



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค
โปรตีโอมิกส์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

โดย นายแพทย์ อุษณรัสมิ์ อนุรัฐพันธ์

กันยายน ๒๕๖๑

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค
โปรตีโอมิกส์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

โดย นายแพทย์ อุษณรัสมิ์ อนุรัฐพันธ์

สังกัดภาควิชากุมารเวชศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: MRG5180134

Project Title: Proteomic analysis of leukemic cells

Investigator: Usanarat Anurathapan, M.D. Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

E-mail Address: usanarat.anu@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children and classified into standard, high and very high-risk groups according to age at the time of diagnosis, presenting white blood cell count (WBC), and genetic abnormalities of leukemic cells. Recently, the treatment outcome of patients with ALL treated with multi-agent chemotherapy was very good, approximately disease-free survival rate of 80%. However, relapsed diseases, especially in very high-risk group of ALL patients, remained a major problem, approximately 20% of ALL patients, resulted in the reduction of 5-year survival rate, approximately 40%. From our knowledge, there is no biomarkers to predict relapsed diseases in such patients. Proteomics is a bio-informatic techniques widely used for identification of potential proteome biomarkers, which might be targeted to relapse ALL. So, we would like to use this technique to identify the potential biomarkers in the differences of proteomics profiles between relapsed versus newly diagnosed leukemic cells especially in very high-risk group of ALL patients, to look for novel biomarkers to predict risk of relapse diseases in those patients.

Objective: 1. To analyze the proteomic expressions of leukemic cells from newly diagnosed and relapsed samples of ALL patients and compared these differentially expressed proteomes with genomic array expressions.

2. To identify the differences of the proteomics profiles of relapsed leukemic cells with newly diagnosed leukemic cells in a very high-risk group of ALL patients and to analyze the correlation of proteomics profiles to clinical information of relapsed very high risk ALL patients.

Methods: Phase I: a pair of newly diagnosed and relapsed bone marrow samples from children with ALL aged less than 15 years was studied. Mononuclear cells from leukemic samples were separated by the Ficoll gradient separation method. These separated mononuclear cells were disrupted by detergent lysis technique, cleaned and quantitated by 2-D Clean-up Kit and 2-D Quant Kit, respectively. Proteomic studies were conducted by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis technique. Proteomic maps were stained and analyzed by the MELANIE software. Protein spots were detected, compared and picked to identify by mass spectrometry. Peptide mass fingerprints were searched in database to find the most compatible proteins. The

RNAs were also extracted from these same leukemic samples. The synthesized cDNAs from these RNAs were labeled and hybridized with probes on microarray chips. These chips were stained, scanned and analyzed for gene expressions.

Phase II: Pediatric ALL patients diagnosed during 2008-2014 at Ramathibodi Hospital were enrolled. Very high-risk ALL patients whose bone marrow samples had collected were included, while those with poor quality of bone marrow samples were excluded. Clinical information, including dates (birth, diagnosis, relapse and last follow up), disease status (initial WBC count, serum lactate dehydrogenase, immuno-phenotype, molecular genetics, cytogenetic and organ involvement) and chemotherapy protocols was collected. Samples of the very high-risk group ALL patients were categorized into two groups (relapsed vs. newly-diagnosed) and then submitted to proteomic analysis, consisted of 2-D gel electrophoresis (2-DE), protein spot matching, in-gel tryptic digestion, MALDI-TOF/TOF protein identification and validation using Western blot analysis.

Results: Phase I: Two ALL patients who had relapse during maintenance phase of treatment of ALL were enrolled. Both were diagnosed with early pre-B ALL and classified as non-standard risk group due to high initial WBC ($>100,000/\text{mL}$). The cytogenetic abnormalities were $t(9;22)$ and $t(12;21)$. A comparison of protein maps from newly diagnosed and relapsed ALL samples of two patients with a sample from normal marrow subject was analyzed. Fourteen protein spots that had significantly differences between normal marrow subject and leukemic samples were identified by mass spectrometry. The only significant compatible protein that presented in leukemic samples was ACTB protein, actin beta protein. This protein interacts with phospholipase D (PLD1) to regulate cell proliferation, vesicle trafficking and secretion. Whereas, the RNA microarray study revealed one statistically significant ($p = 0.00000614$) up-regulated gene that was found in both patients. Olfactomedin 4 (OLFM4) is a gene that locates on locus 13q21.1. The protein encoded works as an antiapoptotic action binding to potent apoptosis inducer, GRIM-19.

Phase II: A total of 195 ALL cases were enrolled. Among these, fourteen samples were classified as the very high-risk group. Only eight BM specimens were qualified for proteomic analysis, which then divided into relapsed and newly-diagnosed groups (2 relapsed and 6 newly-diagnosed). Proteomic analysis showed 22 protein spots had significantly different intensity between relapse and newly-diagnosed group ($p < 0.05$) but there were only 3 protein spots (i.e., ATPB; ATP synthase subunit beta, TUBB1; Tubulin beta-1 chain and PHB; prohibitin) had pattern of protein expression same as previous reports, related to leukemia. Of these, the decreased expression of ATPB was validated by western immunoblotting.

Conclusion and discussion: Proteomic expression of leukemic cells had some protein differences from normal marrow cells, for instance ACTB protein. OLFM4 that involves in inhibition of apoptotic pathway had shown up-regulated expression in relapsed leukemic cells. The further study in another cohort of very-high-risk ALL patients supported ATPB as the candidate biomarkers of relapsed disease.

Future plans: Further validation study using an independent cohort is required to demonstrate clinical applicability of OLFM4 or ATPB in the very high-risk group of pediatric ALL.

Keywords: Proteomic analysis; very high-risk acute lymphoblastic leukemia; ATP synthetase subunit beta (ATPB); Olfactomedin 4 (OLFM4)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180134

ชื่อโครงการ: การศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ชื่อนักวิจัย: นายแพทย์ อุษณรัสมิ์ อนุรัฐพันธ์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: usanarat.anu@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

หลักการและเหตุผล: มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเด็ก การรักษาแบ่งกลุ่มเป็นชนิดตามความเสี่ยงภาวะโรคกลับ คือ ความเสี่ยงปกติ ความเสี่ยงสูง และความเสี่ยงสูงสุดโดยแบ่งตามอายุขณะได้รับการวินิจฉัย จำนวนเม็ดเลือดขาวขณะได้รับการวินิจฉัย และความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์มะเร็ง ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ด้วยยาเคมีบำบัดหลายชนิดได้ผลดีมาก โดยมีอัตราการรอดโรคร้อยละ 80 อย่างไรก็ตามภาวะโรคกลับที่พบได้มากในผู้ป่วยกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดยังคงเป็นปัญหาหลักของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ถึงร้อยละ 20 มีภาวะโรคกลับ และอัตราการรอดโรคลดลงเหลือเพียงร้อยละ 40 เท่านั้น จากข้อมูลที่มีในปัจจุบันยังไม่มีดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่สามารถคาดการณ์ภาวะโรคกลับได้ดี เทคนิคโปรตีโอมิกส์เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในการค้นหาโปรตีนที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งอาจพบในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์ที่มีโรคกลับ ทีมวิจัยต้องการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อหาดัชนีชี้วัดในการทำนายความเสี่ยงการเกิดภาวะโรคกลับจากความแตกต่างการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่การวินิจฉัยใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ภาวะโรคกลับโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงโรคกลับสูงสุด

วัตถุประสงค์: 1. เพื่อศึกษาวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดพรีบีเซลล์

2. เพื่อค้นหาความแตกต่างการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะโรคกลับด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุด และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโปรตีนที่ค้นพบกับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีภาวะโรคกลับ

วิธีทดลอง: ระยะที่ 1 ดำเนินการเก็บเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ในช่วงการวินิจฉัยใหม่และช่วงการวินิจฉัยโรคกลับในผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 15 ปี รายเดียวกันไว้ จากนั้นทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวออกจากตัวอย่างด้วยวิธีโฟคอล เซลล์ที่แยกได้มาทำการสลาย ทำความสะอาด และวัดปริมาณด้วยชุดทำความสะอาดและชุดวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นดำเนินการทดสอบด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์โดยทำการแยกชนิดโปรตีนแบบสองระนาบจากขนาดประจุและขนาดโปรตีน จากนั้นนำแผนที่โปรตีนที่ได้มาย้อมสีและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเมลาณี จุดโปรตีนที่ได้จากแผนที่โปรตีนมาทำการเปรียบเทียบ แล้วตัดมาวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมตรี จากนั้นเปปไทด์ที่ตรวจวัดได้จะนำไปค้นหาข้อมูลในฐานข้อมูลเพื่อหาชนิดโปรตีน ขณะเดียวกันอาร์เอ็นเอถูก

สกัดออกมาจากตัวอย่างเดียวกันแล้วทำการแปลงกลับเป็นดีเอ็นเอเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ ด้วยวิธีไมโครอาร์เรย์

ระยะที่ 2 ดำเนินการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงโรคกลับสูงสุดที่ได้รับการวินิจฉัยในช่วงปี พ.ศ. 2551 ถึง 2557 ณ โรงพยาบาลรามาธิบดี ที่มีตัวอย่างไขกระดูกที่มีคุณภาพเก็บไว้ โดยข้อมูลที่รวบรวมได้แก่ วันเดือนปีเกิด วันที่ได้รับการวินิจฉัย วันที่ติดตามครั้งสุดท้าย ลักษณะทางคลินิกของโรค เช่น จำนวนเม็ดเลือดขาวแรกเริ่ม ระดับแลกเตทไฮโดรจิเนส ชนิดและระยะเม็ดเลือดขาว ความผิดปกติระดับพันธุกรรมและอวัยวะที่เกี่ยวข้อง รวมถึงวิธีการรักษาที่ผู้ป่วยได้รับ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มโรคกลับและกลุ่มการวินิจฉัยครั้งแรก จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ ซึ่งประกอบด้วย การแยกชนิดโปรตีนสองระนาบด้วยประจุและขนาด การวิเคราะห์ความเหมือนต่างของจุดโปรตีน การตัดจุดโปรตีน การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยแมสสเปกโตรเมตรี และการตรวจยืนยันด้วยเวสเทิร์นบลอต

ผลการทดลอง: ระยะที่ 1 ผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์จำนวนสองรายที่มีโรคกลับช่วงการรักษาในระยะสุดท้ายถูกเชิญเข้าร่วมการศึกษา โดยผู้ป่วยทั้งสองเป็นมะเร็งฯ ชนิด early pre-B cell และไม่ได้อยู่ในกลุ่มความเสี่ยงโรคกลับมาตรฐานเนื่องจากจำนวนเม็ดเลือดขาวแรกเริ่มมากกว่า 100,000 เซลล์/มคล และตรวจพบ t(9;22) ในผู้ป่วยรายแรก และพบ t(12;21) ในผู้ป่วยรายที่สอง การเปรียบเทียบแผนที่โปรตีนจากเซลล์มะเร็งจากการวินิจฉัยครั้งแรกเทียบกับเซลล์มะเร็งจากการวินิจฉัยโรคกลับ และเซลล์จากไขกระดูกของคนปกติพบว่าจุดโปรตีนจำนวน 14 จุดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ถูกวิเคราะห์และพบว่าไม่มีเพียงโปรตีนเดียวที่พบในตัวอย่างจากเซลล์มะเร็งคือ actin beta protein (ACTB) โดยโปรตีนนี้ทำงานคู่กับโปรตีน phospholipase D เพื่อควบคุมการเพิ่มจำนวนเซลล์ การขนส่งภายในเซลล์ จากผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเดียวกันพบว่ามียีน olfactomedin4 ที่เพิ่มการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยทั้งสองราย โดยยีนนี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 ตำแหน่ง 21.1 บนแขนยาว ทำหน้าที่ในการยับยั้งการตายของเซลล์โดยจับกับ GRIM-19 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการตายของเซลล์

ระยะที่ 2 ผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์จำนวน 195 รายได้รับการวินิจฉัยในช่วงปี พ.ศ. 2551 ถึง 2558 ผู้ป่วยจำนวน 14 รายถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคกลับ แต่มีเพียง 8 ตัวอย่าง (2 รายเก็บตัวอย่างช่วงโรคกลับ และ 6 รายเก็บตัวอย่างช่วงการวินิจฉัยใหม่) ที่อยู่ในคุณภาพดีสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ได้ พบว่าจุดโปรตีนจำนวน 22 จุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างกลุ่มโรคกลับ และตัวอย่างกลุ่มวินิจฉัยใหม่ แต่มีโปรตีนเพียง 3 ชนิดที่มีลักษณะการแสดงออกคล้ายการศึกษาก่อนหน้านี้ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว คือ ATP synthase subunit beta (ATPB), tubulin beta-1 chain (TUBB1) และ prohibitin (PHB) ทางทีมวิจัยได้เลือก ATPB มาตรวจยืนยันการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง: โปรตีนที่แสดงออกของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีบางโปรตีนที่แตกต่างจากเซลล์ไขกระดูกปกติ เช่น โปรตีน ACTB นอกจากนั้นยีน OLFM4 ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งขบวนการตายของเซลล์ ซึ่งพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในภาวะโรคกลับ และจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุดสนับสนุนว่าโปรตีน ATPB เป็นตัวเลือกที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับภาวะโรคกลับ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต: การศึกษายืนยันผลการศึกษานี้เพื่อแสดงการประยุกต์ใช้ทางคลินิกของ OLFM4 หรือ ATPB ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุด

คำหลัก: เทคนิคโปรตีโอมิกส์; โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุด; ATP synthetase subunit beta (ATPB); Olfactomedin 4 (OLFM4)

Executive summary

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

(ภาษาอังกฤษ) Proteomic analysis of leukemic cells

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบได้บ่อยมากขึ้นเรื่อยๆ และเป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายที่เพิ่มขึ้นในทุกเพศและทุกวัย ซึ่งอัตราการเกิดโรคมะเร็งในผู้ป่วยเด็กมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นเดียวกัน โดยโรคมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเด็กไทยคือ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์⁽¹⁾ โดยเฉพาะในกลุ่มช่วงอายุ 2 ปี ถึง 5 ปี ที่พบว่าเมื่ออัตราการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันสูงที่สุด ซึ่งจากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคดังกล่าวขึ้นมาในผู้ป่วยเด็ก แต่พบว่ามีหลายภาวะและหลายปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เช่น การได้รับหรือสัมผัสกับสารเคมีหรือยาบางชนิด การได้รับการฉายรังสี และความผิดปกติของสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมของผู้ป่วย เป็นต้น⁽²⁾

จากความเข้าใจในเรื่องเซลล์ต้นกำเนิดในปัจจุบัน ทำให้มีการสันนิษฐานว่าการเกิดโรคมะเร็งน่าจะมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในระบบการสร้างเม็ดเลือดที่มีความผิดปกติไปทำให้เซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวไม่สามารถพัฒนากลายเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดปกติได้ แต่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นยังคงคุณสมบัติที่สำคัญอีกสองอย่างอยู่คือ สามารถแบ่งตัวได้เรื่อยๆ และสามารถแบ่งตัวให้เซลล์เดิมอีกครั้ง ซึ่งจากการอธิบายดังกล่าวจึงทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่มีการเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดปกติและยังคงมีการแบ่งตัวที่ไม่สามารถควบคุมได้จนกระทั่งได้เซลล์ที่ผิดปกติจำนวนมากหรือที่เรียกว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกของผู้ป่วย⁽³⁾ โดยมีสมมุติฐานของกระบวนการที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดจนกลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวอยู่ 2 ขั้นตอนคือ การเกิดความผิดปกติในสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดบางตัว และการสัมผัสหรือการได้รับปัจจัยกระตุ้นบางอย่างที่ทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการเจริญเติบโตหรือกระบวนการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวนั้นจึงทำให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในที่สุด⁽³⁾ ตัวอย่างเช่นการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ สายบีเซลล์ พบว่าเมื่อเซลล์ต้นกำเนิดมีความบกพร่องในกระบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตในขั้นตอนการเปลี่ยนจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์ชนิดพรีบีเซลล์ ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ตัวอ่อน ร่วมกับได้รับหรือสัมผัสสารเคมีหรือสิ่งกระตุ้นต่างจากจากสภาวะแวดล้อม ทำให้เซลล์ดังกล่าวไม่สามารถกลายเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่แก่มากขึ้นได้ แต่ยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดจึงทำให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ขึ้นมา

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นชนิดต่างๆ นอกจากแบ่งโดยการดูจากลักษณะของเซลล์แล้วยังสามารถแบ่งได้โดยอาศัยเครื่องหมายทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunologic marker) ที่อยู่บนผิวเซลล์ที่เรียกว่า Cluster of differentiation หรือ CD อีกด้วย ตัวอย่างเช่นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดบีเซลล์จะต้องมีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ คือ CD19 และเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจะต้องมีเครื่องหมายบนผิวเซลล์ คือ CD34 เป็นต้น⁽⁴⁾ จึงทำให้สามารถแยกชนิดของเซลล์ต่างๆ ในไขกระดูกได้อย่างชัดเจนว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดใดมากน้อยแค่ไหน เป็นชนิดที่ปกติหรือผิดปกติ หรือเป็นเซลล์มะเร็งหรือไม่ ดังนั้นในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ด

เลือดขาวนอกจากจะสามารถวินิจฉัยได้โดยการดูจากจำนวนและลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติในไขกระดูกแล้วยังสามารถให้การวินิจฉัยโดยดูจากจำนวนและชนิดของเซลล์จากเครื่องหมายบนผิวเซลล์อีกด้วย⁽⁴⁾ และจากความรู้ในเรื่องดังกล่าวจึงทำให้สามารถอธิบายได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์ ควรจะมีเครื่องหมายบนผิวเซลล์คือ CD 34, HLA-DR, TdT และไม่มี CD 19

ในปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีที่สุด จึงมีการแบ่งผู้ป่วยเป็นกลุ่มต่างๆ 3 กลุ่มตามความเสี่ยงในการกลับเป็นโรคซ้ำ คือ กลุ่มความเสี่ยงต่ำ กลุ่มความเสี่ยงธรรมดา และกลุ่มความเสี่ยงสูง โดยการใช้เกณฑ์หลายๆด้านในการประเมิน ตัวอย่างเช่น อายุผู้ป่วยเมื่อได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก จำนวนเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดผู้ป่วยขณะที่มาพบแพทย์ครั้งแรก และความผิดปกติทางสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกแนวทางในการรักษาผู้ป่วยว่าจะใช้ยาเคมีบำบัดชนิดใด ขนาดเท่าไร และวิธีการบริหารยาด้วยวิธีใด แต่อย่างไรก็ตามยังมีผู้ป่วยในกลุ่มความเสี่ยงต่ำที่จะกลับเป็นโรคซ้ำอยู่จำนวนหนึ่งที่มีการกลับเป็นโรคซ้ำขึ้นมาโดยในขณะนี้ยังไม่มีวิธีหรือแนวทางในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมเพื่อคาดเดาโอกาสในการกลับเป็นโรคซ้ำในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดต่างๆ

Hegedus และคณะ ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนระหว่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันไมอีลอยด์ และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันไมอีโลโมนอไซท์ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณโปรตีนภายในเซลล์แต่ละชนิดซึ่งชนิดที่มีความสำคัญคือ โปรตีนที่มีชื่อว่า C-terminal truncated version of ubiquitin โดยโปรตีนชนิดนี้อาจจะมีบทบาทในกระบวนการเกิดหรือสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสต์ได้⁽⁵⁾ และจากการศึกษาของ Ota และคณะ ที่ทำการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันไมอีลอยด์ เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ในโรค Myeloproliferative disorder และเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์ในโรค Myelodysplastic syndrome พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างโปรตีนของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดโดยชนิดที่มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของโคโมโซมอย่างสลับซับซ้อนคือ โปรตีนที่มีชื่อว่า Nuclear protein that associates with the mitotic apparatus⁽⁶⁾

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาไม่พบว่ามีการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งมีความสำคัญในการบอกถึงความแตกต่างระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิดเพื่อจะได้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปในเรื่องการค้นหาลำดับพันธุกรรมในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งในการวินิจฉัยผู้ป่วยรายใหม่และการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคกลับด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการรักษาหรือใช้เป็นเป้าหมายในการค้นหาวិธีการรักษาต่อไปได้ จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในเรื่องดังกล่าวและเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดพรีบีเซลล์

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดอื่นที่ไม่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดพรีบีเซลล์

2. เพื่อค้นหาความแตกต่างการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะโรคกลับด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุด และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโปรตีนที่ค้นพบกับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีภาวะโรคกลับ

3. ระเบียบวิธีวิจัย

ขั้นตอนและวิธีในการเก็บข้อมูล

ระยะที่ 1

1. เก็บข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นจากผู้ป่วยและผู้ปกครองที่ถูกคัดเลือกเข้าร่วมโครงการศึกษา
2. เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูก โดยครั้งแรกเก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูกที่ทำเพื่อให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก และครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูกที่ทำเพื่อการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ เพื่อนำตัวอย่างเลือดจากไขกระดูกทั้งสองครั้งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี โฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry) โดยครั้งแรกทำเพื่อทำการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดใด และครั้งที่สองทำเพื่อยืนยันว่ามีโรคกลับจริง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดจากไขกระดูกทั้งสองครั้งที่ได้ไปทำการคัดแยกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากเลือดจากไขกระดูก
3. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์
 - 1) นำเซลล์มะเร็งที่ได้มาทำการแยกโปรตีนออกจากเซลล์โดยทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication และทำการป้องกันการแตกสลายของโปรตีนโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของน้ำย่อยโปรตีนภายในเซลล์
 - 2) นำโปรตีนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยวิธี two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis โดย First dimensional gel electrophoresis ทำการแยกชนิดโปรตีนโดยใช้ isoelectric point ของโปรตีนแต่ละชนิด แล้วนำ gel จากชั้นที่หนึ่งมาทำ Second dimensional gel electrophoresis โดยใช้ Molecular weight ในการแยกชนิดโปรตีนอีกครั้ง
 - 3) นำแผ่น gel ดังกล่าวมาทำการย้อมโปรตีนด้วยสี Fluorescence และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (Image Master Platinum 6.0)
 - 4) นำโปรตีนที่พบว่ามีความแตกต่างของชนิดและ/หรือปริมาณระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิดไปทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Mass spectrometry
4. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีจีโนมิกส์
 - 1) นำเซลล์มะเร็งที่ได้มาทำการคัดแยกสารพันธุกรรมชนิด RNA ออกจากเซลล์ดังกล่าว
 - 2) นำ RNA ที่ได้มาทำการเปลี่ยนเป็น cDNA ชนิด double strand

- 3) นำ Double-strand cDNA มาเปลี่ยนเป็น cRNA และติดไปโอบิน จากนั้นทำให้เป็นชิ้นส่วนย่อยๆ
- 4) นำ biotinylated cRNA ที่ได้มาทำการ Hybridization ลงบน GeneChip
- 5) นำ GeneChip ที่ได้มาทำการล้างและย้อมสี จากนั้นนำไปอ่านด้วยเครื่องอ่านผล

ระยะที่ 2

1. ทบทวนประวัติผู้ป่วยในกลุ่มประชากรศึกษาที่ได้ผ่านเกณฑ์การคัดกรองต่างๆ ที่กำหนดไว้ในข้างต้น เพื่อทำการเก็บข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ วันเกิด วันที่ได้รับการวินิจฉัย จำนวนเม็ดเลือดขาวเมื่อแรกวินิจฉัย ลักษณะทาง immunophenotype, molecular genetics และ cytogenetic เมื่อแรกวินิจฉัย อวัยวะที่โรคกระจายถึงวันที่เกิดภาวะโรคกลับ ลักษณะทาง immunophenotype, molecular genetics และ cytogenetic เมื่อเกิดภาวะโรคกลับ วันที่มาตรวจติดตามวันสุดท้าย และสูตรยาเคมีบำบัด

2. จากนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งในไขกระดูกถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีภาวะโรคกลับ (relapsed group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะโรคกลับ (non-relapsed group) โดยทั้งสองกลุ่มถูกนำไปทำการศึกษาต่อด้วยกระบวนการทาง proteomics ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่

- 1) Two dimensional gel electrophoresis (2-DE)
- 2) Protein spot matching and analysis 2-D gels
- 3) In-gel tryptic digestion
- 4) Protein spot identification by matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight/time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer analysis
- 5) Validation of the proteomic data using western blot analysis

3. เมื่อได้ข้อมูลทางคลินิก (clinical data) และข้อมูลโปรตีน (proteomics data) ที่ต้องการแล้ว นำมาทำการวิเคราะห์และหาข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติม เพื่อหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีนว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดขึ้นของภาวะโรคกลับในโรค ALL หรือไม่อย่างไร

ขั้นตอนและวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่เป็น Descriptive data รายงานเป็น Frequency, median และ range ตามลักษณะการกระจายของข้อมูล

ข้อมูลการวิเคราะห์แผนที่โปรตีนใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปเพื่อจำแนกความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีน ค่าความแตกต่างของโปรตีนแต่ละชนิดวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติที่ใช้คือ Fisher exact test โดยถือว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า p value น้อยกว่า 0.05 โดยใช้การคำนวณภายในโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปดังกล่าว

ข้อมูลชนิดของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometry นำไปเปรียบเทียบกับชนิดของโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูลนานาชาติ เช่น National Center for Biotechnology Information (NCBI) database เพื่อทำการบ่งชี้ชนิดของโปรตีนดังกล่าว

ขอบเขตของการวิจัย

ผู้ป่วยที่มีอายุระหว่างแรกเกิดถึง 15 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์เฉียบพลันที่โรงพยาบาลรามาธิบดี ระหว่างปี พ.ศ. 2551 ถึง 2557

Inclusion criteria:

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็น very high-risk ALL ที่มีการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกไว้

Exclusion criteria:

ตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่เก็บไว้มีปริมาณไม่เพียงพอ หรือไม่มีคุณภาพ

4. ผลงานหัวข้อเรื่องที่สำคัญที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี/

ชื่อเรื่องที่สำคัญที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Proteomic analysis of leukemic stem cells in childhood acute lymphoblastic leukemia

ชื่อวารสารที่สำคัญที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Clinical Proteomics

5. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
- อุปกรณ์เพื่อการคัดแยกเซลล์	60,000	60,000	115,000
CD 34 multisort Kit			
CD 19 microbeads			
Column and filter for cell sorting			
- อุปกรณ์เพื่อการทำโปรตีโอมิกส์	55,000	55,000	115,000
Protein extraction kit			
First dimensional gel			
Second dimensional gel			
Protein identification			
3. หมวดค่าใช้สอย			
- การเตรียมเอกสารรายงานผลการวิจัย	5,000	5,000	10,000
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

บทนำ

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบได้บ่อยมากขึ้นเรื่อยๆ และเป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายที่เพิ่มขึ้นในทุกเพศและทุกวัย ซึ่งอัตราการเกิดโรคมะเร็งในผู้ป่วยเด็กมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่นเดียวกัน โดยโรคมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในเด็กไทยคือ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสติก (acute lymphoblastic leukemia; ALL) ⁽¹⁾ โดยเฉพาะในกลุ่มช่วงอายุ 2 ปี ถึง 5 ปี ที่พบว่ามีอัตราการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสติกสูงที่สุด โดยมีอุบัติการณ์เกิดโรคอยู่ที่ 28.8 รายต่อประชากรเด็กไทยล้านคนต่อปี อัตรารอดชีพที่ 5 ปี (5-year survival rate) อยู่ที่ร้อยละ 64.5 ⁽²⁾ ปัจจุบันการรักษาโรค ALL ในประเทศไทย ใช้แนวทางการรักษามาตรฐานจัดทำโดยชมรมโรคมะเร็งเด็กแห่งประเทศไทย (Thai Pediatrics Oncology Group; ThaiPOG) ซึ่งแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่มก่อนการรักษาตามระดับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับ (risk classification) ได้แก่ กลุ่มความเสี่ยงปกติ (standard risk) กลุ่มความเสี่ยงสูง (high risk) และกลุ่มความเสี่ยงสูงสุด (very high-risk) ซึ่งแต่ละกลุ่มถูกกำหนดโดยปัจจัยทางคลินิก เช่น อายุเมื่อแรกวินิจฉัย จำนวนเม็ดเลือดขาวเมื่อแรกวินิจฉัย และความผิดปกติระดับโครโมโซมและโมเลกุล (cytogenetic and molecular genetic abnormality) การรักษาโรค ALL ตามแนวทางของ ThaiPOG ได้ผลการรักษาอยู่ในเกณฑ์ดี แต่ภาวะโรคกลับ (Relapsed disease) ยังเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงสุดพบภาวะโรคกลับสูงถึงร้อยละ 20 ⁽³⁾ นอกจากนี้การรักษาระยะโรคกลับ (relapsed) ยังมีความซับซ้อนมากขึ้นโดยมีอัตรารอดชีพที่ 5 ปีลดลงเหลือเพียงร้อยละ 40 ⁽⁴⁾

จากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่แสดงว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคดังกล่าวขึ้นมาในผู้ป่วยเด็ก แต่พบว่ามีหลายภาวะหรือปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวกับการเกิดโรค เช่น การได้รับหรือสัมผัสกับสารเคมีหรือยาบางชนิด การได้รับการฉายรังสี และความผิดปกติของสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมของผู้ป่วย เป็นต้น การศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจเรื่องพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของโรค ALL โดยเฉพาะภาวะโรคกลับจึงเป็นสิ่งสำคัญ จากข้อมูลที่มีในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจนเนื่องจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมีความหลากหลายของอาการแสดงทางคลินิก ลักษณะเซลล์มะเร็ง และความผิดปกติของพันธุกรรม ทั้งนี้จากความเข้าใจในเรื่องเซลล์ต้นกำเนิดในปัจจุบัน ทำให้มีการสันนิษฐานว่าการเกิดโรคมะเร็งน่าจะมาจากเซลล์ต้นกำเนิดในระบบการสร้างเม็ดเลือดที่มีความผิดปกติไปทำให้เซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวไม่สามารถพัฒนากลายเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดปกติได้ แต่เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นยังคงคุณสมบัติที่สำคัญอีกสอง อย่างอยู่คือ สามารถแบ่งตัวได้เรื่อยๆ และสามารถแบ่งตัวให้ได้เซลล์เดิมอีกครั้ง ซึ่งจากการอธิบายดังกล่าวจึงทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่มีการเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดปกติและยังคงมีการแบ่งตัวที่ไม่สามารถควบคุมได้จนกระทั่งได้เซลล์ที่ผิดปกติจำนวนมากหรือที่เรียกว่า เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกของผู้ป่วย ⁽³⁾ โดยมีสมมุติฐานกลไกการเกิดโรคโดยทฤษฎีต่างๆ เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดจากของกระบวนการที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดจนกลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวอยู่ 2 ขั้นตอนคือ การเกิดความผิดปกติในสารพันธุกรรมหรือโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดบางตัว และการสัมผัสหรือการได้รับปัจจัยกระตุ้นบางอย่างที่ทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการเจริญเติบโตหรือกระบวนการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวนั้นจึงทำให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในที่สุด ⁽³⁾ ตัวอย่างเช่นการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสติก สายบีเซลล์ พบว่าเมื่อเซลล์ต้นกำเนิดมีความบกพร่องในกระบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตในขั้นตอนการเปลี่ยนจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสติกชนิดพ

รีปีเซลล์ ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ตัวอ่อน ร่วมกับได้รับหรือสัมผัสสารเคมีหรือสิ่งกระตุ้นต่างจากจากสภาวะแวดล้อม ทำให้เซลล์ดังกล่าวไม่สามารถกลายเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่แก่มากขึ้นได้ แต่ยังมี การแบ่งตัวอยู่ตลอดจึงทำให้เกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ขึ้นมา ส่วนพยาธิกำเนิดของการเกิดภาวะโรคกลับนั้น สรุปได้ว่าเป็นผลมาจากหลายเหตุปัจจัย เช่น การที่เซลล์มะเร็งบางกลุ่มดื้อยาเคมีบำบัด (drug-resistant clonal cell) ทำให้เซลล์มะเร็งเหลือรอดหลังจากได้ยาเคมีบำบัด การกลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็ง ชนิดอื่นหลังได้รับยาเคมีบำบัด (de novo mutation) และเซลล์มะเร็งอยู่ในตำแหน่งที่ยาเคมีบำบัดเข้าถึงได้ยาก (sanctuary site) เช่น อัมตะ ระบบประสาท เป็นต้น⁽⁶⁾ ซึ่งช่วงเวลาของการกลายพันธุ์กลายเป็นกลุ่มเซลล์มะเร็ง ที่เป็นโรคกลับ (relapse clones) นั้น Kunz และคณะได้ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย relapsed T-cell ALL พบว่า การเกิด relapse clones นั้น เกิดขึ้นได้ 2 แบบคือ การกลายพันธุ์เป็น relapse clone ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีอยู่เดิม (Type 1 relapse) และ การกลายพันธุ์เป็น relapse clone ตั้งแต่ระยะเซลล์ต้นกำเนิด (Type 2 relapsed)⁽⁷⁾

เนื่องจากภาวะโรคกลับทำให้การรักษาโรค ALL มีความลำบากมากขึ้น ดังนั้นแนวทางการรักษาโรคหลังเกิดโรคกลับ มีเป้าหมายคือการควบคุมให้อยู่ในภาวะโรคสงบ (remission) จึงมีความจำเป็นต้องประเมินโรคใหม่ทั้งหมด เพื่อจัดกลุ่มตามความเสี่ยงต่อการล้มเหลวในการรักษา (treatment failure) และความจำเป็นในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (hematopoietic stem cell transplantation) โดยปัจจัยที่ต้องพิจารณา ได้แก่ ตำแหน่งของการเกิดโรคกลับ ระยะเวลาระหว่างการวินิจฉัยครั้งแรกถึงการเกิดภาวะโรคกลับ และชนิดของเซลล์มะเร็ง ส่วนการให้ยาเคมีบำบัดต้องใช้ยาที่มีความรุนแรงมากขึ้น ใช้ยาขนาดมากขึ้น และความถี่มากขึ้นเพื่อควบคุมให้อยู่ในภาวะโรคสงบให้ได้ ในปัจจุบัน ยังไม่มีการตรวจใดที่สามารถทำนายการเกิดภาวะโรคกลับได้ ได้มีความพยายามศึกษาหาตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ที่สามารถทำนายพฤติกรรมต่างๆของเซลล์ (cellular behavior) โดยศึกษาตั้งแต่ระดับยีน (genomics) โปรตีน (proteomics) ไปจนถึงเมตาบอลิซึม (metabolomics) พบว่าการศึกษาระดับ proteomics มีความสำคัญและเป็นไปได้มากที่สุดในการอธิบายพฤติกรรมระดับเซลล์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว⁽⁸⁾ จากการศึกษา โดย Dr. Maria และคณะพบโปรตีนตัวชี้วัดทางชีวภาพ (protein biomarker) ของโรค ALL ที่แตกต่างระหว่างกลุ่มความเสี่ยงปกติและความเสี่ยงสูง ได้แก่ CLUS, CERU, APOE, APOA4, APOA1, GELS, S10A9, AMBP, ACTB, CATA และ AFAM⁽⁹⁾ แต่โปรตีนดังกล่าวเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรเดียวเท่านั้น และไม่ได้บ่งบอกถึงการเกิดภาวะโรคกลับเนื่องจากไม่ได้มีการศึกษาในกลุ่มโรคกลับ

