การตรวจการทำงานของภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์

(Detection of Cellular Immunity)

รศ.พญ.ดร.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน
ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การตรวจการทำงานของภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ ซึ่งได้แก่ phagocyte, lymphocyte และ NK cell โดยส่วนใหญ่ใช้ช่วยวินิจฉัยโรคที่เกิดจากภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรืออาจใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ การทดสอบสามารถทำได้ทั้งในร่างกาย (in vivo test) ที่นิยมใช้ในทางคลินิก นั่นคือการตรวจ DTH skin test และการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งรวมถึงการตรวจเบื้องต้นด้วยการนับปริมาณจาก complete blood count (CBC) หรือตรวจ immunophenotyping ด้วยแอนติบอดีต่อ surface marker ต่าง ๆ โดยวิธี flow cytometry นอกจากนั้นยังรวมถึงการตรวจการทำงานของเซลล์แต่ละชนิดด้วย ในที่นี้จะเน้นถึงการตรวจการทำงาน (function) ของ phagocyte, T lymphocyte และ NK cells ในหลอดทดลองที่สำคัญบางการทดสอบเท่านั้น

โดยเนื้อหาในบทนี้ใช้ประกอบการเรียนการสอนวิชา Basic และ Clinical Immunology

การตรวจการทำงานของ Phagocyte[1-2]

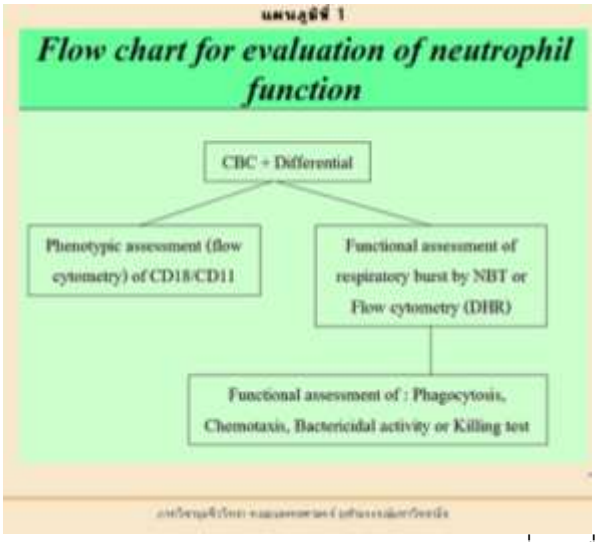
Polymorphonuclear neutrophil (PMN) เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือดที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ ซึ่งจะทำงานโดยเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอม (chemotaxis) เกาะติดกับบริเวณนั้น (adherence) รับรู้และจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis and killing) ความผิดปกติของ PMN อาจทำให้มีจำนวนลดลงเกิด neutropenia โดยมักจะมีอาการของการติดเชื้อง่ายกว่าปกติเมื่อมีจำนวนน้อยกว่า 1,500/µl หรือผิดปกติเฉพาะการทำงานที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งก็ได้

การตรวจการทำงานของ PMN สามารถทำได้ตั้งแต่การตรวจ complete blood count จนถึงการตรวจพิเศษเพื่อตรวจการทำงานขั้นต่าง ๆ ดังแผนภูมิที่ 1 วิธีที่นิยมใช้คือ การตรวจ Respiratory burst activity ของ PMN เนื่องจากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยเฉพาะโรค chronic granulomatous disease (CGD) จะมีการกลายพันธุ์ของยีน nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) oxidase system ทำ

ให้มีความผิดปกติของ respiratory burst วิธีที่ใช้ตรวจมีหลายวิธี ได้แก่ Nitroblue Tetrazolium Dye Reduction Test (NBT), chemiluminescence และ flow cytometry ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธี NBT

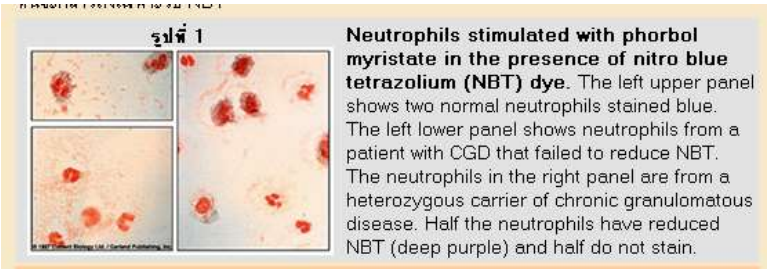
การทดสอบ Nitroblue Tetrazolium Dye Reduction Test (NBT)

