u>

วิธีการตรวจหาผลบวก monoclonality	ร้อยละผลบวก monoclonality	ร้อยละการเกิด kappa restriction	ร้อยละการเกิด lambda restriction
IHC	53.5	56.5	43.5
ISH	65.1	60.7	39.3
PCR	48.8	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 13 พบว่าร้อยละการเกิด Kappa restriction: lambda restriction เท่ากับ 1.5:1 (56.5:43.5, 60.7:39.3) ทั้งในการตรวจด้วยเทคนิค IHC และ ISH เป็นไปตามทฤษฎีที่ภาวะปกติจะมีการเลือก Kappa: Lambda light chain เป็น 2:1ซึ่งอธิบายได้ด้วยโอกาสที่จะมี rearrangement ของ Ig kappa light chain gene ก่อน ซึ่งถ้าล้มเหลวจึงมี rearrangement ของ Ig lambda light chain gene[1]

ในผลการทดลองที่ตรวจพบผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค IHC จะพบช่วงในการเกิด kappa restriction ตั้งแต่ 14.7-181 และ lambda restriction จะพบในช่วง 0.0005-0.08 และ ผลการทดลองที่ตรวจพบผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค ISH จะพบช่วงในการเกิด kappa restriction ตั้งแต่ 13.25 ถึง ∞ และ lambda restriction จะพบในช่วงตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.12 และในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ตรวจไม่พบ monoclonality ด้วยเทคนิค IHC มี 20 รายจะอยู่ในช่วง 0.25 ถึง 7.5 และ ISH ที่ตรวจไม่พบผลบวก monoclonality มี 15 ราย จะพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.23-5.34

นอกจากนี้ในการทำการวิจัยครั้งนี้จะมีการยืนยันผลในรายที่เกิด light chain restriction ของเทคนิค IHC ด้วยการตรวจดูการสร้าง heavy chain ของ immunoglobulin เพื่อบอกว่า monoclonality ที่ตรวจพบในส่วน light chain ของ immunoglobulin นั้นเป็นภาวะ monoclonality ไม่ใช่ภาวะ polyclonality ได้ผลการทดลองคิดเป็น IgM ร้อยละ 60.8(14/23) และ IgG ร้อยละ 39.1(9/23) ที่ตรวจสอบด้วย IHCจากรายที่เกิด light chain restriction แต่ถ้ารวมรายที่เกิด light chain restriction จากเทคนิค ISH พบว่าเป็นชนิด IgM 16 รายคิดเป็นร้อยละ 57.2(16/28) และ IgG 12 รายคิดเป็นร้อยละ 42.9 (12/28)จึงอาจกล่าวได้ว่าในรายที่เกิด light chain restriction นั้นมักจะตรวจพบในส่วนของ heavy chain ของ immunoglobulin เป็นชนิด IgM มากกว่าเล็กน้อย

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น Orbit มีทั้งหมด 17 ราย โดย IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 35.3 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 3 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 8 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 47 แยกเป็น kappa restriction 6 ราย และ lambda restriction 2 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 8 ใน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 47

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น Stomach IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 5 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ50 แยกเป็น kappa restriction

3 ราย และ lambda restriction 2 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 แยกเป็น kappa restriction 3 ราย และ lambda restriction 3 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 และได้มีการศึกษาได้ก่อนหน้านี้แล้ว 2 งานวิจัยที่เป็นการตรวจหาผลบวก monoclonality ในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่เป็น MALT lymphoma ที่บริเวณ stomach คือ

1) **คณะของ Sanya Sukpanichnant ได้การศึกษาการตรวจหาผล monoclonality ด้วยเทคนิค Simple PCR เปรียบเทียบกับ siminested PCR พบว่าสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 4 ใน 7 รายคิดเป็นร้อยละ 57 ด้วยเทคนิค simple PCR เมื่อเปรียบเทียบกับในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization ที่บริเวณ stomach ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 60พบว่าในงานวิจัยของ Sanya Sukpanichnant และคณะ สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค simple PCR ได้น้อยกว่าร้อยละ 3 อาจเนื่องมาจากจำนวนประชากรที่ศึกษามีจำนวนต่างกันและเกี่ยวเนื่องถึงการเกิด somatic hypermutation ในประชากรกลุ่มเป้าหมายที่ถูกเลือกมาศึกษาเกิดขึ้นต่างกัน จึงทำให้ผลการทดลองที่เกิดขึ้นมีร้อยละของการตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ต่างกันแต่ก็ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ[22]**
2) **เป็นงานวิจัยของ Hiroshi Inagaki และ คณะที่การวิจัยเพื่อตรวจหาผลบวก monoclonality ใน GI low grade lymphoma ด้วย 3 วิธี [23]ได้ผลการเปรียบเทียบดังตารางที่ 14**

ตารางที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ของ Hiroshi Inagaki และคณะ (A)เปรียบเทียบกับในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization(B)

วิธีทดสอบ	A (n=10)	B (n=10)
IHC	4/10 ร้อยละ 40	5/10 ร้อยละ 50
ISH	5/10 ร้อยละ 50	6/10 ร้อยละ 60
PCR	7/10 ร้อยละ 70	6/10 ร้อยละ 60