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาไม่พบว่ามีการศึกษาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ระหว่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยวินิจฉัยรายใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคกลับ เพื่อใช้ในการบอกถึงความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดจะได้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปในเรื่องการค้นหาคำชี้วัดทางชีวภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งในการวินิจฉัยผู้ป่วยรายใหม่และการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคกลับด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการทำนายภาวะโรคกลับตั้งแต่การวินิจฉัยครั้งแรก การวางแผนการรักษา หรือใช้เป็นเป้าหมายในการค้นหาวិธีการรักษาต่อไปได้ จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในเรื่องดังกล่าวและเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงในการเกิดโรคกลับสูงสุด เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มที่มีความเสี่ยงการเกิดโรคกลับและมักมีความผิดปกติในระดับโครโมโซมหรือโมเลกุล อาจพบข้อมูลที่สำคัญเพื่อใช้ในทางคลินิกต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะโรคกลับด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันлимโฟบลาสต์ และทำการเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนจากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยรายเดียวกัน
2. เพื่อค้นหาความแตกต่างการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะโรคกลับด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันлимโฟบลาสต์ชนิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลับสูงสุด และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลโปรตีนที่ค้นพบกับลักษณะข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีภาวะโรคกลับ

วิธีการศึกษา

รูปแบบการวิจัย

Cross-sectional study

ลักษณะประชากร/ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ผู้ป่วยที่มีอายุระหว่างแรกเกิดถึง 15 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสต์เฉียบพลันที่โรงพยาบาลรามธิบดี ระหว่างปี พ.ศ. 2551 ถึง 2557

เกณฑ์การคัดเข้า

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็น very high-risk ALL ที่มีการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกไว้

เกณฑ์การคัดออก

ตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากไขกระดูกที่เก็บไว้มีปริมาณไม่เพียงพอ หรือไม่มีคุณภาพ

วิธีการดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1

1. เก็บข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นจากผู้ป่วยและผู้ปกครองที่ถูกคัดเลือกเข้าร่วมโครงการศึกษา
2. เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูก โดยครั้งแรกเก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูกที่ทำเพื่อให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก และครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะไขกระดูกที่ทำเพื่อการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ เพื่อนำตัวอย่างเลือดจากไขกระดูกทั้งสองครั้งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี โฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry) โดยครั้งแรกทำเพื่อการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดใด และครั้งที่สองทำเพื่อยืนยันว่ามีโรคกลับจริง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดจากไขกระดูกทั้งสองครั้งที่ได้ไปทำการคัดแยกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากเลือดจากไขกระดูก
3. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์
 - 1) นำเซลล์มะเร็งที่ได้มาทำการแยกโปรตีนออกจากเซลล์โดยทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Sonication และทำการป้องกันการแตกสลายของโปรตีนโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของน้ำย่อยโปรตีนภายในเซลล์
 - 2) นำโปรตีนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ทั้งสองชนิดด้วยวิธี two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis โดย First dimensional gel electrophoresis ทำการแยกชนิดโปรตีนโดยใช้ isoelectric point ของโปรตีนแต่ละชนิด แล้วนำ gel จากชั้นที่หนึ่งมาทำ Second dimensional gel electrophoresis โดยใช้ Molecular weight ในการแยกชนิดโปรตีนอีกครั้ง

- 3) นำแผ่น gel ดังกล่าวมาทำการย้อมโปรตีนด้วยสี Fluorescence และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (Image Master Platinum 6.0)
- 4) นำโปรตีนที่พบว่ามีความแตกต่างของชนิดและ/หรือปริมาณระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองชนิดไปทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Mass spectrometry
4. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีจีโอไมกส์
 - 1) นำเซลล์มะเร็งที่ได้มาทำการคัดแยกสารพันธุกรรมชนิด RNA ออกจากเซลล์ดังกล่าว
 - 2) นำ RNA ที่ได้มาทำการเปลี่ยนเป็น cDNA ชนิด double strand
 - 3) นำ Double-strand cDNA มาเปลี่ยนเป็น cRNA และติดไปโอบิติน จากนั้นทำให้เป็นชิ้นส่วนย่อยๆ
 - 4) นำ biotinylated cRNA ที่ได้มาทำการ Hybridization ลงบน GeneChip
 - 5) นำ GeneChip ที่ได้มาทำการล้างและย้อมสี จากนั้นนำไปอ่านด้วยเครื่องอ่านผล

ระยะที่ 2

1. ทบทวนประวัติผู้ป่วยในกลุ่มประชากรศึกษาที่ได้ผ่านเกณฑ์การคัดกรองต่างๆ ที่กำหนดไว้ในข้างต้น เพื่อการเก็บข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ วันเกิด วันที่ได้รับการวินิจฉัย จำนวนเม็ดเลือดขาวเมื่อแรกวินิจฉัย ลักษณะทาง immunophenotype, molecular genetics และ cytogenetic เมื่อแรกวินิจฉัย อวัยวะที่โรคกระจายถึงวันที่เกิดภาวะโรคกลับ ลักษณะทาง immunophenotype, molecular genetics และ cytogenetic เมื่อเกิดภาวะโรคกลับ วันที่มาตรวจติดตามวันสุดท้าย และสูตรยาเคมีบำบัด

สำหรับสูตรยารักษาโรค very high-risk ALL ที่โรงพยาบาลรามาธิบดี จะมีสูตรยาเคมีบำบัดทั้งหมด 2 สูตร ได้แก่ RAMA ALL 001 และ ThaiPOG-ALL-1303 ซึ่งทั้ง 2 สูตรมีความแตกต่างที่สำคัญคือลำดับการให้ยา และระยะเวลาในการให้ยาดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

RAMA ALL 001 protocol

- i. Remission induction: ระยะเวลาในการให้ 6 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา prednisolone, vincristine, doxorubicin, L-asparaginase, cyclophosphamide, cytarabine, 6-mercaptopurine, mesna, intrathecal methotrexate, intrathecal hydrocortisone
- ii. Consolidation: ระยะเวลาในการให้ 9 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา methotrexate, 6-mercaptopurine, intrathecal methotrexate, intrathecal hydrocortisone
- iii. Re-intensification: ระยะเวลาในการให้ 1 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา dexamethasone, cytarabine, etoposide, L-asparaginase, intrathecal methotrexate, intrathecal hydrocortisone
- iv. Reinduction: ระยะเวลาในการให้ 3 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา vincristine, doxorubicin, dexamethasone, L-asparaginase

v. Continuation: ระยะเวลาในการให้ 6 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา vincristine, doxorubicin, dexamethasone, 6-mercaptopurine, L-asparaginase, intrathecal methotrexate, intrathecal hydrocortisone

ThaiPOG-ALL-1303 protocol

i. Induction: ระยะเวลาในการให้ 5 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา prednisolone, vincristine, doxorubicin, L-asparaginase, intrathecal methotrexate

ii. Augmented consolidation: ระยะเวลาในการให้ 8 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา vincristine, L-asparaginase, cyclophosphamide, cytarabine, 6-mercaptopurine, mesna, etoposide, intrathecal methotrexate

iii. Augmented interim maintenance: ระยะเวลาในการให้ 7 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา vincristine, methotrexate, leucovorin, 6-mercaptopurine, intrathecal methotrexate

iv. Augmented delay intensification: ระยะเวลาในการให้ 8 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา dexamethasone, vincristine, doxorubicin, L-asparaginase, cyclophosphamide, etoposide, intrathecal methotrexate

v. Interim maintenance: ระยะเวลาในการให้ 7 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา vincristine, methotrexate, intrathecal methotrexate

vi. Augment maintenance: ระยะเวลาในการให้ 12 สัปดาห์ ประกอบด้วยยา prednisolone, vincristine, 6-mercaptopurine, methotrexate, intrathecal methotrexate

โดยขนาดยาในทั้งสองสูตรนั้นมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมาก มีข้อแตกต่างเพียงเล็กน้อย เช่น ขนาดของ prednisolone ที่สูงกว่าเล็กน้อยในสูตร RAMA 001 มีการให้ยา hydrocortisone ทางน้ำไขสันหลังในสูตร RAMA 001 การเลือกใช้สูตรยาได้ขึ้นกับการตัดสินใจของอาจารย์แพทย์ที่เป็นผู้ดูแลอยู่ในขณะนั้น

2. จากนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งในไขกระดูกถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีภาวะโรคกลับ (relapsed group) และกลุ่มที่ไม่มีภาวะโรคกลับ (non-relapsed group) โดยทั้งสองกลุ่มถูกนำไปทำการศึกษาต่อกับกระบวนการทาง proteomics ประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่

- 1) Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) ตัวอย่างเซลล์มะเร็งในไขกระดูกที่เก็บได้ถูกทำละลายให้เจือจางลง 5 เท่าด้วย deionized water และทำการวัดโปรตีนต่อด้วยวิธีการ Bradford's assay⁽⁹⁾ หลังจากนั้นเก็บโปรตีนที่วัดได้จำนวน 200 μg ในแต่ละ sample ไปผสมกับ rehydration buffer containing 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 120 mmol/L DTT (dithiothreitol), 40 mmol/L Tris base, 2% ampholytes (pH 3–10) และ bromophenol blue เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 150 $\mu\text{L}/\text{sample}$ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไป rehydrate ด้วย Immobiline™ DryStrips (7 cm long IPG strips; linear pH gradient of 3–10 and of 4–7; GE Healthcare®) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

จากนั้นนำ DryStrips ที่ได้ไปเข้าสู่กระบวนการ Isoelectric focusing ซึ่งเป็นการแยกครั้งที่ 1 (first dimension) โดยใช้หลักการทางประจุไฟฟ้าใน Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare®) ที่อุณหภูมิ 20 °C จนกระทั่งพลังงานไฟฟ้าขึ้นถึง 9083 V จากนั้นนำ DryStrips ที่ได้ไป equilibrate ครั้งที่ 1 ใน buffer ประกอบด้วย 6 mol/L urea, 130 mmol/L DTT, 112 mmol/L Tris base, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol และ 0.002% bromophenol blue เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วย equilibrate ครั้งที่ 2 ใน buffer ประกอบด้วย 6 mol/L urea, 135 mmol/L iodoacetamide, 112 mmol/L Tris base, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol และ 0.002% bromophenol blue เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นก็นำไปเข้าสู่การแยกครั้งที่ 2 (second dimension) ด้วย 12% (w/v) polyacrylamide gel using SE260 mini-vertical electrophoresis unit (GE Healthcare®) ที่พลังงานไฟฟ้า 150 V เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้คือ 2-D gels ที่มีจุดโปรตีนกระจายเต็มแผ่น จากนั้นนำไปย้อมสี Coomassie blue silver dye เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C

- 2) Protein spot matching and analysis 2-D gels ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum (GE Healthcare®) เพื่อทำการจับคู่และหาจุดต่างของจุดโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยทำการตั้งค่าพื้นฐานของโปรแกรมโดยใช้ parameters ดังต่อไปนี้ minimal area=10 pixels, smooth factor=2.0 และ saliency=200.0 จากนั้นก็ทำการกำหนดค่า reference gel โดยใช้หลักการหาจุดที่มีเหมือนกันในทุก gel เพื่อนำมาใช้เป็นจุดอ้างอิง และเมื่อได้จุดอ้างอิงมาแล้ว จึงค่อยทำการหาจุดต่างในแต่ละ gel ซึ่งผลลัพธ์ที่ต้องการคือ จุดที่แตกต่างระหว่างกลุ่ม relapsed และ non-relapsed ทั้งนี้ ความเหมือนและความแตกต่างระหว่างจุด วัดโดยการปรับค่าความเข้มพื้นหลัง (background) ของ gel ให้เท่ากันก่อน จากนั้นค่อยวัดค่าความเข้มของโปรตีนในแต่ละจุดที่ต้องการศึกษาเพื่อหาความแตกต่างของโปรตีนระหว่าง 2 จุด โดยตั้งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ t-test และ F-test ที่ p-value < 0.05
- 3) In-gel tryptic digestion เมื่อได้จุดโปรตีนที่ต้องการศึกษาแล้ว เข้าสู่กระบวนการสกัดโปรตีนออกจาก 2-D gels เริ่มจากการนำไปล้างด้วย 200 µl of 50% (v/v) ACN (acetonitrile)/50 mmol/L NH₄HCO₃ buffer (pH 8.0) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ทั้งหมด 2 ครั้ง ต่อด้วยล้างอีกครั้งด้วย 200 µl of 100% ACN หลังจากล้างเสร็จก็มาทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator จากนั้นนำไป incubated ต่อในสารละลาย 10 mM DTT/50 mM NH₄HCO₃ ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายที่เหลือทิ้งไปและเติมสารละลายใหม่ 200 µl of ACN และนำไปทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator จากนั้นทำการกระบวนการ alkylate โดยการ incubate ในสารละลาย 55 mM IAA/50 mM NH₄HCO₃

ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในความมืด เมื่อครบกำหนดก็เทสารละลายทิ้งไป และเติมใหม่ด้วยสารละลาย 100% ACN ทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator จากนั้น 2-D gels ที่ได้นำมา rehydrate ด้วย 10 mcl of 1% (w/v) trypsin (Promega) in 50 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0). ตามด้วย incubated ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตามด้วยการสกัดโปรตีนโดยใช้ 10 mcl of 50% (v/v) ACN/5% (v/v) TFA (trifluoroacetic acid) สกัดท้ายโปรตีนที่ได้ก็นำมาทำให้แห้งด้วย SpeedVac concentrator

- 4) Protein spot identification by matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight/time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometer analysis ตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้นำมาทำการ premix ด้วย matrix solution [7 mg/ml CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) in 50% (v/v) ACN, 0.1% (v/v) TFA] และนำไปหยดลงในหลุมบนแผ่น MTP 384 target plate ground steel ซึ่งในแต่ละหลุมมี parent ions ที่ได้กำหนดค่ามาตรฐานไว้คือ peak within the m/z 700–3000 range กับ intensity above 10 counts±include/exclude จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง mass spectrometry เพื่อทำการยิง laser ในแต่ละหลุมด้วยค่าพลังงาน 5 V ความถี่ 10 Hz เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นข้อมูลที่ได้ก็จะนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlexAnalysisTM data processing software (Bruker[®]) ซึ่งค่าผลลัพธ์ที่ได้ก็จะอยู่ในรูปของไฟล์ .txt on Biotool (Bruker[®]) จากนั้นนำค่าดังกล่าวไปทำการเปรียบเทียบกับ protein data base ใน search engine ที่มีชื่อว่า MASCOT[®] โดยมีจุดประสงค์เพื่อหาชนิดของโปรตีน จากนั้นนำข้อมูลชนิดของโปรตีนที่ได้ ไปวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วย STRING data base v9.1 เพื่อหาหน้าที่การทำงานของโปรตีนที่ค้นพบต่อไป
- 5) Validation of the proteomic data using western blot analysis เมื่อได้ข้อมูลชนิด, โครงสร้าง และหน้าที่ของโปรตีนที่ต้องการศึกษามาแล้ว ก็ทำการ validate ด้วยวิธีการ Western blot analysis เริ่มจากนำโปรตีนที่สกัดออกจาก 2-D gels ย้ายลงสู่ nitrocellulose membrane จากนั้นนำไป incubate ด้วย 5% skim milk in PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างต่อด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง และ incubate ด้วย antibody ต่อโปรตีนที่เราต้องการศึกษาเช่น ATPB (Abcam[®]) ที่อัตราส่วนความเข้มข้น 1:1000 ในสารละลาย 1%BSA/PBS ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง เพื่อล้าง antibody ที่เหลือออก จากนั้นนำไป incubate ด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase ที่อัตราส่วนความเข้มข้น 1:2000 ในสารละลาย 1%BSA/PBS อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วยการนำไปล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง เพื่อล้าง antibody ที่เหลือออก จากนั้นนำไปย้อมลงแผ่น film เพื่อทำการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนใน film ที่ต้องการศึกษาต่อไป

3. เมื่อได้ข้อมูลทางคลินิก (clinical data) และข้อมูลโปรตีน (proteomics data) ที่ต้องการแล้ว นำมาทำการวิเคราะห์และหาข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติม เพื่อหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีนว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดขึ้นของภาวะโรคกลับในโรค ALL หรือไม่อย่างไร

อุปกรณ์ที่ใช้

อุปกรณ์ที่จำเป็นในการวิจัย

Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System

Ettan DALTsix Large Vertical System

Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS)

Affymetrix GeneChip Microarray

อุปกรณ์วิจัยที่มีอยู่แล้ว

Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System

Ettan DALTsix Large Vertical System

Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS)

Affymetrix GeneChip Microarray

ผลการศึกษา

ระยะที่ 1

ในช่วงระหว่างการศึกษาวิจัย เดือนธันวาคม 2550 ถึง เดือนธันวาคม 2551 รวมเวลาทั้งสิ้น 12 เดือน มีผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาทั้งสิ้น 2 ราย โดยมีข้อมูลพื้นฐานดังนี้

ผู้ป่วยรายที่ 1 เด็กหญิงไทยอายุ 5 ปี 1 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น acute lymphoblastic leukemia (ALL) ชนิด early pre-B cell เมื่อวันที่ 18 มกราคม 2549 ขณะที่ผู้ป่วยมีอายุ 3 ปี 8 เดือน โดยมี presenting white blood cell count $205 \times 10^9/L$, hematocrit 13% และ platelet count $36 \times 10^9/L$ ผล real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) พบ t(12;21)(p13;q22) หรือ *TEL/AML1* ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ALL standard risk protocol ผู้ป่วยมีโรคกลับเมื่อวันที่ 12 มิถุนายน 2551 ขณะที่ยังคงได้ยาเคมีบำบัดตาม protocol ดังกล่าวอยู่