หลักการ



เป็นการทดสอบความสามารถของ phagocyte cells โดยใช้หลักการที่ว่า เมื่อ phagocyte มีกระบวนการ phagocytosis จะเกิดปฏิกิริยา respiratory burst คือมีการเพิ่มของ metabolic activity และมีการสร้าง hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide free radical (O_2) ซึ่งเป็น reducing agents ไป reduce NBT dye ซึ่งเป็นสีชนิดหนึ่ง จากสีเหลืองให้เป็น formazan ซึ่งมีสีน้ำเงิน

ในกรณีที่เกิดความผิดปกติภายในเซลล์ เช่น ขาดเอนไซม์บางตัว ได้แก่ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) หรือ nicotinamide adenine dehydrogenase (NADH) ของผู้ป่วย CGD ก็จะไม่เกิดการ reduce สี NBT เนื่องจาก neutrophil ของผู้ป่วย CGD ไม่สามารถสร้าง superoxide ได้ การตรวจนี้เป็น


รูปที่ 1

Neutrophils stimulated with phorbol myristate in the presence of nitro blue tetrazolium (NBT) dye. The left upper panel shows two normal neutrophils stained blue. The left lower panel shows neutrophils from a patient with CGD that failed to reduce NBT. The neutrophils in the right panel are from a heterozygous carrier of chronic granulomatous disease. Half the neutrophils have reduced NBT (deep purple) and half do not stain.

screening test ที่ดีสำหรับ CGD และสามารถใช้ตรวจ carrier ของ X-linked CGD ได้

การอ่านและแปลผล

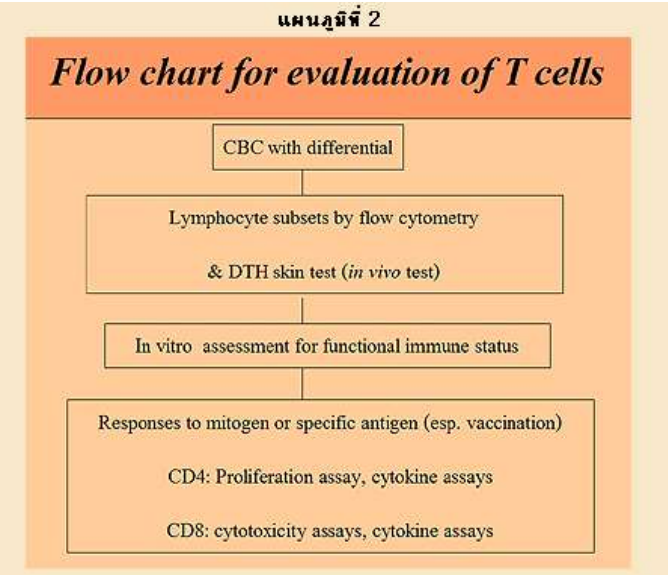
รายงานเป็น Differential count (%) ของผู้ป่วย และ control พร้อมกับนับจำนวน neutrophils ที่มีก้อนสีน้ำเงินเข้มของ formazan blue เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับตัวที่ไม่มีก้อนสีน้ำเงิน นอกจากนี้จะทำการกระตุ้นการทำงานของ neutrophil ด้วยผง latex คู่ไปด้วย ค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้ควรจะมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้กระตุ้นประมาณ 2 เท่า