A คือ งานวิจัยของ Hiroshi Inagaki และ คณะ

B คือ งานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization

พบว่าผลการเปรียบเทียบที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันคือในงานวิจัยเดิมของ Hiroshi Inagaki และ คณะพบว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดคือตรวจได้ถึงร้อยละ 70 แต่ในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization นั้นพบว่า ISH และ PCR เป็นเทคนิคที่ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดคือร้อยละ 60 จะเห็นได้ว่าเทคนิค ISH ในปัจจุบันตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากกว่างานวิจัยเดิมที่ทำมาแล้วอาจเป็นเหตุผลในเรื่องของเทคนิคที่มีการพัฒนาขึ้นโดยในการวิจัยในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาโดยใช้ Automate system ในการทำการย้อม ISH เพื่อแก้ปัญหาในเรื่องของเวลาที่ใช้ในการทำโดย Automate system จะใช้เวลาเพียง 4 ชั่วโมงและเพิ่มความคงตัวในเรื่องของ อุณหภูมิของการย้อมในแต่ละแผ่น รวมถึงมีการพัฒนา probe ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในปัจจุบันจึงทำให้ sensitivity สูงขึ้น [12,14] ในขณะที่การใช้ manual technique นั้นยังส่งผลให้เกิด background มารบกวนในการแปลผลการทดลองได้ ส่วนเทคนิค PCR เดิมสามารถตรวจพบผลบวกได้สูงอาจเกิดจากความแตกต่างของเทคนิค PCR คือในงานวิจัยของ Hiroshi Inagaki และ คณะ นั้นเป็น seminested PCR ซึ่งจะช่วยเพิ่ม yield,มากขึ้นจึงตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ในร้อยละที่สูงกว่าในงานวิจัยนี้ที่ใช้เป็น simple PCR

MALT lymphoma ที่เกิดใน และ Small intestine พบทั้งหมด 3 ราย ใน Small intestine IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 2 ใน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.7 แยกเป็น lambda restriction ทั้ง 2 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 3 ใน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ100 แยกเป็น kappa restriction 1 ราย และ lambda restriction 2 ราย และ PCR ไม่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ใน Small intestine

ประชากร MALT lymphoma ที่ตรวจพบในตำแหน่งที่เป็น บริเวณอื่น มีทั้งหมด 13 ราย โดย IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 10 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ76.9 แยกเป็น kappa restriction 7 ราย และ lambda restriction 3 ราย, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 11 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.6 แยกเป็น kappa restriction 8 ราย และ lambda restriction 3 ราย และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 6 ใน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.2 สรุปผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ในแต่ละอวัยวะด้วยเทคนิค IHC, ISH และ PCR ดังตารางที่ 15

<u>ตารางที่ 15 แสดงผลการตรวจพบผลบวก monoclonality ของ IHC, ISH และ PCR ของแต่ละอวัยวะที่ตรวจพบ MALT lymphoma</u>

อวัยวะที่เกิด MALT lymphoma	IHC	ISH	PCR
Orbit (n=17)	35.3	47	47
Stomach (n=10)	50	60	60
Small intestine (n=3)	66.7	100	-
Other (n=13)	76.9	84.6	46.2

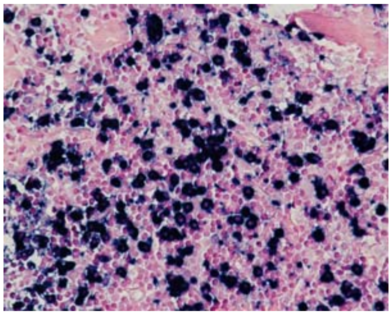
จากตารางจะพบว่าในแต่ละอวัยวะที่เกิด MALT lymphoma นั้นตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ด้วยแต่ละวิธีได้ต่างกัน โดยเทคนิค IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดใน อวัยวะอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ orbit และ gastrointestinal tact คือตรวจพบได้ร้อยละ 76.9(10/13), ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดใน Small intestine คือตรวจพบได้ร้อยละ 100 (3/3) และเทคนิค PCR ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากที่สุดใน Stomach คือร้อยละ 60 แต่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้เท่ากับเทคนิค ISH เช่นเดียวกับใน Orbit ที่เทคนิค ISH และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้เท่ากันคือร้อยละ 47 จากผลการทดลองนี้ทำให้พบว่าการตรวจหาผลบวก monoclonality ในแต่ละตำแหน่งที่เกิด MALT lymphoma นั้นมีความแตกต่างกันจึงทำให้การเลือกวิธีที่ตรวจหาผลบวก monoclonality ควรเลือกตามความเหมาะสมตามผลการทดลองที่แสดงมาข้างต้น

ในการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ของ MALT lymphoma ทั่วร่างกายนั้น พบว่า IHC สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 53.5, ISH สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality เป็นร้อยละ 65.1 และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 48.8 นำค่าผลบวก monoclonality ที่ได้ไปทดสอบค่าทางสถิติเพื่อหาค่าความแตกต่างของทั้ง 3 วิธีว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยเลือกใช้ Cochran test ซึ่งเป็นการทดสอบทางสถิติที่ใช้กับข้อมูลเชิงลักษณะ (Categorical data) เพื่อเปรียบเทียบการทดสอบ 3 วิธี ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าทั้ง 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ จึงสรุปได้ว่าทั้ง 3 วิธี คือ IHC, ISH และ PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ผลบวก monoclonality ที่วัดได้ของแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในร้อยละของการตรวจพบผลบวก monoclonality อาจมาจากเหตุผลดังนี้

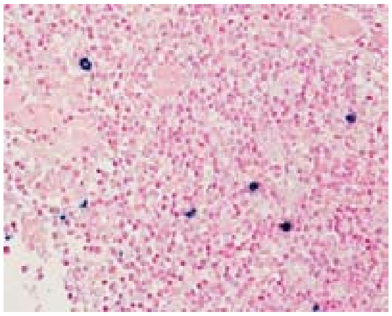
1) **ในการตรวจหาผลบวก monoclonality ในส่วนของ light chain ด้วย 2 วิธี พบว่ามี 5 รายที่เกิดผลแตกต่างกันตรวจสอบผลบวก monoclonality ได้ด้วย ISH แต่ไม่สามารถตรวจสอบด้วย IHC ได้แยกออกได้ 2 กลุ่ม**