ผู้ป่วยรายที่ 2 เด็กชายไทยอายุ 13 ปี 6 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น acute lymphoblastic leukemia (ALL) ชนิด early pre-B cell เมื่อวันที่ 23 เมษายน 2551 ขณะที่ผู้ป่วยมีอายุ 13 ปี 4 เดือน โดยมี presenting white blood cell count $140 \times 10^9/L$, hematocrit 37% และ platelet count $42 \times 10^9/L$ ผล RT-PCR พบ t(9;22)(q31;q11) หรือ *BCR/ABL* ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ALL standard risk protocol ผู้ป่วยมีโรคกลับเมื่อวันที่ 14 สิงหาคม 2551 ขณะที่ยังคงได้ยาเคมีบำบัดตาม protocol ดังกล่าวอยู่

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและการแสดงออกของโปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของคนปกติ (รูปที่ 1) ผู้ป่วยรายที่ 1 จากการทำให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก (รูปที่ 2) จากการทำให้การวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ (รูปที่ 3) ผู้ป่วยรายที่ 2 จากการทำให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก (รูปที่ 4) และจากการทำให้การวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ (รูปที่ 5)

จากการเปรียบเทียบจำนวนและการแสดงออกของชนิดโปรตีนโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MELANIE และ จากการคัดเลือกโดยผู้วิจัยร่วมกัน ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนระหว่างแผ่นที่โปรตีนของผู้ป่วยทั้งสองรายจากการทำให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก และจากการทำให้การวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ



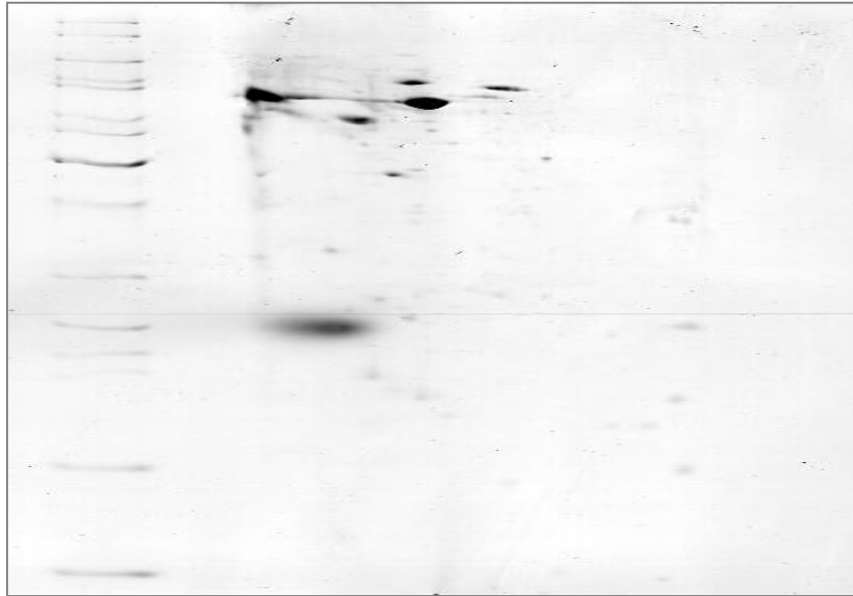
รูปที่ 1 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของคนปกติ



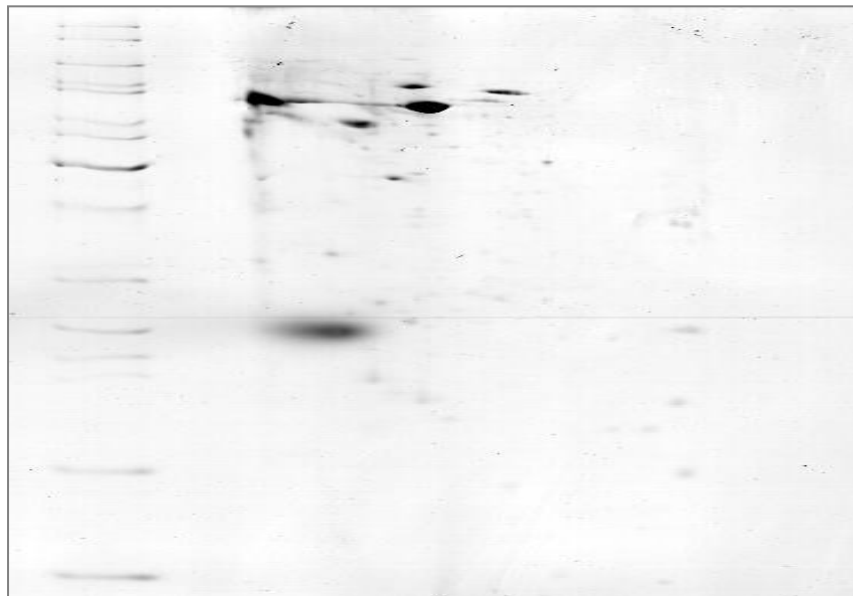
รูปที่ 2 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของผู้ป่วยรายที่ 1 ที่ทำให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก



รูปที่ 3 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของผู้ป่วยรายที่ 1 ที่ทำให้การวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ



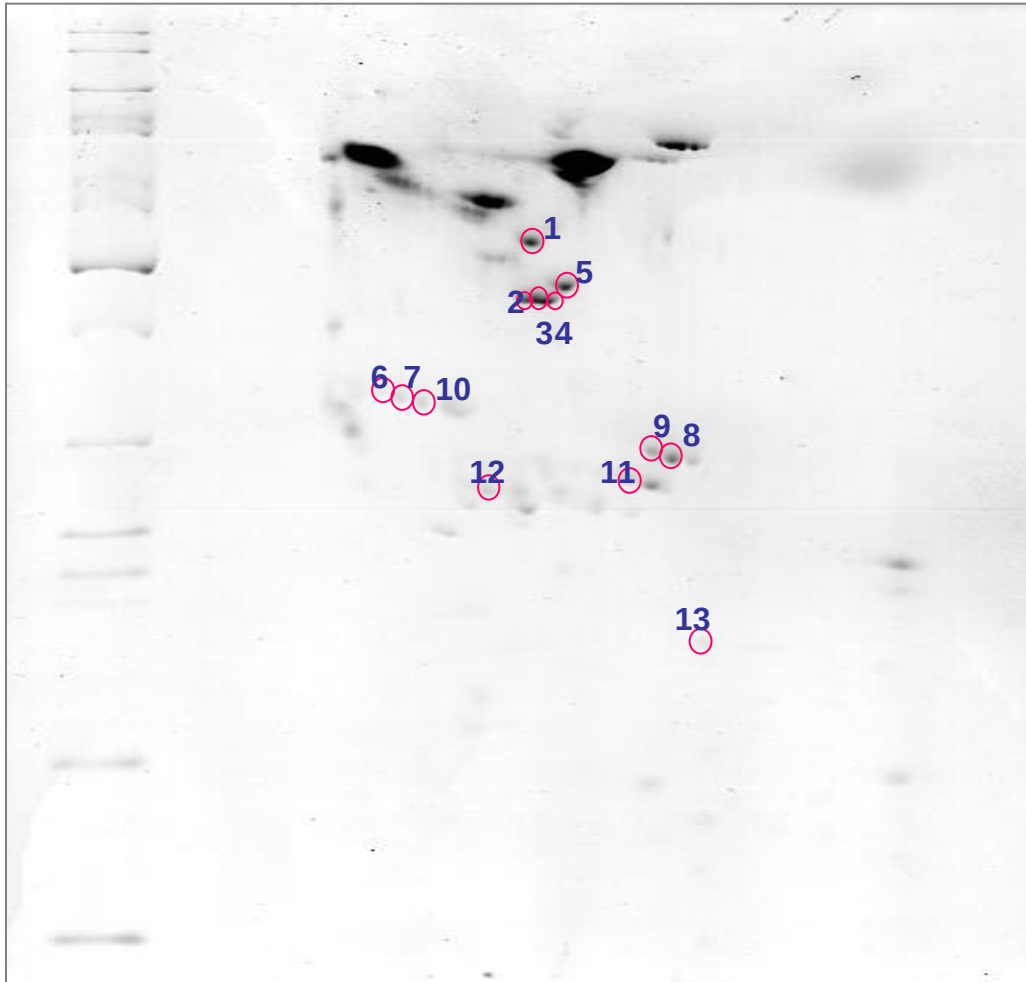
รูปที่ 4 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของผู้ป่วยรายที่ 2 ที่ทำให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก



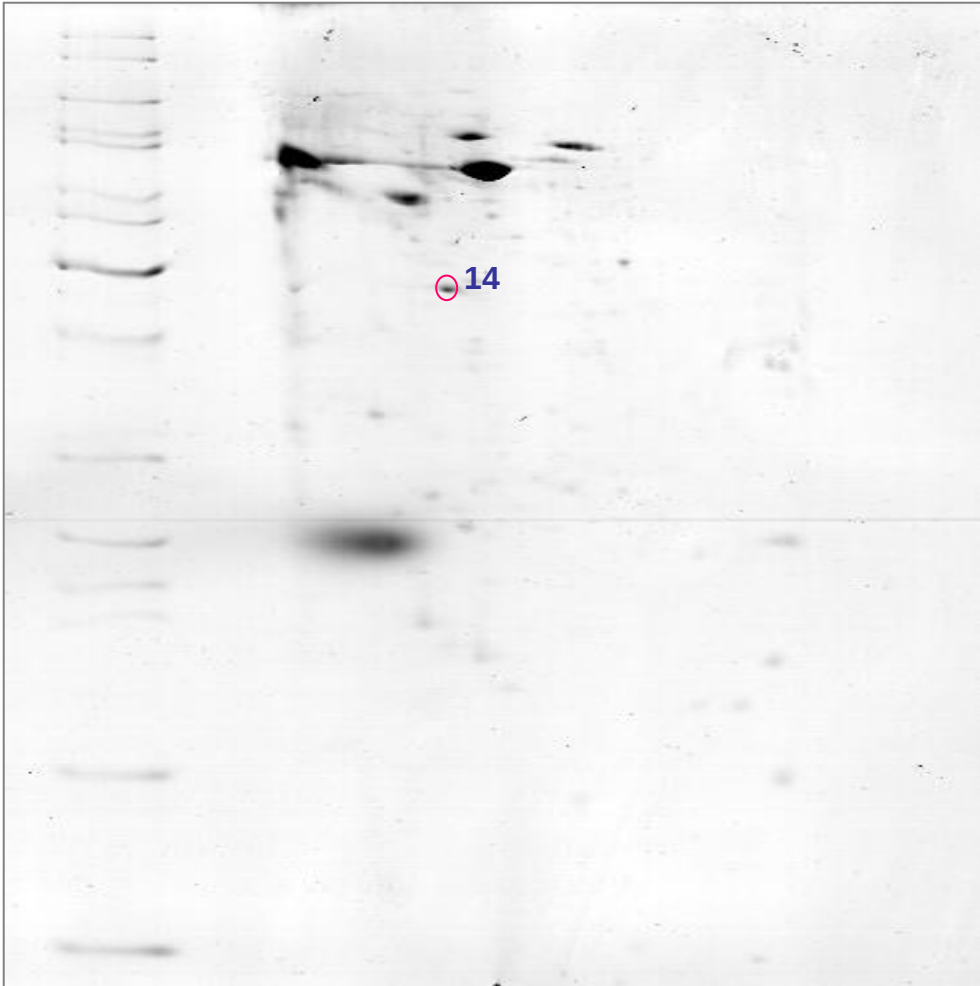
รูปที่ 5 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของผู้ป่วยรายที่ 2 ที่ทำการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ

จากการเปรียบเทียบจำนวนและการแสดงออกของชนิดโปรตีนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MELANIE และ จากการคัดเลือกโดยผู้วิจัยร่วมกัน พบว่ามีความแตกต่างกันของการแสดงออกของโปรตีนระหว่างแผนที่โปรตีนของผู้ป่วยทั้งสองรายกับแผนที่โปรตีนของคนปกติ ซึ่งทางทีมผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันชัดเจนจำนวน 14 จุดเพื่อมาทำการวิเคราะห์หาชนิดโปรตีนต่อไป โดยจุดโปรตีนตำแหน่งที่ 1 ถึง 9 เป็นจุดโปรตีนที่ปรากฏในแผนที่โปรตีนของคนปกติแต่ไม่แสดงออกในแผนที่โปรตีนของผู้ป่วยทั้งสองราย จุดโปรตีนตำแหน่งที่ 10 ถึง 13 เป็นจุดโปรตีนที่ปรากฏในแผนที่โปรตีนของทั้งคนปกติและแผนที่โปรตีนของผู้ป่วย

โดยที่จุดโปรตีนในคนปกติมีค่าความเข้มของการแสดงออกมากกว่าจุดโปรตีนในผู้ป่วยทั้งสองราย มากกว่า 2 เท่า และจุดโปรตีนตำแหน่งที่ 14 เป็นจุดโปรตีนที่ปรากฏในแผนที่โปรตีนของผู้ป่วยโดยที่ไม่แสดงออกในแผนที่โปรตีนของคนปกติ ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7



รูปที่ 6 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของคนปกติและแสดงจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างจากแผนที่โปรตีนของผู้ป่วยทั้งสองรายที่ทางทีมผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกมาเพื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน



รูปที่ 7 ภาพแผนที่โปรตีนของเลือดจากไขกระดูกของผู้ป่วยและแสดงจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างจากแผนที่โปรตีนของคนปกติที่ทางทีมผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกมาเพื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Mass spectrometry จะทำให้ได้ peptide mass fingerprint ของโปรตีนแต่ละตำแหน่ง เมื่อนำ peptide mass fingerprint มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MASCOT peptide mass fingerprint พบว่าสามารถบอกชนิดของโปรตีนตำแหน่งต่างๆได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของโปรตีนตำแหน่งต่างๆที่ได้ผลจากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Mass spectrometry และโปรแกรม MASCOT peptide mass fingerprint

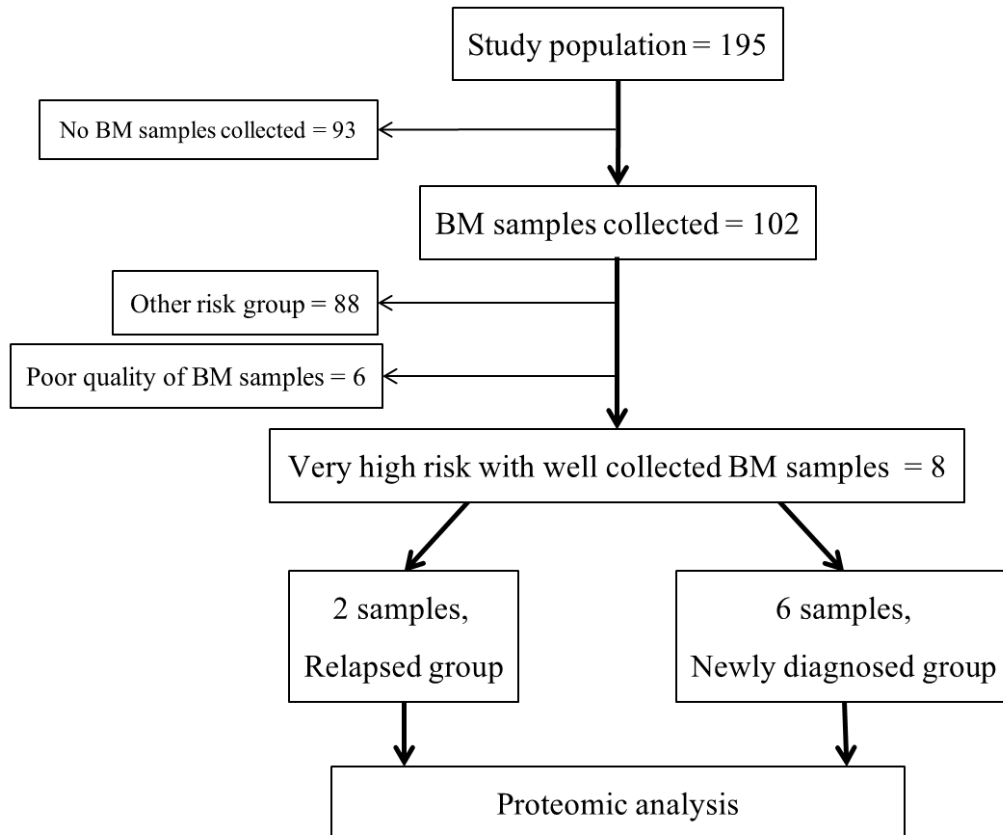
ตำแหน่งโปรตีน	ชนิดของโปรตีน	p value
1	RAD50 protein	NS
2	PREDICTED: similar to hCG2038355	NS
3	PREDICTED: similar to forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1	NS
4	Chain A, cysteine protease Atg4a	NS
5	CD 36	NS
6	SLP-1	NS
7	Glutaredoxin (thiotransferase)	NS
8	MXRA5	NS
9	Myosin VA	NS
10	Chromosome 17 open reading frame 85 protein	NS
11	Coiled-coil domain containing 93	NS
12	LIM domain only 7	NS
13	Protein inhibitor of activated STAT, 4 variant	NS
14	Actin, beta (ACTB) protein	<0.05

จากการวิเคราะห์ชนิดโปรตีนทั้ง 14 ตำแหน่งจะพบว่ามีเพียงตำแหน่งเดียว คือ ตำแหน่งที่ 14 ที่มีค่าความน่าเชื่อถือของชนิดโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งโปรตีนชนิดนั้นคือ ACTB protein

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีจีโนมิกส์จากผู้ป่วยทั้งสองราย พบว่าจากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์มะเร็งจากการวินิจฉัยครั้งแรกกับ เซลล์มะเร็งจากการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับนั้น พบว่ามียีนจำนวน 1 ยีนที่มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยทั้งสองราย นั้นคือยีน *OLFM 4* หรือ Olfactomedin 4