กิจกรรมในห้องปฏิบัติการ

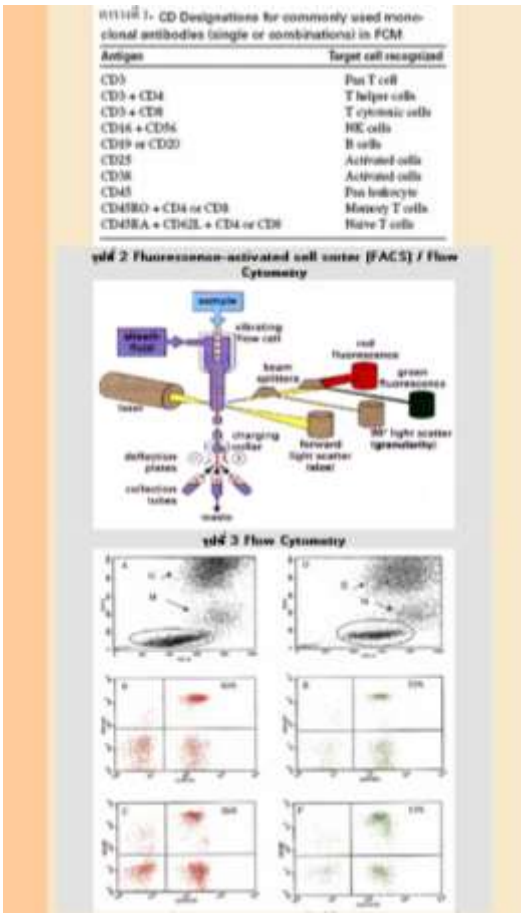
ให้นิสิตฝึกดูสไลด์เลือดจากกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะการติดสีของ NBT ทั้งตัวอย่างที่ผิดปกติ และ normal control โปรดสังเกตตะกอนสีน้ำเงินเข้มของ formazan blue ภายในไซโตพลาสซึมของ neutrophil นอกจากนั้นในบางเซลล์จะเห็น latex bead ที่ถูกจับกินร่วมด้วย

การตรวจการทำงานของ Lymphocyte[2-3]

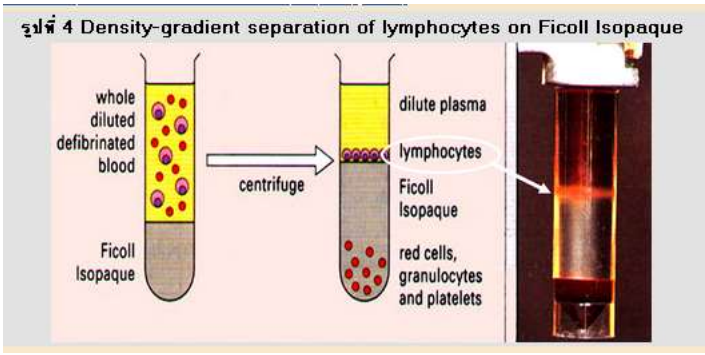
การตรวจการทำงานของ lymphocytes แบ่งเป็นการตรวจปริมาณและหน้าที่เช่นเดียวกันกับ PMN (แผนภูมิที่ 2)



โดยการตรวจปริมาณสามารถตรวจเบื้องต้นด้วย CBC และ differential count หรือตรวจ cell surface marker ของ lymphocyte แต่ละชนิดด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (รูปที่ 2 และ 3)



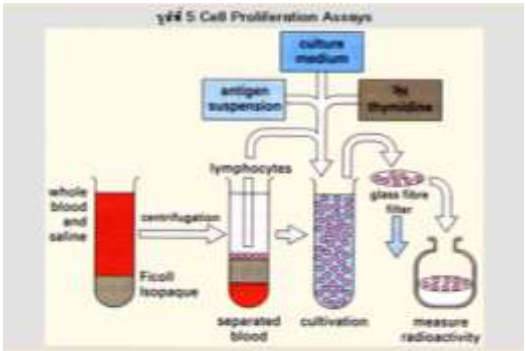
ส่วนการทดสอบหน้าที่ของ lymphocyteสามารถทำได้ทั้งในร่างกาย (in vivo test) ที่นิยมใช้ในทางคลินิก นั่นคือการตรวจ DTH skin test และการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro test) ต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ในการทำการทดสอบในหลอดทดลองจำเป็นที่จะต้องมีขั้นตอนการแยก lymphocyte ออกมาจากเซลล์อื่น ๆ ใน whole blood นิยมทำโดยวิธี Density gradient centrifugation โดยการปั่นเลือดที่ layer บนน้ำยา Ficoll Isopaque ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 (Buoyant density) เม็ดเลือดแดง และ PMN ที่มีความหนาแน่นสูงกว่าจะตกอยู่ก้นหลอด ส่วน mononuclear cells ซึ่งประกอบด้วย T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells และ monocytes จะเห็นเป็นวงสีขาวตรงกลางระหว่างชั้น plasma และน้ำยา Ficoll Isopaque (รูปที่ 4)