   <u>กลุ่มที่ 1 มี 3 รายที่พบว่ามีการสร้าง Ig light chain mRNA แต่ไม่พบการสร้าง Ig light chain protein</u>

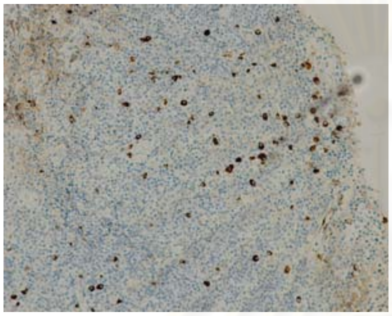
   โดยผลการทดลองที่ได้พบว่ามีการสร้าง mRNA เพราะสามารถตรวจสอบผลบวก monoclonality ได้ที่ระดับ mRNA ผลที่ได้พบว่าเป็นชนิด kappa restriction ทั้ง 3 ราย แต่เมื่อตรวจโปรตีนด้วย IHC พบว่าไม่มีการสร้าง Ig kappa light chain แต่เมื่อตรวจวัดโปรตีน ในระดับ Ig heavy chain พบว่ามีการสร้าง Ig heavy chain ชนิด IgG จึงสรุปผลการทดลองได้ว่าใน 3 รายนี้มีการสร้างเฉพาะ mRNA ของ Ig light chain แต่ไม่มีการสร้าง โปรตีน Ig light chain จึงอาจกล่าวได้ว่า ISH เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ครอบคลุมกว่าเทคนิค IHC เพราะป้องกันการตรวจในรายที่มีความผิดปกติในกระบวนการ translation ได้ แสดงให้ดูดังรูปที่ 101