ผลการศึกษา ระยะที่ 2

ประชากรผู้ป่วย ALL เข้าร่วมการในศึกษานี้ทั้งสิ้น 195 คน มีการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งไขกระดูกไว้ 102 คน เป็นโรค ALL กลุ่ม very high-risk 14 คน กลุ่มอื่น 88 คน ในจำนวนผู้ป่วย ALL กลุ่ม very high-risk 14 คน มี 8 คนที่ได้การเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งไขกระดูกอย่างมีคุณภาพ และใน 8 คนนี้เป็นกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่ (newly diagnosed group) 6 คน และกลุ่มที่เกิดโรครีกลับ (relapsed group) 2 คน (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แผนภาพการดำเนินงานวิจัย ตั้งแต่จำนวนประชากรที่เข้าร่วมงานวิจัย จำนวนประชากรที่ผ่านเกณฑ์คัดเข้าและคัดออก จำนวนประชากรของกลุ่มโรคกลับและการวินิจฉัยครั้งแรกจนถึงการวิเคราะห์ทาง Proteomics

ข้อมูลทางคลินิก

ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยกลุ่ม very high-risk ALL ที่ได้เก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งไขกระดูกไว้อย่างดีทั้ง 8 คน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

กลุ่ม Relapsed

ผู้ป่วยรายที่ 1: เด็กชายอายุ 9.3 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 13 เมษายน 2550 จำนวนเม็ดเลือดขาว 29,600 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยง

สูงสุดเนื่องจากพบ Philadelphia chromosome (46,XY, t(9;22)(q34;q11)) และได้รับการรักษาด้วย RAMA ALL 001 (standard and high risk) protocol ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับในไขกระดูกเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม 2555 เมื่ออายุ 15 ปี ผลการตรวจพบว่าเป็น ALL ชนิด B cell และ พบ cytogenetic มีความผิดปกติ 50,XY,+X,+5,-9,+21,+2/46,XY=5.71%/94.29% ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยยาเคมีบำบัดอีกครั้งหนึ่งจนโรคสงบ และได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากมารดาเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2556 ผู้ป่วยเสียชีวิตลงด้วยภาวะติดเชื้อเมื่ออายุ 17.6 ปี

ผู้ป่วยรายที่ 2: เด็กชายอายุ 4.2 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2552 พบจำนวนเม็ดเลือดขาว 7,400 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากพบ Philadelphia chromosome (46,XY, t(9;22)(q34;q11)) และได้รับการรักษาด้วย RAMA ALL 001 (standard and high risk) protocol ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับในไขกระดูกเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2553 เมื่ออายุ 5.3 ปี และผลการตรวจพบว่าเป็น ALL ชนิด B cell แต่ไม่พบความผิดปกติของ cytogenetic และ molecular genetic ผู้ป่วยเสียชีวิตลงอย่างสงบเมื่ออายุ 5.4 ปี

กลุ่ม Newly diagnosed

ผู้ป่วยรายที่ 1: เด็กชายอายุ 14.2 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 5 พฤษภาคม 2553 จำนวนเม็ดเลือดขาว 8,500 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบ Philadelphia chromosome (46,XY, t(9;22)(q34;q11)) และได้รับการรักษาด้วย RAMA ALL 001 (standard and high risk) protocol จนครบ จากนั้นผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากมารดาเมื่อวันที่ 19 มีนาคม 2557 ปัจจุบันผู้ป่วยอยู่ในภาวะโรคสงบ

ผู้ป่วยรายที่ 2: เด็กหญิงอายุ 11 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 30 มิถุนายน 2552 จำนวนเม็ดเลือดขาว 216,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบ MLL rearrangement (46,XX, t(4,11)(q21,q23)) และได้รับการรักษาด้วย RAMA ALL 001 (standard and high risk) จนครบ จากนั้นผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากมารดาเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2557 ปัจจุบันผู้ป่วยอยู่ในภาวะโรคสงบ

ผู้ป่วยรายที่ 3: เด็กหญิงอายุ 17 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 17 สิงหาคม 2554 พบจำนวนเม็ดเลือดขาว 55,800 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบ MLL rearrangement (46,XX, t(4,11)(q21,q23)) และได้รับการรักษาด้วย RAMA ALL 001 (standard and high risk) ปัจจุบันผู้ป่วยอยู่ในภาวะโรคสงบหลังจบการรักษา

ผู้ป่วยรายที่ 4: เด็กหญิงอายุ 14.8 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 10 สิงหาคม 2553 ผล จำนวนเม็ดเลือดขาว 24,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผลตรวจโครโมโซมปกติ 46,XX ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบเซลล์มะเร็งหลังให้ยาเคมีบำบัดช่วง induction phase ของ RAMA ALL 001 (standard and high risk) ครบ (MRD $\geq$ 0.01%) ปัจจุบันผู้ป่วยอยู่ในภาวะโรคสงบหลังจบการรักษา

ผู้ป่วยรายที่ 5: เด็กชายอายุ 4 เดือน ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 1 พฤศจิกายน 2555 จำนวนเม็ดเลือดขาว 201,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผลตรวจโครโมโซมพบ MLL rearrangement (46,XY, t(11;19)(q23;p13)) ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบ

เซลล์มะเร็งหลังให้ยาเคมีบำบัดช่วง induction phase ของ RAMA ALL (standard and high risk) ครบ (MRD $\geq 0.01\%$) ผู้ป่วยเสียชีวิตลงจากภาวะติดเชื้อระหว่างให้ยาเคมีบำบัดเมื่ออายุ 20 เดือน ขณะนั้นโรคมะเร็งยังไม่สงบ (refractory lymphoblastic leukemia)

ผู้ป่วยรายที่ 6: เด็กหญิงอายุ 11.5 ปี ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ALL ชนิด B cell ตั้งแต่วันที่ 9 เมษายน 2557 ผล จำนวนเม็ดเลือดขาว 136,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร ผลตรวจโครโมโซมพบ E2A-PBX1 (46,XX, t(1;19)(q23;p13)) ผู้ป่วยรายนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสุดเนื่องจากตรวจพบเซลล์มะเร็งหลังให้ยาเคมีบำบัดช่วง induction phase ของ RAMA ALL 001 (standard and high risk) ครบ (MRD $\geq 0.01\%$) ปัจจุบันผู้ป่วยอยู่ในภาวะโรคสงบหลังจบการรักษา

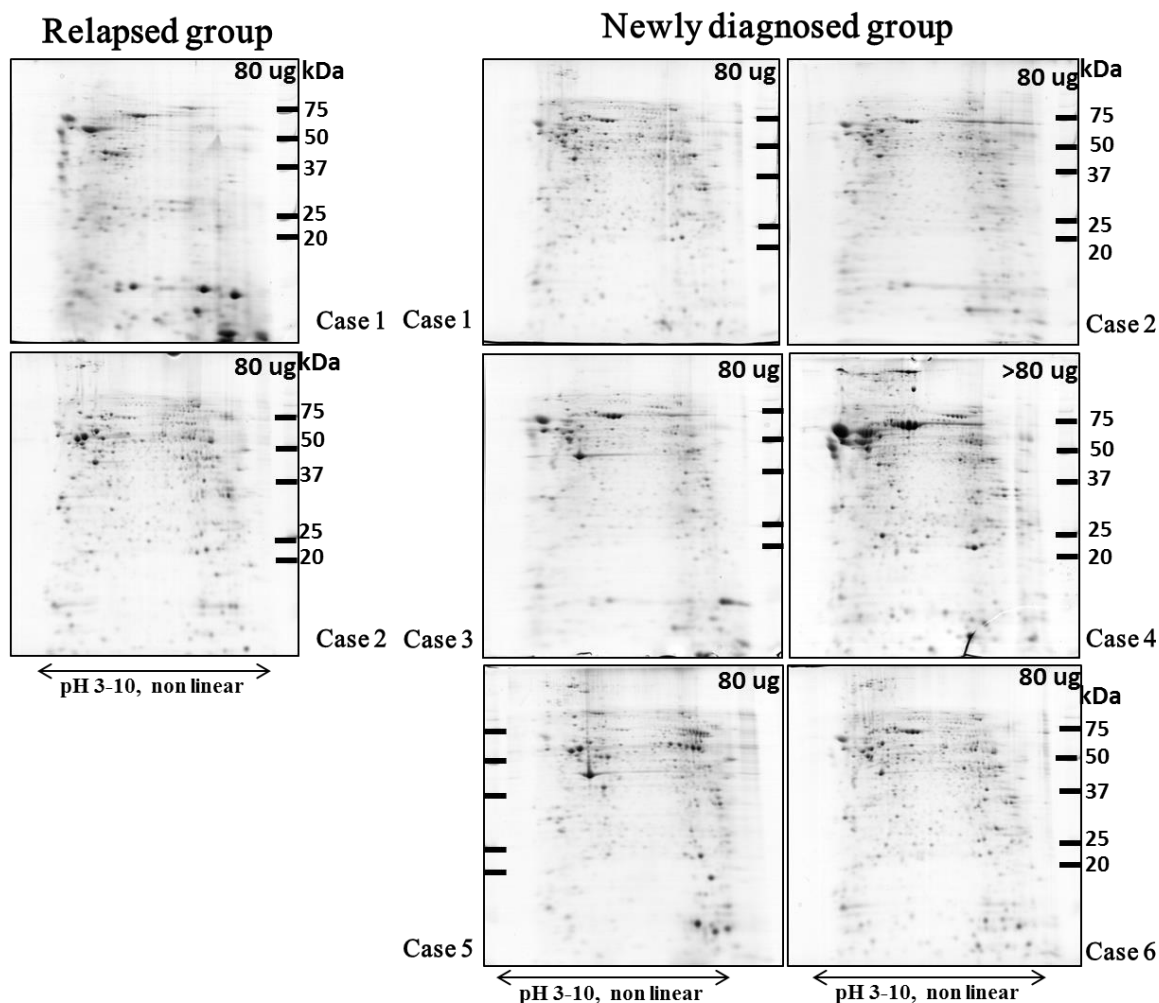
จากข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งหมด สรุปดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดความเสี่ยงสูงสุด (very high-risk ALL) ที่มีไขกระดูกเก็บไว้อย่างเหมาะสมเพียงพอที่ได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลรามาริบิตตั้งแต่ปี 2551-2557

	Relapsed group n=2	Newly diagnosed group n=6
Age of Diagnosed, y (Median)	6.7	7.1
Time to relapse, y (Median)	3.4	N/A
Initial WBC, $\times 10^9/L$ (Median)	18.5	96.1
Induction failure	0	3
<u>Flow cytometry</u>		
B-cell	2	6
T-cell	0	0
<u>Cytogenetic/Molecular genetic</u>		
Normal	0	1
MLL arrangement	0	3
E2A-PBX1	0	1
Ph-chromosome	2	1

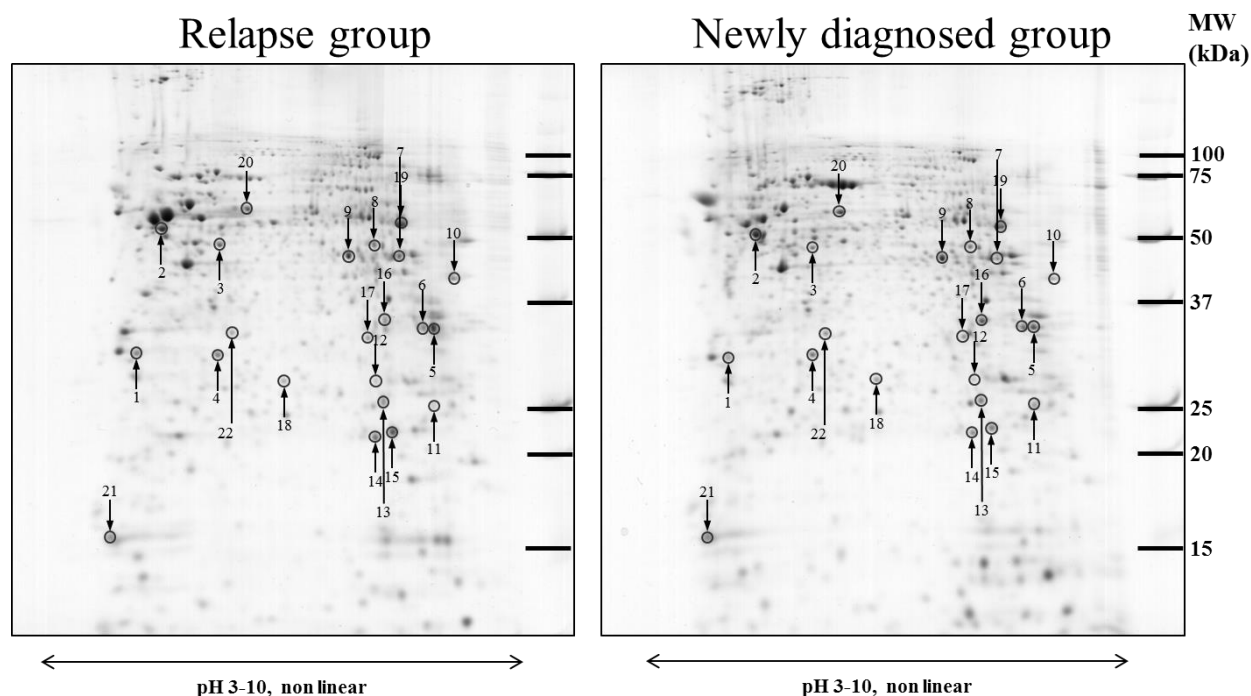
ข้อมูลทาง Proteomics

จากการทำ 2-DE ได้ผลลัพธ์ออกมาเป็น 2-D gel ทั้งหมด 8 ชิ้น ที่มีลักษณะการกระจายตัวของจุดแผนที่โปรตีนที่ใกล้เคียงกัน แต่มีบาง 2-D gel ที่ให้ลักษณะเป็นปื้นโปรตีนมากกว่าเป็นจุดโปรตีน (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 แผนที่โปรตีนของเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วยกลุ่มโรคกลับและการวินิจฉัยครั้งแรกที่ผ่านกระบวนการ 2-DE ที่ผู้วิจัยได้คัดเลือกมาทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน

จากนั้นวิเคราะห์จุดแผนที่โปรตีนที่ได้ พบจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งหมด 22 จุด ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แผนที่โปรตีนของเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วยกลุ่มโรคกลับและการวินิจฉัยครั้งแรกโดยแสดงตำแหน่งโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 22 จุดหลังจากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum

จากนั้นทำการสกัดจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 22 จุด ออกจาก 2-D gel เพื่อทำการหาชนิดโปรตีน (ตารางที่ 3)

จุดโปรตีนทั้งหมด 22 ชนิดนี้ ไปสืบค้นเพื่อหาความเชื่อมโยงกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่ามีจุดโปรตีน 3 ชนิดที่มีการค้นพบว่าอาจมีความเชื่อมโยง และมีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นไปในทางเดียวกันกับงานวิจัยนี้ได้แก่ ATPB (ATP synthase subunit beta)¹⁰, TUBB1 (Tubulin beta-1 chain)¹¹ และ PHB (Prohibitin)¹³ (ตารางที่ 4) โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดบน 2-D gel (รูปที่ 11)

จากนั้นนำชนิดโปรตีนที่ได้ มาวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนด้วย STRING data base v9.1 เพื่อหาหน้าที่การทำงานของโปรตีน ซึ่งพบกระบวนการ oxidative phosphorylation process ลดลง (รูปที่ 12)

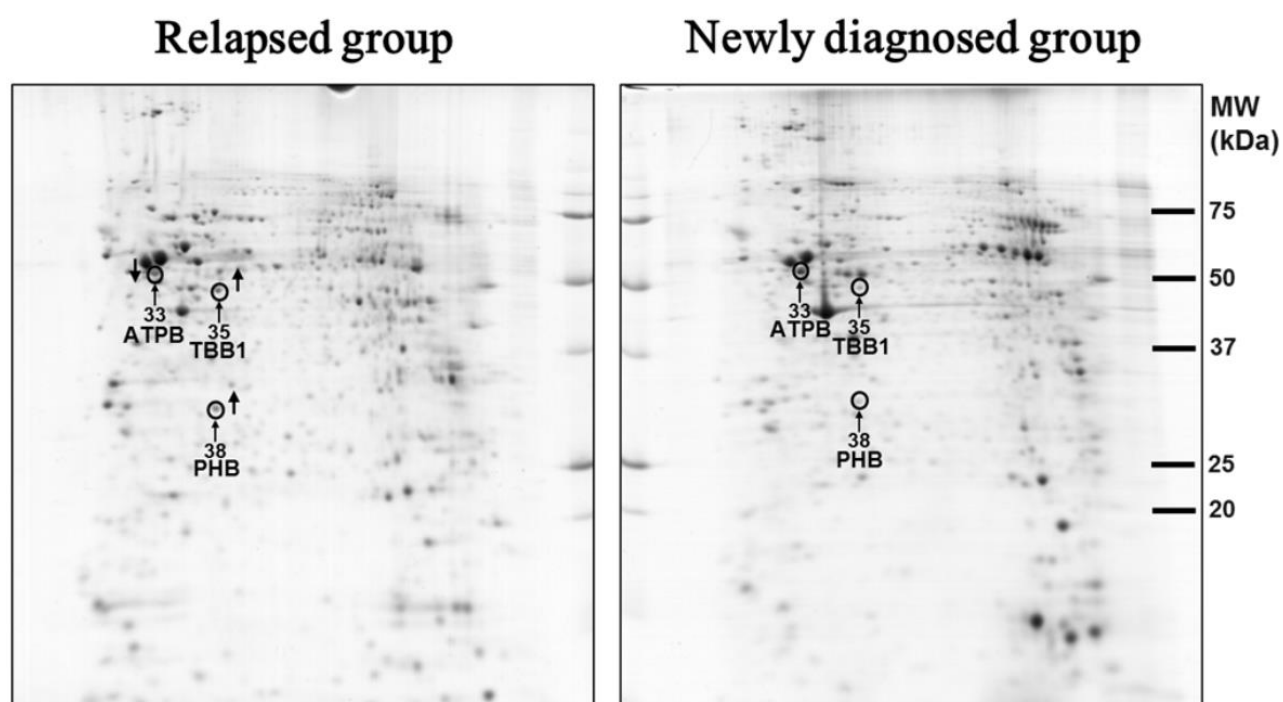
จากนั้นทำการ Validation of the proteomic data ด้วยวิธี Western immunoblotting ซึ่งในที่นี้ทำเฉพาะโปรตีน ATPB เนื่องจากมีหลักฐานการศึกษาที่มีความเป็นไปได้มากที่สุด^(11, 20, 21, 22, 23, 24) ผลพบว่าการแสดงออกที่ลดลงในกลุ่ม Relapsed เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน GAPDH (รูปที่ 13)