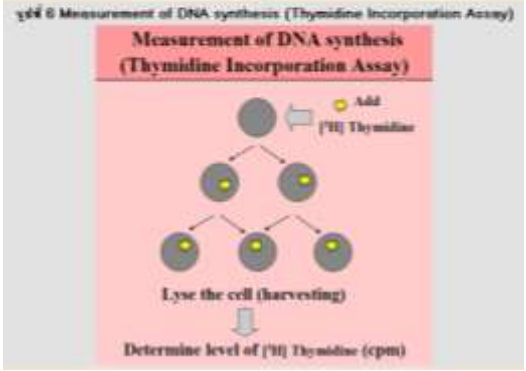
การตรวจความสามารถของ lymphocyte ในการแบ่งตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหรือสารกระตุ้น (lymphocyte proliferation assay, lymphocyte stimulation assay)

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถในการตอบสนองของ lymphocyte (โดยส่วนใหญ่เป็นการตรวจการทำงานของ T helper lymphocytes) ต่อแอนติเจนที่จำเพาะ หรือสารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะ (mitogen) โดย lymphocyte จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงและแบ่งตัวเป็น lymphoblast ซึ่งสามารถตรวจได้โดยดูลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือโดยตรวจหาปริมาณการสร้าง DNA โดยอาศัยหลักที่ว่า lymphoblast ที่แบ่งตัวจะต้องมีการสร้าง DNA เพิ่มขึ้นด้วย การตรวจปริมาณ DNA ทำได้โดยใส่ Tritiated thymidine (3H-thymidine) ซึ่งเป็นสารต้นกำเนิดของ DNA ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ถ้าเซลล์มีการแบ่งตัวก็จะต้องมีการนำ 3H-thymidine เข้าไปใช้ในเซลล์ (3H-thymidine incorporation assay) ทำให้วัดปริมาณรังสี (หน่วยเป็น count per minute, cpm) ภายในเซลล์ได้ ถ้าเซลล์แบ่งตัวมากจะมีการสร้าง DNA มาก ก็จะ uptake 3H-thymidine เข้าไปมาก ค่า cpm ที่วัดได้ก็จะสูงตามไปด้วย (รูปที่ 5 และ 6)



รูปที่ 6 Measurement of DNA synthesis (Thymidine Incorporation Assay)



1. การกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะ mitogen คือสารที่สามารถกระตุ้น lymphocyte ให้แบ่งตัวโดยไม่ต้องมีความจำเพาะต่อแอนติเจนใด ๆ สารที่ใช้บ่อย ๆ ได้แก่ Phytohemagglutinin (PHA) และ Concanavalin A (Con A) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้น T lymphocyte เป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ 2)

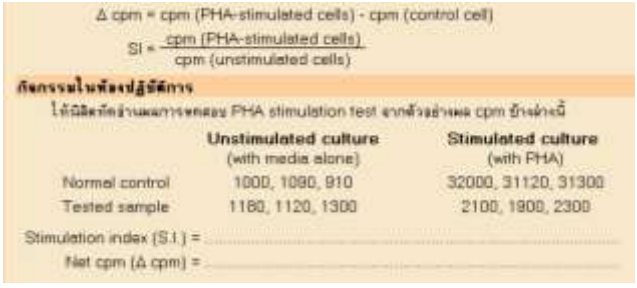
Mitogen	Abbreviation	Source	Responding cells
Phytohemagglutinin	PHA	*Phaseolus vulgaris* (Red kidney beans)	T cells (human)
Concanavalin A	ConA	*Canavalia ensiformis* (Jack bean)	T cells
Pokeweed mitogen	PWM	*Phytolacca americana* (pokeweed)	T and B cells
Lipopolysaccharide	LPS	*Escherichia coli*	B cells (mouse)

2. การกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ การใช้แอนติเจนกระตุ้นแทน mitogen ต้องใช้เวลาทดสอบนานขึ้น เนื่องจากปริมาณ lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดหนึ่ง ๆ มีปริมาณน้อย เพียงแค่ประมาณ 0.01% ของ lymphocyte ทั้งหมด นอกจากนี้ยังต้องใช้แอนติเจนที่คาดว่าผู้ถูกทดสอบเคยได้รับมาแล้วในอดีต แอนติเจนที่ใช้บ่อย ๆ ได้แก่ purified protein derivative (PPD) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, tetanus toxoid, *Candida albicans* antigen เป็นต้น

การอ่านและแปลผล

เมื่อวัดปริมาณรังสี b ได้เป็น count per minute แล้วก็นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและหาค่า 1. D cpm ซึ่งเป็นผลต่างระหว่าง cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA และ control cell และ 2. SI (stimulation index) ซึ่งแสดงถึงจำนวนเท่าที่ cell แบ่งตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA เมื่อเทียบกับ control cell

โดยทำ normal control ควบคู่ไปด้วยเสมอ (มักเป็นเลือดที่ได้จาก blood bank) เพื่อเป็นการยืนยันการทดสอบในแต่ละครั้งว่ามี condition ที่เหมาะสม ทำให้ cells ถูกกระตุ้นได้จริง (ในกรณีที่คนไข้มีความผิดปกติของระบบ CMI จริงจะได้ค่า cpm ต่ำ ถ้าเราไม่ได้ทำ normal control ก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่า การที่ cells ไม่ถูกกระตุ้นนั้นเป็นเพราะคนไข้เป็น CMI defect หรือเป็นเพราะ condition ในการทดสอบไม่ดี)



$$\Delta \text{ cpm} = \text{cpm (PHA-stimulated cells)} - \text{cpm (control cell)}$$

$$\text{SI} = \frac{\text{cpm (PHA-stimulated cells)}}{\text{cpm (unstimulated cells)}}$$

กิจกรรมในห้องปฏิบัติการ

ให้นิสิตคำนวณผลการทดสอบ PHA stimulation test จากตัวอย่างผล cpm ข้างล่างนี้

	Unstimulated culture (with media alone)	Stimulated culture (with PHA)
Normal control	1000, 1090, 910	32000, 31120, 31300
Tested sample	1180, 1120, 1300	2100, 1900, 2300

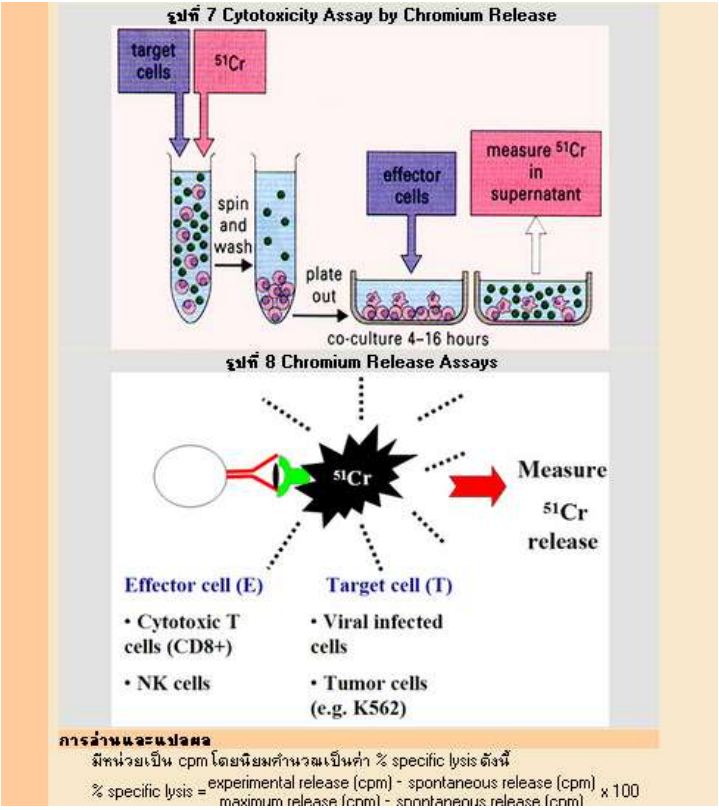
Stimulation index (S.I.) = ...