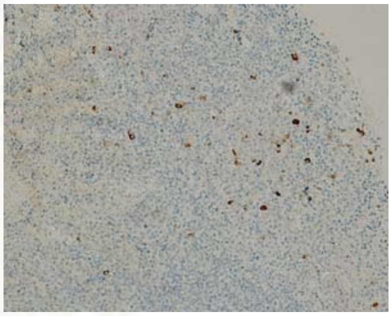
(1)ISH –kappa



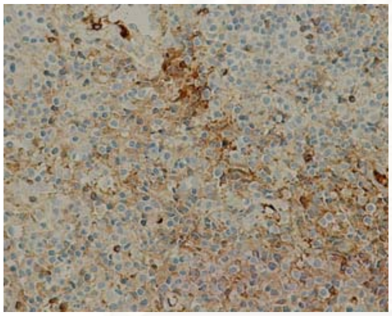
(2)ISH-lambda



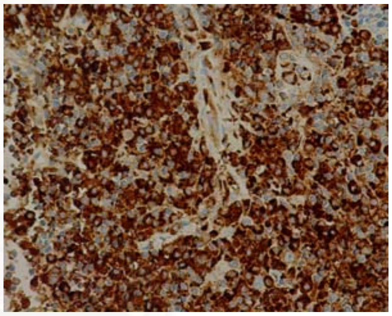
(3)IHC-kappa



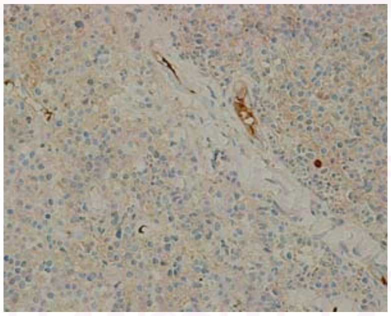
(4) IHC-lambda



(5)IHC-IgM



(6) IHC-IgG

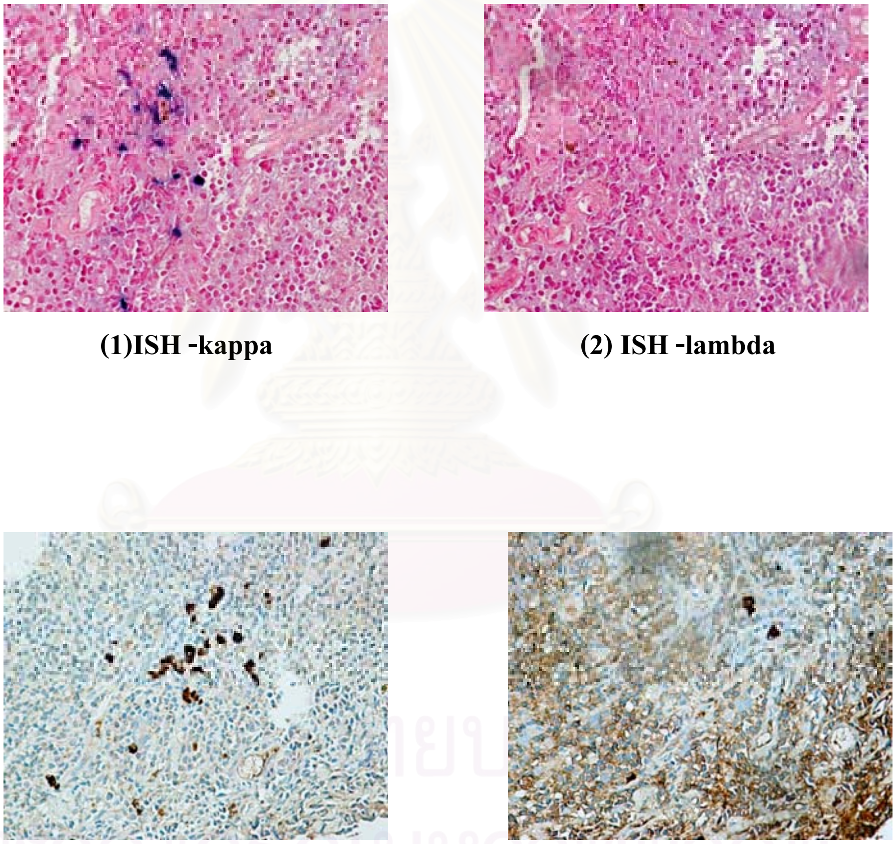


(7)IHC-IgA

รูปที่ 101 แสดงผลการเปรียบเทียบการย้อม ISH kappa(1): lambda(2) เท่ากับ 13.2 เป็นชนิด kappa restriction เทียบกับผลการย้อม IHC ในส่วนของ light chain พบว่า IHC kappa(3): lambda(4) เท่ากับ 0.34 ไม่เกิด light chain restriction และยืนยันผลโดยการตรวจ IHC ต่อ heavy chain ได้ผล (5)IHC-IgM เท่ากับ 6 cell, (6) IHC-IgG เท่ากับ 449 cell และ (7) IHC-IgA เท่ากับ 1 cell

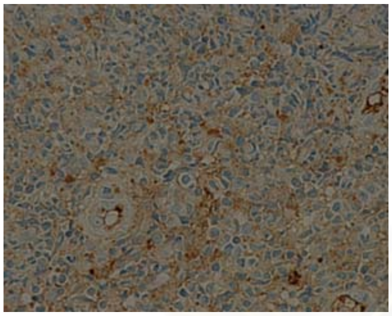
<u>กลุ่มที่ 2 มี 2 รายที่ตรวจสอบผลบวก monoclonality ได้ด้วย ISH ได้ผล restriction ชัดเจน แต่ IHC ได้ผลในการคำนวณค่าสัดส่วนของ kappa: lambda ไม่ชัดเจน</u>

ใน 2 รายนี้พบว่าในการตรวจผลบวก monoclonality ด้วยเทคนิค IHC พบว่ามีปัญหาในเรื่องของ background [12] ที่ส่งผลให้เกิดการรบกวนการแปลผลการทดลองในขณะที่ 2 รายสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ด้วยเทคนิค ISH จึงสรุปได้ว่าเทคนิค ISH ช่วยในการแปลผลการทดลองให้ง่าย ถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 102

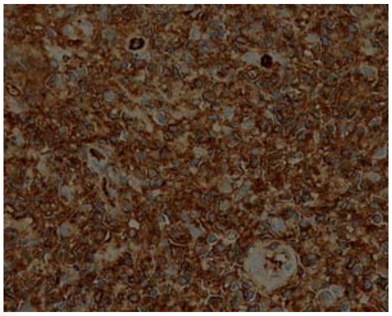


(1)ISH -kappa **(2) ISH -lambda**

(3) IHC -kappa **(4) IHC -lambda**



(5)IHC-IgG



(6)IHC-IgM

รูปที่ 102 แสดงผลการเปรียบเทียบการย้อม ISH kappa(1): lambda(2) เท่ากับ 14 เป็นชนิด kappa restriction เทียบกับผลการย้อม IHC ในส่วนของ light chain พบว่า IHC kappa(3): lambda(4) เท่ากับ 7.5 ไม่เกิด light chain restriction และยืนยันผลโดยการตรวจ IHC ต่อ heavy chain ได้ผล (5)IHC-IgM+ และ (6) IHC-IgG -

2) ในการตรวจหาผลบวก monoclonality ในส่วนของ heavy chain ด้วยเทคนิค PCR ที่ตรวจสอบในส่วนของ Ig gene rearrangement นั้นพบว่าตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 48.8 ซึ่งต่ำกว่า IHC และ ISH อาจเป็นผลมาจาก paraffine embedded tissue นั้นจะทำให้โครงสร้างของ DNA มีขนาดสั้นลงหรือเสียรูปร่างไป [22]และมีการกล่าวไว้ในก่อนหน้านี้แล้วว่า MALT lymphoma นั้นมักจะเกิด somatic hypermutation ได้ในบริเวณ variable part[1,2] จึงทำให้การเข้าจับของ primer นั้นลดลงในรายที่เกิด somatic hypermutation เนื่องจากการสร้าง primer ในการทดลองนี้จะเป็นการสร้างแบบ consensus primer ซึ่งจะทำให้ specific ลดลงในบริเวณ variable part ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสได้จึงทำให้การจับของ primer ลดลง แต่ที่เลือกใช้ consensus primer เนื่องจากมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานจริงรวมถึงสะดวกและมีการใช้งานกันอยู่ [22] จึงเหมาะกับประโยชน์ในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain

reaction และ in situ hybridizationเพื่อใช้ในการแก้ปัญหาที่เกิดในการปฏิบัติงานจริง จึงเลือกใช้ consensus primer ในการวิจัยเพื่อศึกษา Ig gene rearrangement ในครั้งนี้ อีกทั้งเทคนิค PCR ที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้จะเป็น Seminested PCR มากกว่าโดยทุกงานวิจัยกล่าวว่า Seminested PCR จะช่วยเพิ่ม yield ของ DNA ที่มาจาก paraffin embedded tissueเนื่องจาก DNA จะมีการสูญเสียโครงสร้างไปในขั้นตอนต่าง ๆ ของปฏิกิริยา [22] แต่ในงานวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบการตรวจหา monoclonality ของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) โดยวิธี immunohistochemistry, polymerase chain reaction และ in situ hybridization เลือกใช้เทคนิค simple PCR เนื่องมาจากมีงานวิจัยของ Sanya Sukpanichnant และคณะที่ศึกษาไว้ใน GI MALT lymphoma นั้นพบว่า Simple PCR สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 4/7 ราย ในขณะที่ Seminested PCRสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ 5/7 ราย นั้นหมายความว่า Seminested PCR นั้นตรวจพบผลบวก monoclonality ได้มากกว่า Simple PCR เพียง 1 ราย [22] เท่านั้นจึงทำให้ผู้วิจัยเห็นว่า การเลือกใช้ Simple PCR เพราะว่า เป็นเทคนิคที่สะดวก ง่าย และประหยัดเวลากว่า Seminested PCR รวมถึงช่วยการลดปัญหาในเรื่องของ contamination ที่มักเกิดใน Seminested PCR ที่จะต้องทำ PCR 2 รอบจึงมักเกิด contamination ระหว่างทำปฏิกิริยาและ ถ้าจะนำไปใช้ในการปฏิบัติงานจริง Simple PCR ก็น่าจะเป็นเทคนิคที่ถูกเลือกมากกว่าเนื่องจากจะช่วยในการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจรักษาแต่ละครั้ง

3) **พบว่ามีทั้งหมด 6 รายที่ได้รับการวินิจฉัยในข้างต้นด้วย histomorphology และ immunophenotype แล้วว่าเป็น MALT lymphoma แต่ไม่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ด้วยทั้ง 3 วิธี อาจจะมีเหตุผลมาจาก**
   - **IHC มีปัญหาในเรื่องการแปลผลจาก background ที่รบกวนการแปลผลและมี cell ที่เป็นPlasma cell differentiation น้อยจึงไม่สามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้**

- **ISH เป็นการตรวจหา monoclonality ระดับ mRNA ซึ่งจำนวนของ Ig mRNA จะต้องมีจำนวนมากพอที่จะทำให้เทคนิค ISH ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ [12,14]**
- **PCR อาจมี Yield ของ DNA ที่ต่ำกว่าเทคนิค seminested PCR เพราะในการทดลองเป็น simple PCR [22] จึงตรวจ monoclonality ไม่ได้ และผลจาก Somatic hypermutation นั้นก็จะทำให้ primer ไม่สามารถเข้าจับได้อีกทั้ง primer ที่เลือกนำมาใช้เป็น Consensus primer ซึ่งได้มีงานวิจัยได้ทำาการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ว่าไม่ specific เท่ากับ primer ชนิด family specific primer จึงทำให้ความมีประสิทธิภาพในการตรวจหา monoclonality ด้วยเทคนิค PCR ลดลง [14]**

จากผลการทดลองทั้ง 7 รายนี้พบว่าทั้ง 3 วิธีไม่สามารถให้ผลบวก monoclonality ได้จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้ง 3 วิธีนี้มีความไวไม่พอที่จะตรวจพบผลบวก monoclonality ในรายที่มีข้อจำกัดเช่นนี้ จากผลการทดลองจะพบได้คิดเป็นร้อยละ 14 (6ใน 43ราย)

ในงานวิจัยนี้ยังได้มีการย้อม CD43 เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัย B cell malignancy ในงานวิจัยนี้พบว่าสามารถย้อม CD 43 ติดได้เพียงแค่ 1/43 รายเท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 2.3

5.2. ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้นพบว่าทั้ง 3 วิธีคือ IHC, ISH และ PCR นั้นสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจึงทำให้นำไปสู่การทดสอบทางสถิติเพื่อที่จะหาวิธีที่ตรวจหาผลบวก monoclonality ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด จึงเลือกวิธีการจับคู่วิธีที่ใช้ตรวจสอบ monoclonality ดังนี้

1. **IHC คู่กับ ISH**

   IHC คู่กับ ISH เปรียบเทียบกับ IHC

   IHC คู่กับ ISH เปรียบเทียบกับ ISH

   IHC คู่กับ ISH เปรียบเทียบกับ PCR

2. **IHC คู่กับ PCR**

   IHC คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ IHC

IHC คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ ISH

IHC คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ PCR

3. ISH คู่กับ PCR

ISH คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ IHC

ISH คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ ISH

ISH คู่กับ PCR เปรียบเทียบกับ PCR

วิเคราะห์โดยใช้ Descriptive Statistics แบบ crosstabs ชนิด McNemar test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 พบว่าการทดสอบเป็นดังตารางที่ 16

ตารางที่16 แสดงผลการทดสอบทางสถิติ McNemar test

วิธีการตรวจหา monoclonality	ร้อยละผลบวก monoclonality ที่ตรวจได้	ค่า p
IHC คู่กับ ISH VS IHC	67.4 VS 53.5	p>0.05
IHC คู่กับ ISH VS ISH	67.4 VS65.1	p>0.05
IHC คู่กับ ISH VS PCR	67.4 VS48.8	p>0.05
IHC คู่กับ PCR VS IHC	81.4 VS 53.5	p<0.05
IHC คู่กับ PCR VS ISH	81.4 VS65.1	p>0.05
IHC คู่กับ PCR VS PCR	81.4VS48.8	p<0.05
ISH คู่กับ PCR VS IHC	86 VS 53.5	p<0.05
ISH คู่กับ PCR VS ISH	86 VS65.1	p<0.05
ISH คู่กับ PCR VS PCR	86VS48.8	p<0.05

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค ISH เมื่อจับคู่กับ PCR แล้วเปรียบเทียบกับ ทั้ง 3 วิธีพบว่าเกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ และสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ถึงร้อยละ 86 และ IHC คู่กับ PCR สามารตรวจวัดผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 81.4 และ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR อย่างเดียว ในขณะที่ IHC คู่กับ ISH ตรวจพบผลบวก monoclonality ได้