ตารางที่ 3 โปรตีน 22 ชนิดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วยกลุ่มโรคกลับและกลุ่มการวินิจฉัยครั้งแรกหลังการวิเคราะห์โปรตีนด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum และ Mass spectrometry

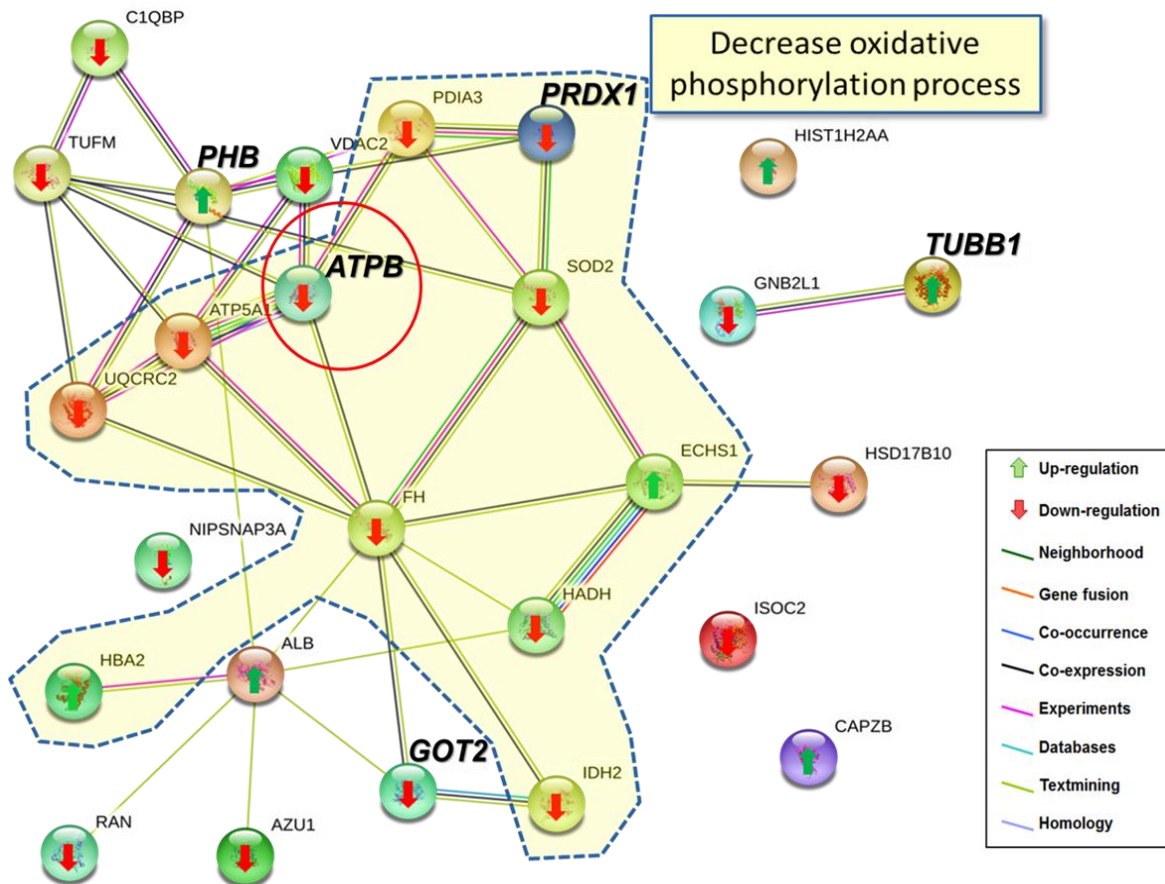
Spot number	Gene name	Protein name
1	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial
2	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
3	TBB1	Tubulin beta-1 chain
4	PHB	Prohibitin
5	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial
6	HCDH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial
7	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
8	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial
9	EFTU	Elongation factor Tu, mitochondrial
10	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial
11	NPS3A	Protein NipSnap homolog 3A
12	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran OS
13	HCD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2
14	SODM	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
15	PRDX1	Peroxiredoxin-1
16	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
17	GBLP	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
18	ECHM	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial
19	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
20	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
21	H2A1A	Histone H2A type 1-A
22	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta

ตารางที่ 4 โปรตีน 3 ชนิดที่พบความแตกต่างของการแสดงออกระหว่างเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วยกลุ่มโรคกลับและกลุ่มการวินิจฉัยครั้งแรกที่มีหลักฐานงานวิจัยเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว พร้อมเปรียบเทียบผลการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวระหว่างงานวิจัยในอดีตและงานวิจัยนี้

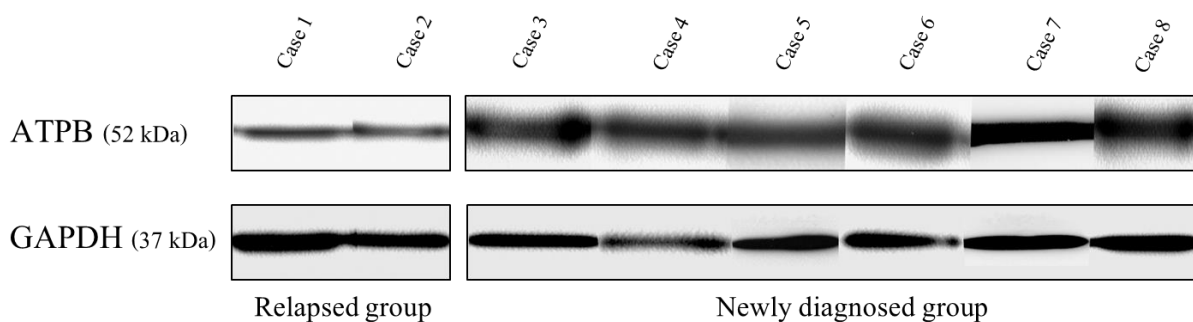
Gene name	Protein name	Biological function	Expression in literature review	Expression in this study
ATPB	ATP synthase subunit beta	ATP biosynthetic process	Decreased	Decreased
TUBB1	Tubulin beta-1 chain	Microtubules regulation	Increased	Increased
PHB	Prohibitin	Negative regulation of cell proliferation	Increased	Increased



รูปที่ 11 แผนที่โปรตีนของเซลล์มะเร็งในไขกระดูกของผู้ป่วยกลุ่มโรคกลับ และการวินิจฉัยครั้งแรกโดยแสดงตำแหน่งโปรตีน 3 จุดที่มีหลักฐานงานวิจัยเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้แก่ ATPB (ATP synthase subunit beta), TUBB1 (Tubulin beta-1 chain) และ PHB (Prohibitin) (เครื่องหมาย ↑ หมายถึงมีการแสดงออกของโปรตีนที่มากขึ้นในกลุ่ม Relapsed เครื่องหมาย ↓ หมายถึงมีการแสดงออกของโปรตีนที่ลดลงในกลุ่ม Relapsed)



รูปที่ 12 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยโปรแกรม STRING v9.1 พบการลดลงของกระบวนการ Oxidative phosphorylation ใน Mitochondria ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ Apoptosis และ Energy metabolism ของเซลล์



รูปที่ 13 ผลการแสดงออกโปรตีน ATPB ด้วยวิธี Western immunoblot พบว่าการแสดงออกโปรตีน ATPB ลดลงในกลุ่มโรคกลับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการวินิจฉัยครั้งแรกและโปรตีนมาตรฐาน GAPDH

ข้อวิจารณ์

จากการศึกษาวิเคราะห์ชนิดและการแสดงออกของโปรตีนจากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสท์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ จำนวนสองรายในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การแสดงออกของโปรตีนระหว่างแผนที่โปรตีนของผู้ป่วยทั้งสองรายจากการทำเพื่อให้ได้การวินิจฉัยครั้งแรก และจากการทำเพื่อการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจจะเป็นผลที่เกิดมาจากการที่มีโปรตีนอัลบูมินเกินในตัวอย่างทั้งสองราย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโปรตีนชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ โปรตีน actin, beta (ACTB) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำจับกับ phospholipase D (PLD1) และ actin microfilaments ทำหน้าที่ในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การขนส่งและการหลั่ง vesicle การทำงานของโปรตีนชนิดนี้ต้องการ oncofetal protein ZBP1 ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันการเกิด translation ของโปรตีน ACTB ก่อนกำหนดโดยการยับยั้งการเกิดการ translation ใน cytoplasm โปรตีนชนิดนี้ถูกกำหนดโดยยีนตำแหน่ง locus 7p15-p12

จากการศึกษาของ Verrills และคณะ⁽⁷⁾ ซึ่งทำการศึกษาเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสท์ที่ดื้อต่อยา vincristine ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ microtubule ในเซลล์ระหว่างการแบ่งตัวที่ทำให้การปลูกถ่ายในหนูทดลอง NOD/SCID โดยวิธีโปรโตโอมิกส์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ actin cytoskeleton ถึง 11 ชนิด โดยพบว่าการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน gamma actin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีน beta actin ดังเช่นที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้อาจจะเป็นจาก กลไกในการเกิดโรคกลับในเซลล์มะเร็งแต่ละสายพันธุ์อาจจะแตกต่างกันได้

จากการศึกษาของ Cui และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสท์จำนวน 10 รายที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ Heat shock 27kda protein 1 ซึ่งอาจจะมีส่วนสำคัญในการแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ในขณะที่การศึกษาของ Yocum และคณะ⁽⁹⁾ พบว่าการแสดงออกของโปรตีน heat shock protein 90 alpha เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟไซท์ที่มี t(4;11) translocation ซึ่งอาจสามารถเป็นตำแหน่งที่ใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมชนิดนี้ได้

จากการศึกษาครั้งนี้และการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟไซท์มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันโดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว หรือ การทำงานของ actin cytoskeleton และกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ heat shock protein ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็งที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับการผู้ป่วยรายอื่นเพื่อทำการยืนยันต่อไป

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสท์ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ จำนวนสองรายในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนในตำแหน่งเดียวกันคือยีน Olfactomedin 4 (OLFM 4)⁽¹⁰⁾ ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 ตำแหน่ง

q21.1 ซึ่งทำหน้าที่ในการต่อต้านการเกิดการตายของเซลล์ (antiapoptotic activity) โดยโปรตีนที่สร้างจากยีน *OLFM4* จะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ potent apoptosis inducer หรือ GRIM-19 ซึ่งจะทำการควบคุมการตายของเซลล์โดยการควบคุมที่ NF-KB

จากการศึกษาของ Yang และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันลิมโฟบลาสท์ชนิด บี พรีเคอร์เซอร์ เซลล์ (B-precursor ALL) ที่มีโรคกลับ โดยทำการศึกษากการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับระหว่างเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับการวินิจฉัยครั้งแรกกับเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับการวินิจฉัยว่าโรคกลับ พบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับจะมีการขาดหายไปของยีน *EBF1* และยีน *IKZF1* สูงถึงร้อยละ 25 และ 35 ตามลำดับ ซึ่งทางผู้วิจัยคาดว่ายีนทั้งสองตำแหน่งอาจจะเกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาการเกิดโรคกลับในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสท์ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Den Boer และคณะ⁽¹²⁾ ที่ทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสท์เฉียบพลันชนิด Precursor B-ALL พบว่ามีการขาดหายไปของยีนหลายตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ บีเซลล์ ได้แก่ ยีน *IKZF1* ยีน *TCF3* ยีน *EBF1* ยีน *PAX5* และยีน *VPREB1* ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่ายีน *OLFM4* มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนดังกล่าว อาจจะเกิดจากที่เซลล์มะเร็งที่ได้นั้นเป็นเซลล์มะเร็งที่มีพัฒนาการคนละขั้นกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสท์ชนิด early pre-B cell ALL ทั้งสองราย จึงทำให้ผลการศึกษาที่ได้มีความแตกต่างกัน

ส่วนการเกิดโรคกลับในผู้ป่วย ALL ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้อัตราการรอดชีพต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม very high-risk จากการทบทวนข้อมูลทางคลินิกผู้ป่วยทั้ง 8 รายที่เข้าร่วมในการศึกษานี้ พบว่าผู้ป่วยทุกรายได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค ALL ชนิด B-cell และมีปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยเข้าเกณฑ์ของกลุ่ม very high-risk ได้แก่ Philadelphia chromosome positive (3 ราย) MLL rearrangement (2 ราย) และ Induction failure (3 ราย) หากพิจารณาเฉพาะกลุ่ม relapsed พบว่ามี Philadelphia chromosome positive ทั้ง 2 ราย ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวทำให้โรคมีความรุนแรงมากขึ้น มีความดื้อต่อยาเคมีบำบัดมากขึ้น ส่งผลให้มีโอกาสเกิดโรคกลับมากขึ้น จำเป็นต้องใช้ยาที่มีความจำเพาะต่อความผิดปกติดังกล่าว เช่น ยาในกลุ่ม Tyrosine kinase inhibitor⁽¹⁴⁾ เมื่อนำมาพิจารณากับผลการรักษาของผู้ป่วยในกลุ่ม relapsed ทั้ง 2 รายในการศึกษานี้ พบว่าผลการรักษายังไม่ดีเนื่องจากผู้ป่วยได้เสียชีวิตลงทั้ง 2 รายหลังเกิดภาวะ relapsed ซึ่งเป็นข้อยืนยันถึงความยากในการดูแลรักษา แต่ทั้งนี้ผู้ป่วย 1 รายในกลุ่ม newly diagnosed ที่มีผล Philadelphia chromosome positive เช่นกัน แต่ผู้ป่วยรอดชีวิตเนื่องจากได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูกก่อนการเกิดภาวะโรคกลับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในระยะโรคสงบครั้งแรกมีผลต่ออัตราการรอดชีพของผู้ป่วยกลุ่มนี้ ส่วนกลุ่ม newly diagnosed ที่เหลืออีก 5 ราย พบว่าในผู้ป่วยที่มี MLL rearrangement ใดๆที่เป็นความผิดปกติที่มีอัตราการเกิด relapsed ที่สูง มีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี แต่ผลการรักษาของผู้ป่วยในการศึกษานี้กลับมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดแตกต่างกันโดยที่ แสดงให้เห็นว่า MLL rearrangement เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายของการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมที่ค่อนข้างมาก ทำให้มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่แตกต่างกัน⁽¹⁵⁾ และสุดท้ายกลุ่ม induction failure แม้ว่าเบื้องต้นจะตรวจไม่พบความผิดปกติที่บ่งชี้ว่าเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง แต่ผู้ป่วยกลับมีการตอบสนองที่ไม่ดีต่อการให้ยาเคมีบำบัดในช่วง induction ทำให้เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยกลุ่ม very high-risk ภาวะดังกล่าวอาจมีสาเหตุจากความผิดปกติบางอย่างที่ส่งผลให้มีการดื้อต่อยาที่ยังตรวจไม่พบจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาปัจจัยบางอย่างที่มีการแสดงออกร่วมกันของผู้ป่วยในกลุ่มนี้

สำหรับข้อมูลทาง proteomics พบจุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม relapsed และ newly diagnosed ทั้งหมด 22 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์ภาพรวมให้เห็นถึงโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของโปรตีนทั้งหมด พบว่าโปรตีนที่แตกต่างกันเกี่ยวข้องกับการลดลงของกระบวนการ oxidative phosphorylation process ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการใช้พลังงานระดับเซลล์โดยมีเอนไซม์ mitochondrial ATP synthase ที่อยู่ใน mitochondrial membrane เป็นตัวขับเคลื่อน และมีโปรตีน ATPB เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) และการสังเคราะห์พลังงานของเซลล์ (energetic metabolism)^(16, 17, 18, 19) ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีน ATPB จึงมีผลในการกำหนดการทำงานของ oxidative phosphorylation process ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมระดับเซลล์ มีหลายการศึกษาพบว่า การลดลงของ ATPB มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง carcinoma ในอวัยวะต่างๆ เช่น ลำไส้ใหญ่ ตับ ไต หลอดอาหาร กระเพาะ ปอด เต้านม^(20, 21, 22, 23) และภาวะดื้อต่อยาเคมีบำบัดในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด เช่น CML (Chronic myeloid leukemia), AML (Acute myeloid leukemia)^(11, 24) เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ATPB มีการลดลงในกลุ่ม relapsed เช่นเดียวกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีน ATPB อาจเป็น protein biomarker ที่สามารถทำนายการเกิดพฤติกรรมระดับเซลล์ที่รุนแรง (tumor aggressiveness) เช่นการ relapse ได้

นอกจากโปรตีน ATPB แล้วยังพบโปรตีนชนิดอื่น ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ โปรตีน TUBB1 และ โปรตีน PHB โดยโปรตีน TUBB1 เป็นรูปแบบหนึ่งของโปรตีน tubulin ที่พบใน eukaryotic cells มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์ microtubule ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ทำหน้าที่ให้เซลล์คงรูป (maintenance of cell shape) ทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว (cell division) ทำให้เกิดการเคลื่อนไหวของเซลล์ (cell motility) และส่งสัญญาณในระดับเซลล์ (intercellular signaling) มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน TUBB1 ในกลุ่มที่โรค CML ที่ได้รับการรักษาแล้ว⁽²⁵⁾ ส่วนโปรตีน PHB เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่การทำงานระดับเซลล์หลายอย่าง เช่น การสังเคราะห์พลังงาน (energy metabolism) การแบ่งตัว (proliferation) การตายของเซลล์ (apoptosis) และการแก่ชราของเซลล์ (senescence) มีการศึกษาพบว่า การแสดงออกของโปรตีน PHB เพิ่มขึ้นในกลุ่มโรค CLL (Chronic lymphocytic leukemia) ที่ได้รับการรักษาแล้ว⁽²⁶⁾ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของทั้งโปรตีน TUBB1 และ โปรตีน PHB เป็นเพียงแค่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งหลังได้รับการรักษาเท่านั้น ไม่ได้บ่งบอกถึงพฤติกรรมระดับเซลล์แต่อย่างใด จึงไม่เหมาะกับการนำมาเป็น protein biomarker เพื่อทำนายพฤติกรรมระดับเซลล์ รวมถึงทำนายภาวะโรคกลับ

ส่วนโปรตีนอื่นๆ ยังไม่พบหลักฐานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชัดเจน อีกทั้งบางส่วนเป็น protein ที่ไม่มีความหมาย (artifact) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกโปรตีน ATPB ที่อาจมีโอกาสเป็น protein biomarker สำหรับทำนายการเกิด relapsed มากที่สุด มาทำการยืนยัน (validation) ด้วยวิธีการ Western immunoblotting ซึ่งพบว่าการแสดงออกของโปรตีน ATPB ลดลงในกลุ่ม relapsed แต่ทั้งนี้ข้อมูลทั้งหมดเป็นเพียงผลการศึกษาในเบื้องต้น (preliminary report) เท่านั้น เนื่องจากจำนวนประชากรในกลุ่ม relapse มีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่ม newly diagnosed ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาวิจัยต่อเพื่อให้ได้จำนวนประชากรที่มากขึ้นทั้งในกลุ่ม very high-risk และในกลุ่มอื่นๆ เพื่อยืนยันการค้นพบโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในกลุ่ม

โรคกลับ นอกจากนั้นกระบวนการเก็บตัวอย่างอย่างมีคุณภาพ เป็นอีกเรื่องที่ควรดำเนินการด้วยเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

ข้อจำกัดในการศึกษา

เนื่องจากผู้เข้าร่วมการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป ร่วมกับจำนวนประชากรที่ไม่สมดุลกันระหว่างกลุ่ม relapsed และกลุ่ม newly diagnosed และในตัวอย่างที่ได้มีการปนเปื้อนโปรตีนอัลบูมินรวมถึงคุณภาพการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งไม่ดีพออาจทำให้การแสดงออกของโปรตีนได้ผลที่ไม่ชัดเจนได้

ข้อเสนอแนะ

1. คัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษารั้งนี้
2. ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *OLFM4* และโปรตีน ATPB จากผู้ป่วยเด็กโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟบลาสท์รายอื่น

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ระหว่างโปรตีนภายในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับ พบว่าการแสดงออกโปรตีน ATPB ลดลงในเซลล์มะเร็งในไขกระดูกอาจเป็น protein biomarker ที่สามารถใช้ทำนายการเกิดภาวะ relapsed ในโรค ALL กลุ่ม very high-risk ได้

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธีจีโนมิกส์จากเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีโรคกลับพบว่าการแสดงออกของยีน Olfactomedin 4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

2-DE: 2 Dimension gel electrophoresis
ACTB: actin, beta protein
AFAM: Afamin
AMBP: Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor
ALL: Acute lymphoblastic leukemia
APOA1: Apolipoprotein A1
APOA4: Apolipoprotein A4
APOE: Apolipoprotein E
ATPB: ATP synthase subunit beta
BCR/ABL: breakpoint cluster region/Abelson gene
CATA: Catalase
CD: Cluster of differentiation
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CERU: Ceruloplasmin
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CLUS: Clusterin
DTT: Dithiothreitol
EBF1: Early B-cell factor 1 gene
GELS: Gelsolin
GOT2: Aspartate aminotransferase
GRIM-19: gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19 protein
hCG: human chorionic gonadotropin
HLA-DR: Human leukocyte antigen class II-DR
IKZF1: IKAROS family zinc finger 1 gene
LDH: Lactate dehydrogenase
MALDI: Matrix-assisted laser-desorption ionization
MALDI-ToF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MRD: Minimal residual disease
MXRA5: matrix-remodelling associated 5 gene
NF- κ B: nuclear factor κ B
NOD/SCID: Nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mouse
OLFM 4: Olfactomedin 4 gene

PAX5: paired box gene 5
PHB: Prohibitin
PRDX1: Peroxiredoxin-1
RNA: ribonucleic acid
RT-PCR: real-time polymerase chain reaction
S10A9: Protein S100-A9
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLP-1: Synaptotagmin-like protein 1
STAT: signal transducer and activator of transcription
TCF3: Transcription factor 3 gene
TEL/AML1: Ets variant gene 6/ Runt-related transcription factor 1 gene
TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TOF: Time of flight
TUBB1: Tubulin beta-1 chain
VPREB1: Pre-B lymphocyte gene 1
ZBP1: Z-DNA binding protein 1

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ The XXXIInd World Congress of the International Society of Hematology ในวันที่ 22 ตุลาคม 2551 ณ Bangkok Convention Centre at Central World กรุงเทพฯ
2. การเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ The 13th Congress of Asian Society for Pediatric Research ในวันที่ 6-8 ตุลาคม 2560 ณ The Hong Kong Academy of Medicine Jockey Club Building, Hong Kong
3. Manuscript entitled “An ATP synthetase beta subunit as a plausible biomarker to predict a relapsed disease in a very high-risk group of pediatric acute lymphoblastic leukemia.” ส่ง Journal of Clinical Proteomics (Under review)



Proteomic and Genomic Analysis of Leukemic Cells from Relapsed Childhood Early Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia with High Risk Features



Usanarat Anurathapan¹, Samart Pakakasama¹, Sumalee Tungpradubkul³,
Suwannee Chanprasertyothin², Suradej Hongeng^{1*}

¹Department of Pediatrics, and ²Research Center, Faculty of Medicine,
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand



Background

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children. With the modern therapy, children with ALL can achieve 80% disease free survival. Among relapsed patients, proteomic and genomic expression analyses may discover novel biomarkers to predict relapse in this group of patients.

Objectives

To analyze proteomic and genomic array expressions in diagnosis and relapsed leukemic samples from relapsed ALL patients and also to compare the proteomic profiles of these leukemic samples with normal marrow cells.

Methods

Bone marrow specimens were collected at the time of diagnosis and relapse. Leukemic cells or mononuclear cells from bone marrow specimens were separated by Ficoll[®]. Proteomic expression was performed by 2D gel electrophoresis. Their protein spots were analyzed by using MELANIE software and protein identifications were analyzed by MALDI-TOF. Genomic array expression was done by RNA microarray chip (GeneChip[®]).

Results

Two relapsed ALL patients were studied. Both patients were initially diagnosed with early pre-B ALL. The characteristic of these 2 patients are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of these 2 patients

Pt	Age at diagnosis (years)	Initial white blood cell count	Genetic study
1	3	205 x 10 ⁹ /L	TEL/AML1
2	13	140 x 10 ⁹ /L	BCR/ABL

Both patients had relapse at 18 and 4 months, after diagnosis, respectively.

There were no significant differences of spot intensity between paired diagnosis and relapsed samples in both patients.

Fourteen protein spots were significantly different between normal marrow and leukemic samples. However, only one protein, ACTB protein (actin beta protein) presenting in leukemic but not in normal marrow sample, can be identified. This protein interacts with phospholipase (PLD1) to regulate cell proliferation, vesicle trafficking and secretion.

Figure 1 Protein maps of normal bone marrow and leukemic cells. Spot 14 is the only one protein that can be identified.

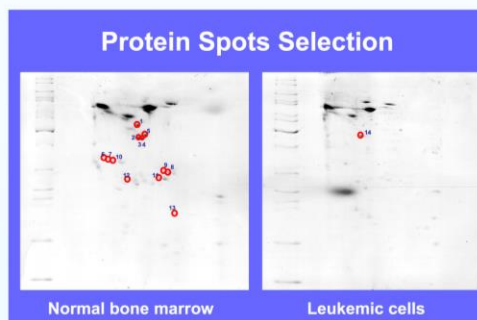


Table 2. The number of genes differently expressed more than 2 folds between diagnosis and relapsed leukemic samples.

p-value	Number of Genes		
	Total	Up-regulated	Down-regulated
<0.05	448	103	345
<0.001	210	87	123
<0.0001	31	10	21

For example, down-regulated genes; Caspase1 and proteoglycan 1 genes involving in cellular apoptosis and up-regulated genes; AF4/FMR2 family, member 3 and epithelial membrane protein 1 genes involving in oncogenesis, may be responsible for relapse among these patients.

Discussion and Conclusion

We will confirm our data by performing RQ-PCR of these significantly down-regulated and up-regulated (p<0.0001) genes in a larger number of ALL patients with high risk features especially high initial white blood cell counts. These findings may give us an information about the biological pathway of relapsed ALL patients with high risk features.

Acknowledgement: Our study was supported by research grant from the Thailand Research Fund (TRF) No. MRG5180134 and the Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University No.51022/ year2551

For more information please contact: Dr.Usanarat Anurathapan
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital,
Mahidol University Bangkok 10400, Thailand Tel: 662-201-1495,
6681-807-4799, E-mail: rauar@mahidol.ac.th



A plausible biomarker to predict relapsed disease in a very high-risk group of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL)



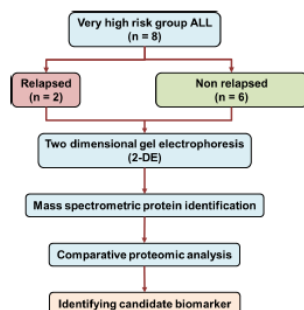
Chaiwat Rerkswattavorn, MD, Jirawan Panachan, Thitinee Vanichapol, PhD, Somchai Chutipongtanate, MD, PhD, Samart Pakakasama, MD, Suradej Hongeng, MD, Usanarat Anurathapan, MD
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, THAILAND.

*Correspondence: usanarat.anu@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric oncologic disease worldwide. While the incidence rate in Thailand was 2.88 per 100,000 children per year, the 5-year overall survival rate was 64.9%. Mortality usually related to relapsed disease. Predictive biomarker of relapsed ALL is therefore one of the unmet clinical needs. Proteomics is a promising technology for biomarker discovery by elucidating differential expression of 100-1,000 proteins between disease states and conditions. Proteomic profiling of relapsed and newly diagnosed leukemic cells of the very high risk group may provide predictive biomarkers of relapsed ALL in pediatric patients.

MATERIALS AND METHODS



RESULTS

	Relapsed n=2	Non-Relapsed n=6
Age of Diagnosed, y (Median)	6.7	6.4
Time to relapse, y (Median)	2.9	N/A
Initial WBC, x10 ⁹ /L (Median)	18.5	96.1
Flow cytometry		
B-cell	2	6
T-cell	0	0
Molecular genetic		
MLL arrangement	1	2
E2A-PBX1	0	2
Ph-chromosome	1	1

Table 1. Demographic data of pediatric patients diagnosed with very high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia at Department of Pediatrics Ramathibodi Hospital from 2008 to 2014.

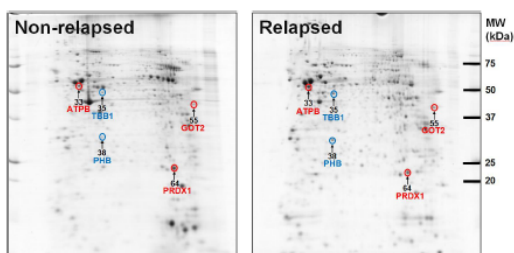


Figure 1. Representative gels of relapsed and non-relapsed group of very high risk childhood acute lymphoblastic leukemia showed significant differences in 5 spots of meaningful proteins (i.e., ATPB, ATP synthase subunit beta; TUBB1, Tubulin beta-1 chain; PHB, prohibitin; GOT2, Aspartate aminotransferase; PRDX1, Peroxiredoxin-1). Blue, increased expression in relapsed samples. Red, decreased expression in relapsed samples.

Spot Number	Gene name	Protein name	Expression in relapsed group	Biological function	Current evidences in leukemia
33	ATPB	ATP synthase subunit beta	Decrease	ATP biosynthetic process	A lower expression of ATP synthase in newly diagnosed or relapsed/refractory patients was associated with a shorter first remission duration or overall survival. (Kise K, et al. <i>PLoS One</i> . 2013; e83610.)
35	TUBB1	Tubulin beta-1 chain	Increase	Spindle assembly	Immunoprecipitation analyses verified the expression and cyclinization of TUBB1 in the total protein lysates of the tumor cell lines. (Jiang Z, et al. <i>World J Surg Oncol</i> . 2013; 260.)
38	PHB	Prohibitin	Increase	Negative regulation of cell proliferation	Prohibitin expression is increased in phorbol ester-treated chronic leukemic B-lymphocytes. (Woodcock TJ, et al. <i>Blood Cells Mol Dis</i> . 2001; 27.)
55	GOT2	Aspartate aminotransferase	Decrease	Cellular amino acid biosynthetic process	In many cancer cells, glutamine is the primary mitochondrial substrate and is required to maintain mitochondrial membrane potential and integrity as well as support of the NADPH production needed for redox control and macromolecular synthesis. (David R, et al. <i>Trends in biochemical sciences</i> . 2010; 427.)
64	PRDX1	Peroxiredoxin-1	Decrease	Cell proliferation	Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. (Lu C, et al. <i>Nat Chem Biol</i> . 2012; 486.)

Table 2. Potential proteomic finding and current evidence related to leukemia.

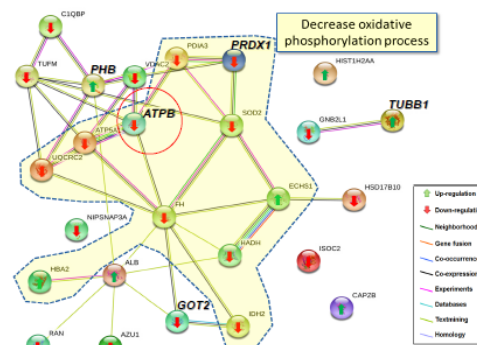


Figure 2. Protein network analysis using STRING v9.1 predicted the oxidative phosphorylation process was decreased by decreasing expression of ATP synthase subunit beta (ATPB), the protein involve in the enzyme complex of the inner mitochondrial membrane, which required for apoptosis process and energy metabolism.

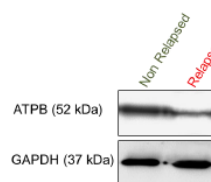


Figure 3. Validation of ATPB expression by Western blot analysis in very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia shows decreased expression of ATPB in relapsed group compared to non-relapsed group.

Conclusion

The results was consistent with previous studies in AML which showed the association between relapsed disease in acute myeloid leukemia and ATPB down regulation. This information defined a clinical value as a predictive marker of relapsed disease. The limitation of this study was a small sample sizes. Further validation study using an independent cohort is required to demonstrate clinical applicability of ATPB in very high risk childhood acute lymphoblastic leukemia.

An ATP synthetase beta subunit as a plausible biomarker to predict a relapsed disease in a very high-risk group of pediatric acute lymphoblastic leukemia.

Chaiwat Rerkswattavorn, MD¹ (chaiwat.re@wu.ac.th), **Jirawan Panachan, MSc²** (jirawan.pan@mahidol.ac.th), **Thitinee Vanichapol, PhD²** (thitinee.van@mahidol.ac.th), **Wararat Chiangjong, PhD²** (wararat.chi@mahidol.ac.th), **Somchai Chutipongtanate, MD, PhD²** (somchai.chu@mahidol.ac.th), **Samart Pakakasama, MD²** (samart.pak@mahidol.ac.th), **Suradej Hongeng, MD²** (suradej.hon@mahidol.ac.th), **Usanarat Anurathapan, MD^{*2}** (usanarat.anu@mahidol.ac.th)

¹School of Medicine, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand

²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital,
Mahidol University, Bangkok, Thailand

***Corresponding author**

Usanarat Anurathapan, MD

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol
University, Bangkok, Thailand, 10400

E-mail: usanarat.anu@mahidol.ac.th, Tel: 6681-807-4799

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia; Biomarker; Bone marrow; Proteomic profiles; Relapsed disease

Abstract

Relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL) considers the most fatal complication of the ALL disease. The aim of this study is to analyze the differences of the proteomics profiles of relapsed leukemic cells with newly diagnosed leukemic cells to identify pretreatment candidate proteomic biomarkers to predict clinical relapse in the future. Bone marrow samples of a very high-risk group of ALL patients were collected and categorized into two groups (relapsed vs. newly-diagnosed) and then submitted to perform proteomic analysis. This study supports ATP synthase subunit beta (ATPB) as a candidate biomarker of relapsed disease in the very high-risk ALL.

Main text

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric oncologic disease worldwide. The incidence rate in Thailand was 2.88 per 100,000 children per year and 5-year overall survival rate was 64.9% [1, 2]. Mortality usually related to relapsed disease [3]. Predictive biomarker of relapsed ALL is therefore one of the unmet clinical needs. Proteomics is a promising technology for biomarker discovery by elucidating differential expression of 100-1,000 proteins between disease states and conditions [4, 5]. In this study, proteomic profiling of relapsed and newly diagnosed leukemic cells of the very high-risk group may provide predictive biomarkers of relapsed ALL in pediatric patients.

We enrolled pediatric ALL patients diagnosed during 2008-2014 at Ramathibodi Hospital. Very high-risk ALL patients whose bone marrow samples had collected were included, while those with poor quality of bone marrow samples were excluded. Clinical information, including dates (birth, diagnosis, relapse and last follow up), disease status (initial WBC count, serum lactate dehydrogenase, immunophenotype, molecular genetics, cytogenetic and organ involvement) and chemotherapy protocols was collected. Samples of the very high-risk group ALL patients were categorized into two groups according to their disease statuses (relapsed vs. newly-diagnosed) and then submitted to perform proteomic analysis, consisted of 2-D gel electrophoresis (2-DE), protein spot matching, in-gel tryptic digestion, MALDI-TOF/TOF protein identification, protein network analysis and validation using western blot analysis.

A total of 195 ALL cases were enrolled. Among these, 14 cases were classified as the very high-risk group. Only 8 bone marrow samples were qualified for proteomic analysis, which then divided into relapsed and newly-diagnosed groups (2

relapsed and 6 newly-diagnosed). Proteomic analysis showed 3 protein spots; later identified as ATP synthase subunit beta (ATPB), Tubulin beta-1 chain (TUBB1) and prohibitin (PHB); had significantly different intensities between relapse and newly-diagnosed group ($p < 0.05$) (**Figure 1**) (**Supplement material**) and had pattern of protein expressions same as previous reports related to leukemia (**Table 1**) [6, 7, 8].

From the protein network analysis, the function of proteins found in this study related to oxidative phosphorylation process which decreased because of variable protein expression (**Figure 2**). Oxidative phosphorylation process is the regulator of energetic metabolism and this process requires subunits of ATP synthase to achieve this function [9, 10, 11]. It has been documented that the decrease expression of ATPB is associated with chemotherapy resistant in some leukemia (e.g. AML and CML) [6, 12]. Our results show consistency with the results of a previous study which showed a decreased protein expression of ATPB in the relapsed group compared to the newly diagnosed group, so this protein can be the preliminary biomarker to predicted clinical relapsed in the very high-risk group ALL. Of these, the decreased expression of ATPB was validated by western immunoblotting (**Supplement material**).

This study is the preliminary report because of small sample size and unbalance between newly diagnosis group ($n=6$) and relapsed group ($n=2$). The result in this study, the decreased expression of ATPB in the relapsed group of very high-risk ALL, is same as the previous study as mentioned earlier. So, this study employs proteomic analysis to elucidate ATPB as a candidate biomarker of relapsed disease. Further validation study using an independent cohort is required to demonstrate a clinical applicability of ATPB in the very high-risk group of pediatric ALL.

Abbreviations

2-DE: 2 Dimension gel electrophoresis

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

AML: Acute myeloid leukemia

ATPB: ATP synthase subunit beta

CML: Chronic myeloid leukemia

MALDI: Matrix-assisted laser-desorption ionization

PHB: Prohibitin

TOF: Time of flight

TUBB1: Tubulin beta-1 chain

WBC: White blood cell

Declarations

Ethic approval

The Committee on Human Rights Related to Research Involving Human Subjects, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University approved this research; ID 05-50-16

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

The Thailand Research Fund provides the funding for this research; MRG5180134.

Authors' contribution

CR: plan the experiment, performing proteomic analysis process, writing of the manuscript and discussion of results. JP: obtaining of bone marrow sample and performing proteomic analysis process. TV: obtaining of bone marrow sample and performing proteomic analysis process. WC: performing proteomic analysis process and discussion of results. SC: discussion of results. SP: discussion of results. SH: discussion of results. UA: plan the experiment, selection of patients, writing of the manuscript and discussion of results. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University for providing BM samples.

References

1. Wiangnon S, Kamsa-Ard S, Jetsrisuparb A, et al. Childhood cancer in Thailand: 1995-1997. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003; 4:337-43.
2. Wiangnon S, Veerakul G, Nuchprayoon I, et al. Childhood cancer incidence and survival 2003–2005, Thailand: study from the Thai Pediatric Oncology Group *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011; 12:2215–2220.
3. Seoyeon C, Michelle J, Edward K, et al. Relapse in children with acute lymphoblastic leukemia involving selection of a preexisting drug-resistant subclone. *Blood* 2007; 110:639-639.
4. Raoul T, YiHua Q, Yiling L, et al. Reverse phase protein array: validation of a novel proteomic technology and utility for analysis of primary leukemia specimens and hematopoietic stem cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:2512–21.
5. Maria B, George I, Konstantinos V, et al. Protein biomarkers distinguish between high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. *J Hematol Oncol* 2013; 6:52.
6. Xiao X, Yang J, Li R, et al. Dereglulation of mitochondrial ATPsyn - β in acute myeloid leukemia cells and with increased drug resistance. *PLoS One*. 2013; 8:e83610. doi: 10.1371/journal.pone.0083610.
7. Raza Faizan, et al. Role of beta tubulin in leukemia progression. *J Biotechnol Biomater* 2014; 3: 198.
8. Timothy J, Gabor B, George B, et al. Prohibitin Expression Is Increased in Phorbol Ester-Treated Chronic Leukemic B-Lymphocytes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001;27:27-34.
9. Dey R, Moraes C. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate

- the protective effect of Bcl-x (L) in osteosarcoma cells. *J Bio Chem* 2000; 275: 7087–7094.
10. Harris M, Vander M, Kron S, et al. Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3590–3596.
 11. Matsuyama S, Xu Q, Velours J, et al. The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1998; 1: 327–336.
 12. Li RJ, Zhang GS, Chen YH, et al. Downregulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann Oncol* 2010; 7: 1506–1514.

Figure legends

Figure 1. Representative gels of the newly diagnosed group and the relapsed group of the very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemic cells showed altered protein spot intensities in 3 spots of meaningful proteins (ATPB, ATP synthase subunit beta; TUBB1, Tubulin beta-1 chain; PHB, prohibitin). **Blue**, increased expression in relapsed samples. **Red**, decreased expression in relapsed samples.

Figure 2. Protein network analysis using STRING v9.1 predicted the oxidative phosphorylation process was decreased by decreasing expression of ATP synthase subunit beta (ATPB), the protein involves in the enzyme complex of the inner mitochondrial membrane, which required for energy metabolism.

Table legends

Table 1. Potential proteomic findings with current evidences related to leukemia and the comparison between protein expressions in literature review and this study. There were 3 protein expression consistent with literature reviews, i.e. ATPB, TUBB1 and PHB.

Supplement material

Figure Validation of ATPB expression by Western blot analysis shows decreased expression of ATPB in relapsed group when compared to newly-diagnosed group.

Table Summary of significant altered proteins in relapsed group compared to newly-diagnosed group.

Figure 1. Representative gels of the newly diagnosed group and the relapsed group of the very high-risk childhood acute lymphoblastic leukemic cells showed altered protein spot intensities in 3 spots of meaningful proteins (ATPB, ATP synthase subunit beta; TUBB1, Tubulin beta-1 chain; PHB, prohibitin). **Blue**, increased expression in relapsed samples. **Red**, decreased expression in relapsed samples.

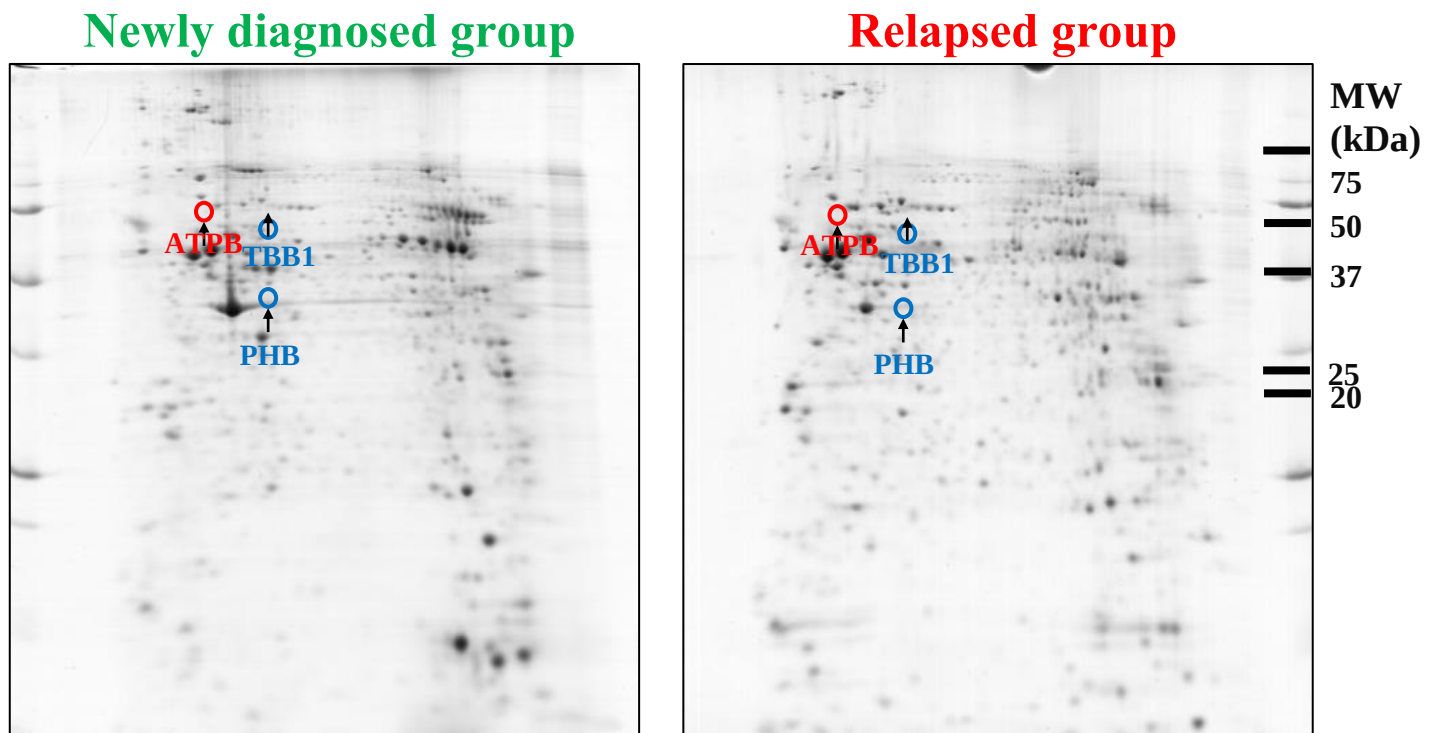


Figure 2. Protein network analysis using STRING v9.1 predicted the oxidative phosphorylation process was decreased by decreasing expression of ATP synthase subunit beta (ATPB), the protein involves in the enzyme complex of the inner mitochondrial membrane, which required for energy metabolism.

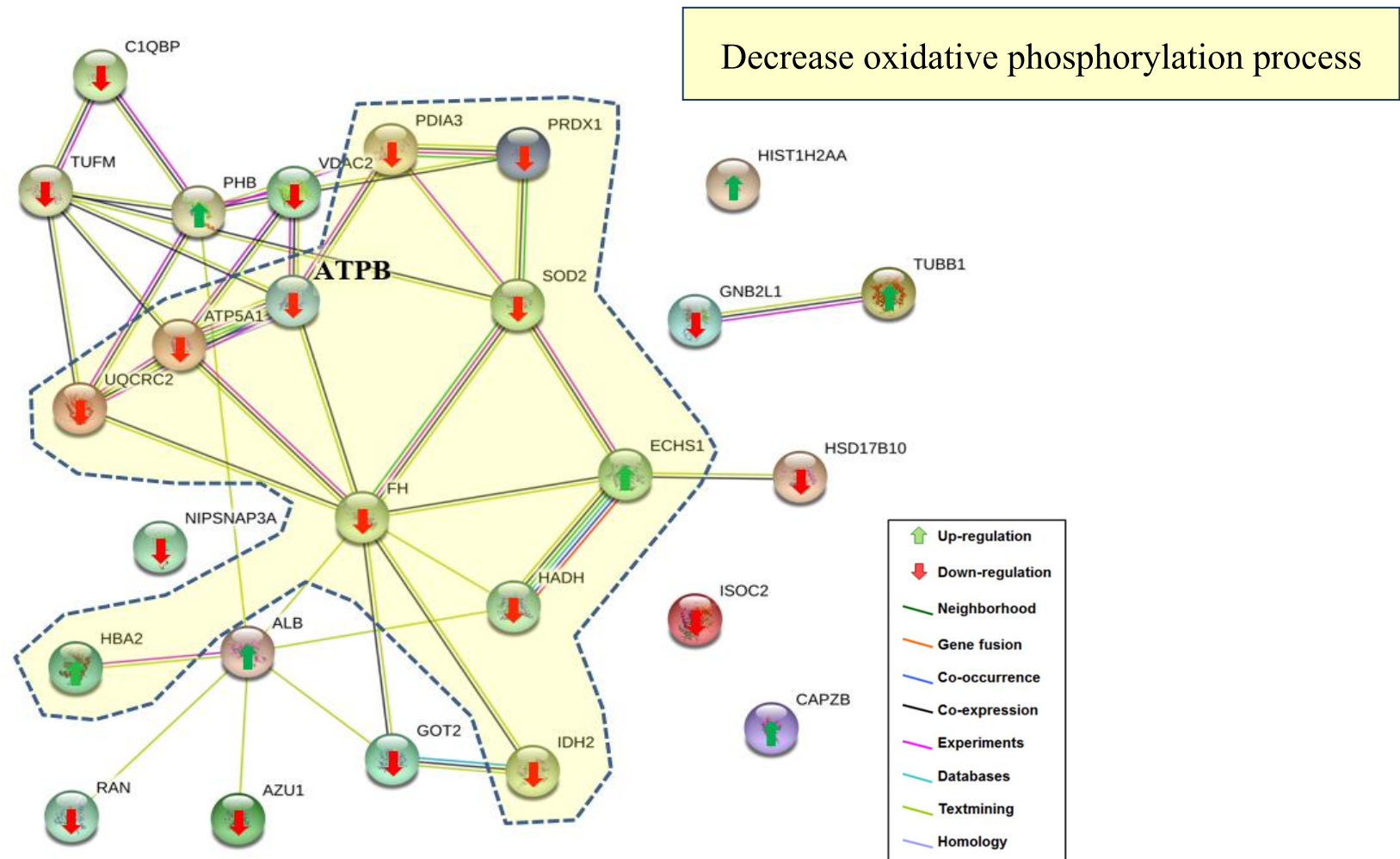
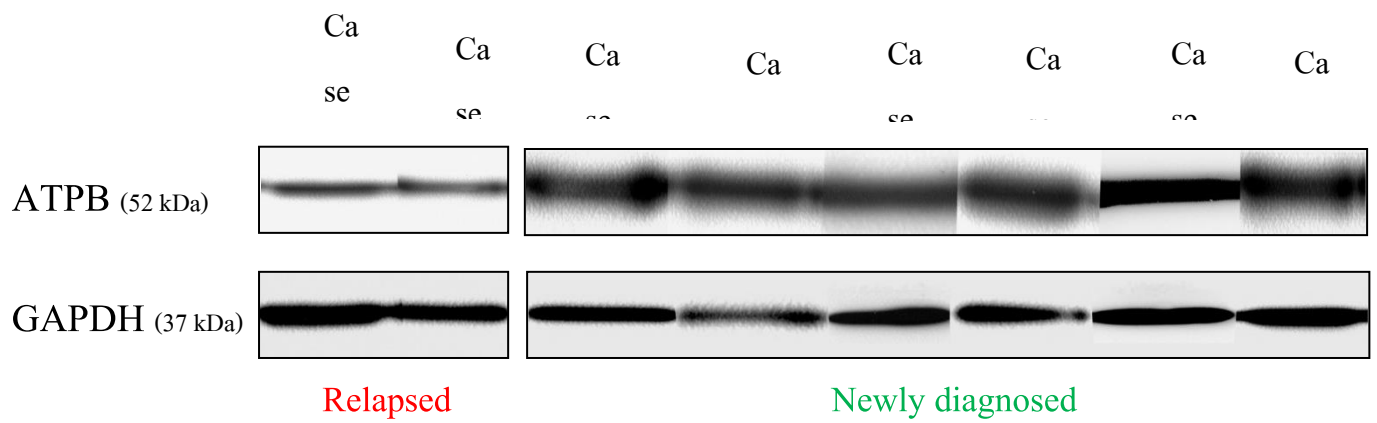


Table 1. Potential proteomic findings with current evidences related to leukemia and the comparison between protein expressions in literature review and this study. There were 3 protein expression consistent with literature reviews, i.e. ATPB, TUBB1 and PHB.

Gene name	Protein name	Biological function	Expression in relapsed group of previous studies	Expression in relapsed group of this study
ATPB	ATP synthase subunit beta	ATP biosynthetic process	Decrease [6]	Decrease
TUBB1	Tubulin beta-1 chain	Microtubules regulation	Increase [7]	Increase
PHB	Prohibitin	Negative regulation of cell proliferation	Increase [8]	Increase

Supplement figure Validation of ATPB expression by Western blot analysis shows decreased expression of ATPB in relapsed group when compared to newly diagnosed group.



Supplement table Summary of significant altered proteins in relapsed group compared to newly-diagnosed group.

Protein name	MS/MS identification score	% Coverage	Peptides matched	pI	MW (kDa)	Mean $\pm$ SEM		Ratio (Relapsed/Newly diagnosed)	p-value
						Relapse group	Newly diagnosed group		
ATP synthase subunit beta (ATPB)	61	2	1	5.26	56.525	0.1087 $\pm$ 0.0092	0.6451 $\pm$ 0.0476	0.16853	0.00084
Prohibitin (PHB)	316	20	4	5.57	19.843	0.2748 $\pm$ 0.0117	0.1855 $\pm$ 0.0195	1.48089	0.04869
Tubulin beta-1 chain (TBB1)	70	2	1	5.05	50.865	0.1058 $\pm$ 0.0117	0.0305 $\pm$ 0.0131	3.46117	0.02263