Net cpm (Δ cpm) = ...

การตรวจการทำลายเซลล์โดย CTL หรือ NK cell (Cytotoxicity assay)

หลักการ

เป็นการทดสอบเพื่อดูความสามารถของ CTL หรือ NK cell (effector cells) ในการทำลายหรือฆ่าเซลล์เป้าหมาย (target cells) วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจคือ 51Cr release assay ทำโดยนำ target cells มาติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี 51Cr แล้วนำมาเลี้ยงรวมกับ effector cells ด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ เช่น effector : target (E:T) = 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 และ 5:1 เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใสซึ่งจะมี 51Cr ที่ถูกปล่อยออกมาจาก target cells ที่แตก มาวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง gamma counter (รูปที่ 7 และ 8)

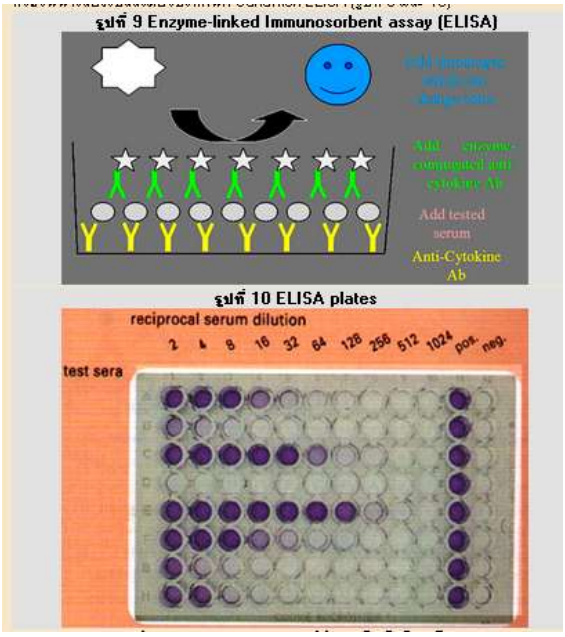


การศึกษาไซโตไคน์ (Cytokine assays)[4-6]

หลักการ

ไซโตไคน์คือ สารที่หลั่งจากเซลล์ต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหรือตอบสนองต่อภาวะการอักเสบ ดังนั้น เราสามารถตรวจหาชนิดหรือวัดปริมาณไซโตไคน์เพื่อตรวจการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิดต่าง ๆ ได้ ปัจจุบันมีหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ตรวจไซโตไคน์ได้ โดยใช้หลักการของ Immunoassay ได้แก่

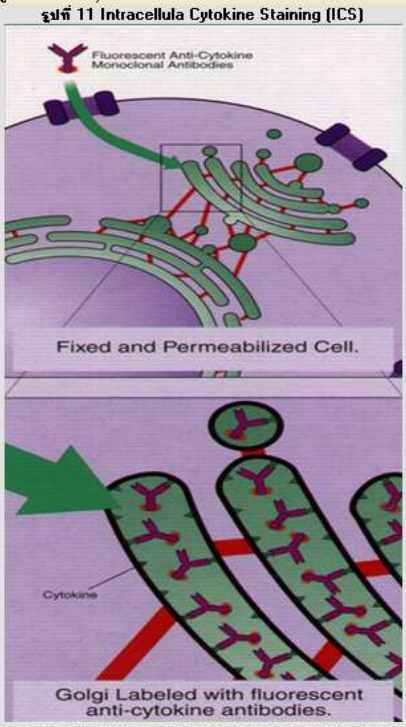
1. การตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ในสิ่งส่งตรวจ เช่น น้ำเหลือง, body fluids หรือในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เทคนิค Sandwich ELISA (รูปที่ 9 และ 10)



2. การตรวจที่สามารถนับจำนวนเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ได้

2.1 เทคนิค Intracellular cytokine staining (ICS) แล้ววัดด้วยเครื่อง flow cytometry (รูปที่ 11 และ 12)

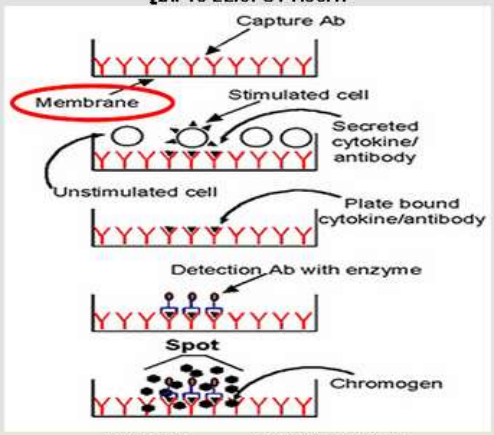
รูปที่ 11 Intracellula Cytokine Staining (ICS)



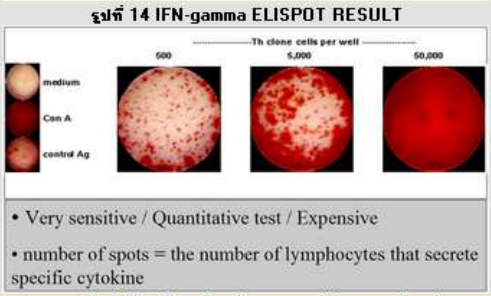
รูปที่ 12 Intracellular Cytokine Staining (ICS) and staining with CD4+ marker

2.2 เทคนิค ELISPOT (รูปที่ 13 และ 14)

รูปที่ 13 ELISPOT ASSAY

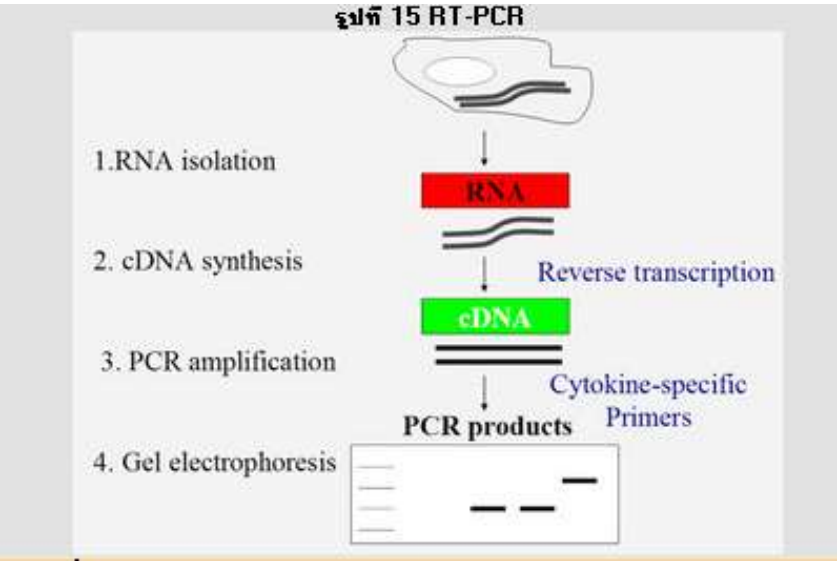


รูปที่ 14 IFN-gamma ELISPOT RESULT



3. การย้อมหาไซโตไคน์ในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่อยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยใช้หลักการของ Immunohistochemistry

4. การตรวจหา mRNA ของไซโตไคน์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลักของ Molecular biology แทน วิธีที่นิยมมากที่สุดคือ การทำ reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (รูปที่ 15)



References

1. Bogomolski-Yahalom V, Matzner Y. Disorders of neutrophil function. Blood Rev 1995;9(3):183-90.

2. Folds JD, Schmitz JL. 24. Clinical and laboratory assessment of immunity. J Allergy Clin Immunol 2003;111(2 Suppl):S702-11.

3. van der Valk P, Herman CJ. Leukocyte functions. Lab Invest 1987;56(2):127-37.

4. Ghanekar SA, Maecker HT. Cytokine flow cytometry: multiparametric approach to immune function analysis. Cytotherapy 2003;5(1):1-6.

5. Whiteside TL. Cytokine measurements and interpretation of cytokine assays in human disease. J Clin Immunol 1994;14(6):327-39.

6. Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N. Cytokine assays in human sera and tissues. Toxicology 1998;129(1):55-61.