ร้อยละ67.4 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 3 วิธีแล้วไม่เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจต่อไปว่า ทั้ง 2 วิธีคือ ISH คู่กับ PCR และ IHC คู่กับ PCR มีความแตกต่างกันหรือไม่จึงใช้การทดสอบทางสถิติ ใช้ Descriptive Statistics แบบ crosstabs ชนิด McNemar test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95ได้ผลดังตารางที่ 17

<u>ตารางที่ 17 แสดงผลการเปรียบเทียบผลบวก monoclonality ระหว่าง ISH คู่กับ PCR และ IHC คู่กับ PCR</u>

วิธีการตรวจหา monoclonality	ร้อยละผลบวก monoclonality ที่ตรวจได้	ค่า p
ระหว่าง ISH คู่กับ PCR VS IHC คู่กับ PCR	86 VS 81.4	p>0.05

ผลการทดลองที่ได้พบว่าไม่เกิดความแตกต่างกันทางสถิติจึงนำไปสู่ข้อสรุปว่าการเลือกใช้ ISH คู่กับ PCR หรือ IHC คู่กับ PCRไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าดูแค่เพียงร้อยละของผลบวก monoclonality อาจเห็นว่า ร้อยละของ ISH คู่กับ PCR จะได้ผลที่ดีกว่าจึงทำให้ต้องมองไปสู่ความคุ้มทุนในการตรวจวินิจฉัย ดังแสดงในตารางที่ 15

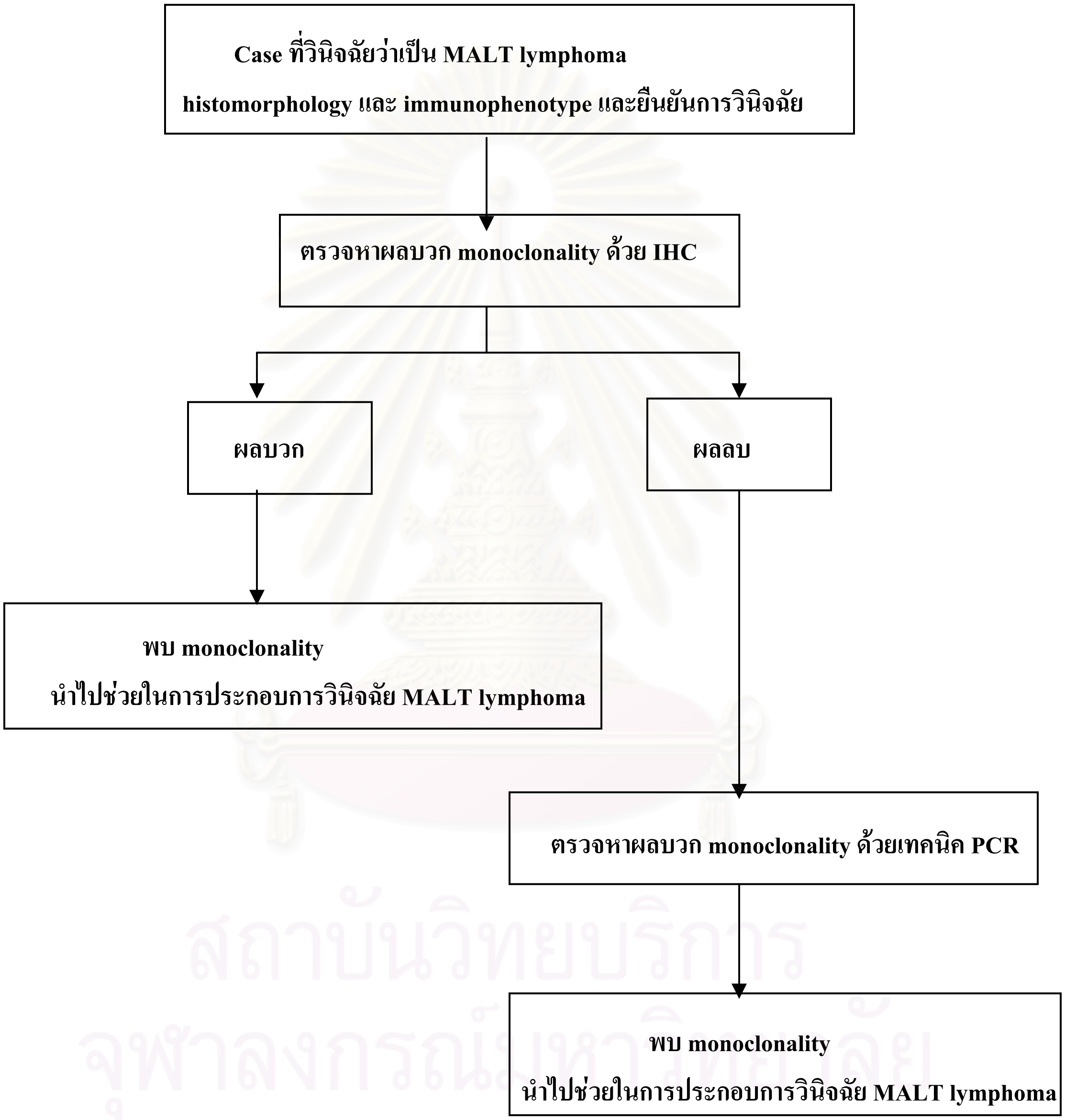
<u>ตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบ เวลาในการตรวจวินิจฉัยของแต่ละวิธี, ร้อยละผลบวก monoclonality และ ราคาในการวินิจฉัย</u>

วิธีที่ใช้ตรวจผลบวก monoclonality	เวลาที่ใช้ในการวินิจฉัย	ร้อยละผลบวก monoclonality ที่ตรวจพบ	ราคาต่อ 1 test
PCR	5 วัน	48.8	3500
ISH	4 ชั่วโมง	65.1	2800
IHC	4 ชั่วโมง	53.5	800

พบว่าการวินิจฉัยโดยใช้ IHC และ ISH นั้นใช้เวลาในการทดสอบเท่ากันร้อยละ การตรวจพบผลบวก monoclonality ใน ISH มากกว่าใน IHC แต่มากกว่าอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ราคาในการตรวจวินิจฉัยของ IHC มีราคาถูกกว่า จึงส่งผลให้ในการเลือกวิธีการตรวจวินิจฉัยนั้นควรเลือก IHC คู่กับ PCR น่าจะมีความคุ้มทุนกว่าการใช้เทคนิค ISH คู่กับ

PCR เนื่องจากค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยนั้มีความแตกต่างกันถึง test ละ 2000 บาท จึงทำให้ผู้วิจัยแนะนำให้ใช้วิธี IHC คู่กับ PCR มากกว่า

แต่การวินิจฉัยจริงนั้นอาจไม่จำเป็นต้องส่งตรวจพร้อมกันดังนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยในการวินิจฉัยจริงนั้น เมื่อพบ case ที่วินิจฉัยว่าเป็น MALT lymphomaและโดยการตรวจวินิจฉัยด้วย histomorphology และ immunophenotype นั้นแล้วเลือกตรวจวินิจฉัยด้วย IHC ก่อน เนื่องจากมีราคาในการวินิจฉัยถูกกว่า PCR และใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยน้อยกว่า ถ้าสามารถตรวจพบผลบวก monoclonality ได้ก็นำไปยืนยันการวินิจฉัยจาก histomorphology และ immunophenotype แต่ถ้าผลที่ตรวจวินิจฉัยด้วย IHC แล้วไม่พบ monoclonality จึงนำ case เหล่านี้มาตรวจวินิจฉัยด้วย PCR ซ้ำอีกครั้ง จะทำให้การตรวจวินิจฉัยนี้สามารถให้ผลบวก monoclonality ได้ร้อยละ 81.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. สัญญา สุขพณิชนันท์, การวินิจฉัยและความรู้ทางโลหิตพยาธิวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์งานตำราวารสารและสิ่งพิมพ์ (โครงการตำรา – ศิริราช), ปี พ.ศ. 2548.
2. พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์. พยาธิสภาพ . ใน : ธานินทร์ อินทรกำธรชัย. , มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอน – ฮอดจ์กิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ปี พ.ศ. 2546. : หน้า 26-67.
3. Intragumtornchai T, Wannakrairoj P, Chaimongkol B, Bhoopat L, Lekhakula A, Thamprasit T Suwanwanwela N, suthipinthawong C, Prayoonwiwat W, Meekungwal P, Sirijerachai C , Pairojkul C. Non-Hodgkin's lymphomas in Thailand. A retrospective pathologic and clinical analysis of 1391 cases. CANCER 1996 ; 78:1813-1819.
4. Sukpanichnant S., Udomsakdi–Aue warakul C., ruchutrakool T., Leelakusovong S., Boonpongmanee S. and Chinswangwatanakul V..Gastrointestinal lymphoma in Thailand: A clinicopathologic analysis of 120 cases at siriraj hospital according to WHO classification. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004; 35(4):9966-76.
5. Zeppa P., Marino G., Troncone G., Fulciniti F., De Renzo A., Picardi M., Benincasa G., Rotoli B., Vetrani A., Palombini L.. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. J Cancer. 2004;25:102(1):55-65.
6. Speight PM, Jordan R, Colloby P, Nandha H, Pringle JH. Early detection of lymphomas in Sjogren's syndrome by in situ hybridisation for kappa and lambda light chain mRNA in labial salivary glands. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1994;30B(4):244-7.
7. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. อิมมูโนวิทยา.2537.
8. Martin-Subero JI, Harder L, Gesk S, Schlegelberger B, Grote W, Martinez-Climent JA, Dyer MJ, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R. Interphase FISH assays for the

detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci. J Cancer. 2002;98(3):470-4.

9. ธานินทร์ อินทรกำธรชัย. พัฒนาการของลิมโฟไซท์ . ใน : ธานินทร์ อินทรกำธรชัย. , มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดนอน – ฮอดจ์กิน. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , ปี พ.ศ. 2546. : หน้า 16-25.

10. Amane Yamauchi, M.D., Yasuhiko Tomita, M.D., Hideaki Miwa, M.D., Haruhiko Sakamoto, M.D., Haruo Sugiyama, M.D., Katsuyuki Aozasa, M.D. Clonal Evolution of Gastric Lymphoma of Mucosa- Associated Lymphoid Tissue Type. Mod Pathol 2001; 14(10):957–962.

11. Eric D. His and Subramanian Yegappan.lymphoma immunophenotype: Anew Era in Paraffin-section immunohistochemistry.Advances in Anatomic Pathology, 2001; 8:No.4:218-239.

12. Beck RC, Tubbs RR, Hussein M, Pettay J, Hsi ED. Automated colorimetric in situ hybridization (CISH) detection of immunoglobulin (Ig) light chain mRNA expression in plasma cell (PC) dyscrasias and non-Hodgkin lymphoma. Diagn Mol Pathol. 2003; 12(1):14-20.

13. McNicol AM, Farquharson MA, Lee FD, Foulis AK. Comparison of in situ hybridisation and polymerase chain reaction in the diagnosis of B cell lymphoma. J Clin Pathol. 1998;51(3):229-33.-8

14. JJM van Dongen, AWLangerak, M Bruggemann, PAS Evans, M Hummel, FL Lavender, E Delabesse. F Davi. E Schuuring, R Garcia – Sanz,JHJM van Krieken, Droese, D Gonzalez, C Bastard, HE White, M Spaargan, M spaargaren, M Gonzalez, A Parreira, JL SAmith, GJ Morgan, M Kneba and EA Macintyte. Design and standardization of PCR primers protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia.2003;17:2257-2317.

15. ผศ.พญ. นวพรรณ จารุรักษ์. Fluorescence in Situ Hybridization. ใน : รศ.นพ.นเรศร สุขเจริญ, ผศ.ดร.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ.อณูชีววิทยาทาง

การแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เท็กซ์ แอนซ์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, ปี พ. ศ. 2541. หน้า 53-69.

16. Erber WN, Asbahr HD, Phelps PN. In situ hybridization of immunoglobulin light chain mRNA on bone marrow trephines using biotinylated probes and the APAAP method. Pathology. 1993; 25(1): 63-7.

17. Pan L, Happerfield LC, Bobrow LG, Isaacson PG. In situ detection of human Ig light-chain mRNA on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections using digoxigenin-labelled RNA probes. Histochem J. 1993; 25(1): 57-63.

18. King G, Chambers G, Murray GI. Detection of immunoglobulin light chain mRNA by in situ hybridisation using biotinylated tyramine signal amplification. Mol Pathol. 1999; 52(1):47-50.

19. Zhang Y, Ho FC, Shen D, Xu W, Chan AC, Srivastava G. [Detection of Immunoglobulin light chain restriction of mucosa-associated lymphoid tissue type gastric lymphoma using mRNA in situ hybridization] Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi Chinese. 2001; 30(1):31-4.

20. Lee LH, Cioc A, Nuovo GJ. Determination of light chain restriction in fine-needle aspiration-type preparations of B-cell lymphomas by mRNA in situ hybridization. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2004; 12(3):252-8.

21. M a Hoeve, a D G Krol, K Philippo, P W B Derksen, R a Veenendaal, E Schuuring, Ph M Kluin, J H J M van Krieken. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. J Clin Pathol: Mol Pathol 2000;53:194–200

22. Sukpanichanant S., Cindy L., Vnencak-Jones., Thomas L., McCurley. Determinnation of B-cell clonality in paraffin-embedded endoscopic biopsy specimens of abnormal lymphocytic infiltrates and gastrointestinal lymphoma by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol. 1994;102:299-305.

23. Inagaki H, Nonaka M, Nagaya S, Tateyama H, Sasaki M, Eimoto T. Monoclonality in gastric lymphoma detected in formalin-fixed, paraffin-embedded endoscopic biopsy

specimens using immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. Diagn Mol Pathol 1995; 4:32-8.

24. ปิยลัมพร หะวานนท์. การพิจารณาขนาดตัวอย่าง. ใน : ภิรมย์ กมลรัตนกุล, มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์, และ ทวีสิน ตันประยูร. หลักการทำวิจัยให้สำเร็จ. พิมพ์ครั้งที่ 4. บริษัท เท็กซ์ แอนซ์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, ปี พ. ศ. 2548. : หน้า 125-130.

25. Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded-lineage non-Hodgkin's lymphoma.Am J Clin Pathol. 1994 ;102(6):825-34.

26. Catherine E. Greer, BS., Sandra l . Peterson HT.,Nancy B. Kiviat, MD., And M.Michele Manos, Ph.D..PCR Amplification form paraffin-embedded tissue effect of fixative and fixation time. A.J.C.P.1991; 117-124.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. **10X Tris Boric and Disodium EthyleneDiamine Tetracetic Acid (1X TBE buffer)**

Tris-base	**108.0 g**
Boric acid	**55.0 g**
0.5 M EDTA (pH8.0)	**40.0 ml**

เติมน้ำกลั่นจนได้ 1,000 ml. แล้วผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. **0.5 M EDTA (pH 8.0)**

Disodium ethylenediamine tetraacetate.2H_2O	**93.06 g**
Sterile water	**500.0 ml**

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้ NaOH

เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. **Digestion buffer**

10 mM NaCl	**1.7352 g**
10mM Tris-HCl	**3.0 ml**
25mM EDTA, pH8	**15.0 ml**
0.5%SDS	**15.0 ml**
Sterile water	**267.0 ml**

4. **8% Polyacrylamide gel**

10X TBE	**3.0 ml**
40% acrylamide gel	**3.0 ml**
Sterile water	**9.0 ml**
TEMED	**13.0 µl**
APS	**130.0 µl**

5. **10% APS**

$(NH_4)_2S_2O_8$	**1.0 g**
Sterile water	**10.0 ml**

6. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)

Phenol	**25 volume**
Chloroform	**24 volume**
Isoamyl alcohol	**1 volume**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกรวิกา เส็งเล็ก	เพศ	หญิง
อายุ	23 ปี	เกิด	28 พฤศจิกายน 2526
สถานที่เกิด	จังหวัด นนทบุรี		
ที่อยู่	139 หมู่ 6 ต.ทวีวัฒนา อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี 11150 โทรศัพท์ 02-9276665		

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในปี 2547

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2548

ประวัติการทำงาน

ปีการศึกษา 2547 เป็นนิสิตฝึกงาน ณ แผนกจุลชีววิทยา กองพยาธิคลินิก สถาบันพยาธิวิทยา ศูนย์อำนวยการแพทย์พระมงกุฎเกล้า

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

-

การนำเสนอผลงาน

-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย