การเพาะเลี้ยงเซลล์จากน้ำในช่องปอดคนไข้มะเร็งนอกร่างกายสำหรับการแพทย์เฉพาะบุคคล

Primary Ex Vivo Cell Culture Derived from Malignant Pleural Effusion for Personalized Medicine

ปัทมา วงศ์ศิริศิลป์[1*], สุรีพร นวลแก้ว[1], อุษณีย์ พรหมประกอบ[2]

Pattama Wongsirisin[1*], Sureeporn Nualkaew[1], Usanee Promprakob[2]

[1*]นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัย ถ่ายทอดและสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร 10400

[2]นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญการพิเศษ กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร 10400

[1]Medical scientist Practitioner Level, Research division, National Cancer Institute, Bangkok, 10400

[2]Medical scientist Senior Professional, Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok, 10400

Corresponding Author: *E-mail : wongsiri.patt@gmail.com

(Received: 19 September 2022 Revised: 10 November 2022 Accepted: 13 December 2022)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บจากผู้ป่วยมะเร็ง และนำไปใช้ทดสอบผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งแต่ละบุคคลนอกร่างกาย

รูปแบบและวิธีวิจัย : เก็บน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากผู้ป่วยมะเร็งที่เข้ารับการรักษาตัวที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างเดือนมกราคม-มิถุนายน 2565 ยืนยันผลการพบเซลล์มะเร็งโดยวิธีการตรวจทางเซลล์วิทยา และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 20% Fetal bovine serum ทดสอบการตอบสนองต่อยานอกร่างกายด้วยวิธี MTT assay

ผลการศึกษา : ผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 8 ราย ประกอบด้วย มะเร็งปอด 2 ราย และมะเร็งเต้านม 6 ราย ปริมาณน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บได้ 3-40 มิลลิลิตร พบว่ามีเซลล์มะเร็งจำนวน 5 ราย (62.5%) โดยยืนยันจากการตรวจทางเซลล์วิทยาและสามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้ทั้ง 5 ราย ผลการทดสอบของเซลล์ต่อยา Cisplatin พบว่าเซลล์ของผู้ป่วยแต่ละรายมีอัตราการตอบสนองแตกต่างกัน โดยมีผู้ป่วย 1 รายมีแนวโน้มตอบสนองได้ดีต่อยา ขณะที่ 1 รายมีแนวโน้มไม่ตอบสนองต่อยา

สรุปผลการศึกษา : สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บจากผู้ป่วยมะเร็ง นำไปใช้ในการทดสอบการตอบสนองต่อยาและการพัฒนายา

คำสำคัญ : น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด, การเพาะเลี้ยงเซลล์, โรคมะเร็ง, การตอบสนองต่อยา, การแพทย์เฉพาะบุคคล

ABSTRACT

Objective : To determine the sensitivity to anticancer drug in a model of primary cell culture obtained from malginant pleural effusion (MPE).

Method : The MPEs of cancer patients were obtained by thoracentesis at the National Cancer Institute of Thailand between January and June 2022. Cytology test was used to diagnosed cancer. Cells were cultured in DMEM media supplemented with 20% fetal bovine serum in 6-cm cell culture plates. Ex vivo sensitivity to anti-cancer drugs was analyzed using MTT assay.

Result : 8 MPEs from 2 lung cancer patients and 6 breast cancer patients were collected in this study (Volume 3-40 mL). Five patients (62.5%) had positive cytology whereas three patients (37.5%) had negative cytology. Interestingly, primary cell culture was successfully established from 5 out of 5 patients with positive cytology. The degree of sensitivity to cisplatin varied from person to person. 1 patient was classified as good responders whereas 1 patient had no response to this drug.

Conclusion : The established primary cell culture from pleural effusion could serve as a valuable tool for drug screening and drug development.

Keyword : pleural effusion, primary cell culture, cancer, drug response, personalized medicine

บทนำ

การแยกเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งโดยการเก็บชิ้นเนื้อขนาดเล็ก (Tissue biopsy) เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Primary cell culture) และทดสอบการตอบสนองหรือดื้อต่อยาในห้องปฏิบัติการถือเป็นโมเดลที่สำคัญสำหรับการแพทย์แม่นยำ (Precision medicine) หรือการแพทย์เฉพาะบุคคล (Personalized medicine)[1,2] ที่มีเป้าหมายในการเลือกยาที่ผู้ป่วยแต่ละรายมีแนวโน้มในการตอบสนองได้ดีที่สุด[3,4] แต่การเก็บชิ้นเนื้อเพียงชิ้นเล็กๆ จากส่วนใดส่วนหนึ่งของก้อนมะเร็ง รวมถึงการแยกเซลล์มะเร็งให้เหลือเพียงชนิดเดียวโดยการกำจัดส่วนขององค์ประกอบนอกเซลล์มะเร็ง (Tumor microenvironment) ทำให้สภาพแวดล้อมของเซลล์มะเร็งที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างจากสภาวะจริงในร่างกายของผู้ป่วย ซึ่งองค์ประกอบนอกเซลล์มะเร็งนั้นมีส่วนสนับสนุนให้เซลล์มะเร็งมีการพัฒนามากขึ้น ทั้งแง่ของการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[5] และการตอบสนองหรือดื้อต่อยา[6,7] ผลการทดสอบที่ได้จึงสามารถแตกต่างจากการตอบสนองต่อยาในร่างกายของคนไข้ด้วยเช่นกัน

ภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมากเกิน (Pleural effusion) คือ การมีของเหลวในพื้นที่ระหว่างเยื่อหุ้มปอดและเยื่อหุ้มช่องอกมากกว่าปกติ เกิดได้จากหลายเหตุ เช่น โรคหัวใจ โรคไต การอักเสบจากสาเหตุต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็งทั้งมะเร็งของเยื่อหุ้มปอดเองและมะเร็งที่แพร่กระจายมายังช่องเยื่อหุ้มปอด[8] สถิติในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า ภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่มากเกินพบในผู้ป่วยมะเร็ง (Malignant pleural effusion) 125,000 รายต่อปี โดยมะเร็งที่พบมีว่ามีอุบัติการณ์เกิดภาวะนี้ส่วนใหญ่เป็นมะเร็งจากอวัยวะอื่นๆ ที่แพร่กระจายมายังช่องเยื่อหุ้มปอด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งปากมดลูก[9] ผู้ป่วยมักมีอาการไอ หายใจลำบาก และเจ็บหน้าอกขณะหายใจ เนื่องจากปอดถูกกดทับจากน้ำที่มากเกิน แพทย์มักทำการระบายน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดออกเพื่อบรรเทาอาการ เรียกวิธีการนี้ว่า Thoracentesis[10] น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บจากผู้ป่วยมะเร็งจะถูกส่งตรวจทางเซลล์วิทยาเพื่อการวินิจฉัยมะเร็ง ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีหรือการตรวจทางจุลชีววิทยาในกรณีที่สงสัยการติดเชื้อร่วมด้วย หลังจากวินิจฉัยและยืนยันผลเซลล์มะเร็งเสร็จสิ้น น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดส่วนที่เหลือจะถูกทำลาย

น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่มีสาเหตุจากการแพร่กระจายของมะเร็งประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด[11] ทั้งเซลล์มะเร็งรวมถึงเซลล์ที่เป็นสิ่งแวดล้อมของมะเร็ง เช่น เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน activated mesothelial cells รวมถึงโปรตีนต่างๆ ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์เหล่านี้ เช่น growth factor หรือ cytokine ดังนั้นน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดถือว่าเป็นสิ่งส่งตรวจที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเป็นแบบจำลองในการทดสอบการตอบสนองต่อยานอกร่างกาย[12-14] ดังนั้น งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งหวังในการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยมะเร็งและใช้เซลล์เหล่านี้ในการทดสอบการตอบสนองต่อยา ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้นับว่าเป็นการใช้สิ่งส่งตรวจของคนไข้ที่มีอยู่แล้วให้เกิดประโยชน์ต่อคนไข้มากยิ่งขึ้น เซลล์ที่แยกได้สามารถนำมาใช้ศึกษาความรุนแรงของโรคและช่วยแพทย์ในการเลือกยาที่เหมาะสมให้กับคนไข้มะเร็งแต่ละบุคคลสำหรับการแพทย์แม่นยำ

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บจากผู้ป่วยมะเร็ง และนำไปใช้ทดสอบผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งแต่ละบุคคลนอกร่างกาย

รูปแบบและวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ได้จากผู้ป่วยมะเร็งที่มีแผนการเจาะเก็บน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติระหว่างเดือนมกราคม-มิถุนายน 2565 และอาสาสมัครลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Informed consent) โครงการวิจัยชิ้นนี้ผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการทบทวนจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เลขที่ 013/2564

2. การเก็บและการขนส่งตัวอย่าง น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากผู้ป่วยมะเร็งเก็บในขวดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร โดยไม่เติมสารใดๆ จากห้องเก็บสิ่งส่งตรวจสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ไปยังห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา เพื่อยืนยันเซลล์มะเร็ง และส่งมายังห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับแยกเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการแยกเซลล์จากสิ่งส่งตรวจภายใน 24 ชั่วโมง หากยังไม่ทำการแยกทันทีจะเก็บสิ่งส่งตรวจที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การแยกเซลล์และเพาะเลี้ยงเซลล์จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด นำน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดใส่ในหลอดทดลองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนตะกอนเซลล์กับของเหลวและพลาสมา ล้างส่วนตะกอนโดย 2% Fetal Bovine Serum (FBS)/ Phosphate Buffer Saline (PBS) จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ตามความหนาแน่นในน้ำยา Lymphoprep™ เซลล์ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี Trypan blue dye exclusion ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 20% fetal bovine serum และยาต้านจุลชีพชนิด penicillin/streptomycin ในภาชนะเพาะเลี้ยงขนาด 6 เซนติเมตร นำไปบ่มในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ในตู้ CO_2 incubator เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเติบโตมากกว่าร้อยละ 80 จึงจะทำการทดลองและแบ่งเซลล์เพื่อแช่แข็งไว้เพื่อทำการศึกษาต่อไป

4. การยืนยันผลเซลล์มะเร็ง น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดยืนยันการพบเซลล์มะเร็งที่งานเซลล์วิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

5. การทดสอบผลของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์ในรูปแบบสองมิติด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromine (MTT assay) วิธี MTT assay เป็นการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตกล่าวคือเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโทรคอนเดียร์ต่อการรีดิวส์ tetrazodium ไปเป็นผลึก formazan ที่ให้สีม่วง

นำเซลล์ที่แยกได้จากผู้ป่วยใน passage (การแบ่งเซลล์ที่เจริญเติบโตได้ 80-100% ของภาชนะเพื่อเพาะเลี้ยงในภาชนะและอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่) ที่ 2, 3 และ 4 เพาะเลี้ยงใน 96 well plates จำนวน 4,000 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาเคมีบำบัด Cisplatin ที่ความเข้มข้น 0-30 ไมโครโมลาร์ แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเติม MTT-dye solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร แล้วบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด แล้วเติม DMSO ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA reader (ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้ 630 นาโนเมตรเป็นตัวอ้างอิง)

คำนวณค่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Survival) เทียบกับหลุมที่เป็นชุดควบคุม โดยกำหนดให้ชุดควบคุมมี %Survival เป็น 100%

$$\%\ \text{Survival} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ย OD จากหลุมควบคุม}}$$

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์แบบสถิติเชิงพรรณนาในการคำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ศึกษา ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลอาสาสมัครผู้ป่วยมะเร็งที่เข้ารับการเก็บน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด

น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดในการศึกษานี้ได้เก็บจากผู้ป่วยมะเร็ง 8 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 6 ราย แบ่งเป็นชนิดมีการแสดงออกของฮอร์โมนรีเซปเตอร์ (Hormone receptor; HR) 3 ราย และชนิดไม่มีการแสดงออกของฮอร์โมนรีเซปเตอร์และเฮอร์ทูรีเซปเตอร์ (Triple Negative Breast Cancer; TNBC) 1 ราย โดยผู้ป่วยอีก 2 รายไม่มีรายงานชนิดของมะเร็ง ผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้ง 2 รายเป็นชนิดเซลล์ไม่เล็ก (Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC) อาสาสมัครเป็นเพศหญิงทั้งหมด อายุเฉลี่ย 59 ปี (45-77 ปี) ระยะเวลาตั้งแต่การตรวจพบมะเร็งตำแหน่งแรกจนเกิดภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเกินอยู่ที่ 0-18 ปี (เฉลี่ย 7.25 ปี) เป็นผู้ป่วยในระยะท้าย (ระยะที่ 4) และผู้ป่วย 7 รายเคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด มีผู้ป่วยรายที่ 8 เพียงรายเดียวที่ไม่เคยผ่านการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด รายละเอียดของอาสาสมัครแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลอาสาสมัครผู้ป่วยมะเร็ง 8 รายในโครงการวิจัย

ลำดับที่	เพศ	อายุ	มะเร็งตำแหน่งแรก	ชนิดของมะเร็ง	ปีที่พบมะเร็งครั้งแรก	ระยะ	ประวัติการรักษาด้วยยา/ชนิดยาที่เคยได้รับ
1	หญิง	65	เต้านม	HR+	2548	4	FAC, Paclitaxel
2	หญิง	77	ปอด	NSCLC	2547	4	Erlotinib (EGFR - del 19)
3	หญิง	56	เต้านม	HR+	2559	4	AC, Paclitaxel, Capecitabine
4	หญิง	50	เต้านม	NR	2559	4	AC, Paclitaxel, Capecitabine, Docetaxel
5	หญิง	57	เต้านม	NR	2562	4	AC , Paclitaxel, Capecitabine, Docetaxel
6	หญิง	48	เต้านม	TNBC	2563	4	AC, Paclitaxel, Capecitabine
7	หญิง	45	เต้านม	HR+	2559	4	FAC,Capecitabine
8	หญิง	66	ปอด	NSCLC	2565	4	ไม่เคยรับยา

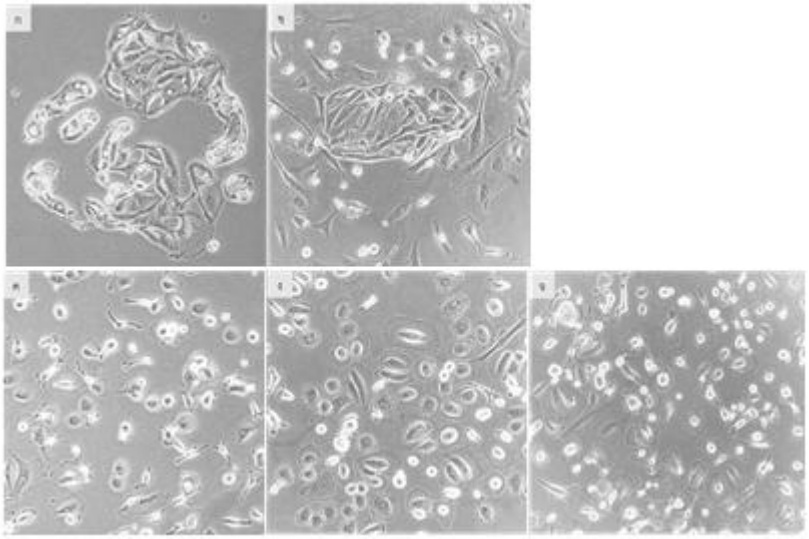
หมายเหตุ HR (Hormone receptor), TNBC (Triple negative breast cancer), NSCLC (Non-small cell lung cancer), NR (No Record), AC (Doxorubicin, Cyclophosphamide), FAC (Doxorubicin, Cyclophosphamide, 5-FU)

2. เซลล์เพาะเลี้ยงที่แยกได้จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด

ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งส่งตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยมะเร็ง แสดงในตารางที่ 2 จากการยืนยันทางเซลล์วิทยาพบว่า มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย 5 รายจากจำนวน 8 ราย ที่ยืนยันพบเซลล์มะเร็ง แบ่งเป็น ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 3 ราย และผู้ป่วยมะเร็งปอด 2 ราย ปริมาณน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ทำการปั่นแยกเซลล์มีปริมาณ 3-40 มิลลิลิตร (เฉลี่ย 27.25 มิลลิลิตร) เวลาที่ทำการปั่นแยกเซลล์หลังจากเก็บสิ่งส่งตรวจอยู่ที่ 0-15 ชั่วโมง สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้โมเดลการเพาะเลี้ยงแบบสองมิติในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 20% FBS ในห้องปฏิบัติการสำเร็จ 5 ราย เป็นผู้ป่วยที่ยืนยันพบเซลล์มะเร็งทั้งหมด เซลล์ที่แยกได้มีรูปร่างดังแสดงในรูปที่ 1 โดยเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งปอดมีลักษณะปลายเรียวแหลม โตในลักษณะเกาะกลุ่ม และเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจะมีลักษณะการโตแบบกระจายตัว ผู้ป่วยมะเร็งปอดลำดับที่ 2 พบว่า เซลล์มีการแบ่งตัวได้ 2 passage และหยุดการแบ่งตัวตายไป ดังนั้น จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ครบถ้วนตามกำหนด อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมต่อรอบการแบ่งตัว (Passage) อยู่ที่ 7 วัน และมะเร็งปอด 14 วัน ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 เซนติเมตร ระยะเวลาที่เซลล์สามารถแบ่งตัวจนมีปริมาณเซลล์ที่เพียงพอในการทดสอบการตอบสนองต่อยาอยู่ที่ 7-14 วัน

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งส่งตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยมะเร็ง

ลำดับที่	ผลยืนยันพบเซลล์มะเร็งทางเซลล์วิทยา	ปริมาณ (มิลลิลิตร)	ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเซลล์หลังการเก็บ (ชั่วโมง)	ผลการเพาะ	ได้รับการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ตอบสนองต่อยา
1	ไม่พบ	17	15	ไม่สำเร็จ	✗
2	พบ	3	2	สำเร็จ	✗
3	พบ	22	15	สำเร็จ	✓
4	พบ	38	0	สำเร็จ	✓
5	ไม่พบ	40	15	ไม่สำเร็จ	✗
6	ไม่พบ	36	0	ไม่สำเร็จ	✗
7	พบ	27	0	สำเร็จ	✓
8	พบ	35	15	สำเร็จ	✓



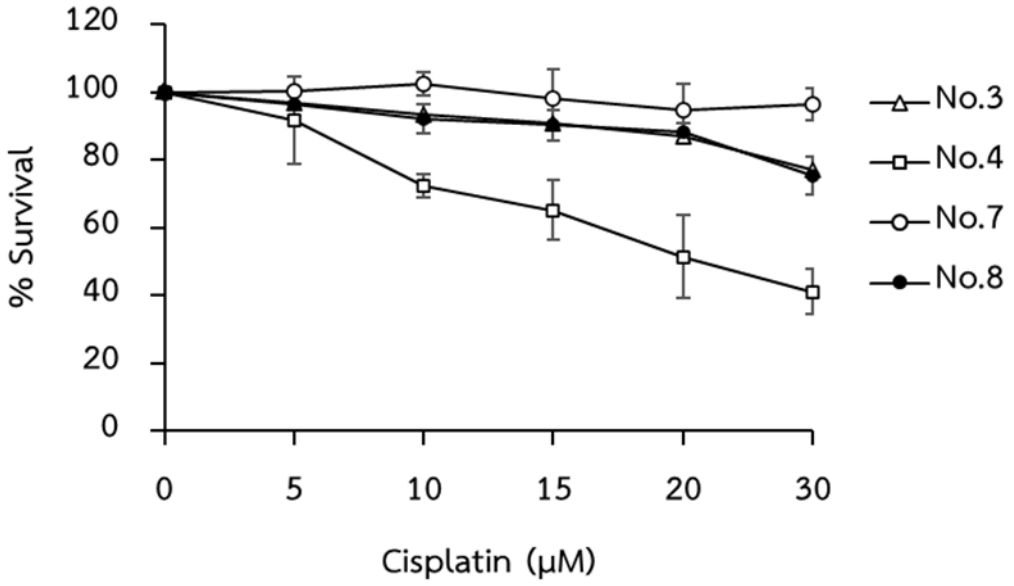
รูปที่ 1 ภาพแสดงตัวอย่างเซลล์ที่แยกได้จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยมะเร็งเพาะเลี้ยง (Passage 1) ผู้ป่วยมะเร็งปอด (ก) ลำดับที่ 2 (ข) ลำดับที่ 8 ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (ค) ลำดับที่ 3, (ง) ลำดับที่ 4 และ (จ) ลำดับที่ 7 (กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x)

3. การตอบสนองของเซลล์ที่แยกได้จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยเร็งต่อยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin

ผลของยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แยกได้จากผู้ป่วยใน passage ที่ 2 , 3 และ 4 ของผู้ป่วยมะเร็ง 4 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยลำดับที่ 3, 4, 7 ซึ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และ 8 ซึ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอด ทดสอบโดยวิธี MTT assay จะแสดงโดยใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีอัตราการตายร้อยละ 50 (IC50) และ ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีอัตราการตายร้อยละ 20 (IC20) เมื่อทำการบ่มยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin ความเข้มข้น 0-30 ไมโครโมลาร์ กับเซลล์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่าผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดแตกต่างกันไป โดยสามารถแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มที่มีแนวโน้มในการตอบสนองต่อยา cisplatin ดี ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 4 มีค่า IC20 เท่ากับ 7.0±1.0 ไมโครโมลาร์ และ IC50 เท่ากับ 22.0±5.5 ไมโครโมลาร์ กลุ่มที่สองมีแนวโน้มในการตอบสนองต่อยา cisplatin ปานกลาง ได้แก่ผู้ป่วยรายที่ 3 และ 8 มีค่า IC20 เท่ากับ 27.0±6.4 ไมโครโมลาร์ และ 27.0±3.8 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แม้ไม่สามารถหาค่า IC50 ได้ที่ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการทดลอง แต่มีแนวโน้มการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยา กลุ่มที่สาม มีแนวโน้มจะมีการดื้อยา Cisplatin ได้แก่ ผู้ป่วยรายที่ 7 พบว่าไม่สามารถหาค่า IC20 และ IC50 ได้ที่ความเข้มข้นของยา Cisplatin 30 ไมโครโมลาร์ แสดงดังรูปที่ 2

ผู้ป่วยมะเร็งที่เข้าร่วมงานวิจัยนี้ ได้รับการรักษาโดยการให้ยาตามแนวทางเวชปฏิบัติการรักษาที่มีตัวยาแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำผลของการให้ยา Cisplatin ทางคลินิกมาเปรียบเทียบได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาเบื้องต้นนี้สามารถนำไปต่อยอดสำหรับการพัฒนาการใช้เซลล์ของผู้ป่วยเพื่อทดสอบการตอบสนองต่อยาสำหรับการแพทย์เฉพาะบุคคลในอนาคต



รูปที่ 2 การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin ความเข้มข้น 0-30 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay

อภิปรายผลการศึกษา

การแพทย์แม่นยำหรือการแพทย์เฉพาะบุคคลเป็นที่สนใจของวงการแพทย์ทั่วโลกในปัจจุบันและเป็นความหวังของผู้ป่วยในการได้รับการรักษาโดยอาศัยข้อมูลเฉพาะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยแต่ละรายในการเลือกการรักษาอย่างเฉพาะเจาะจง[15] การแยกเซลล์จากผู้ป่วยเพื่อทดสอบการตอบสนองต่อยาเป็นทางเลือกหนึ่งของงานวิจัยการแพทย์แม่นยำ การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นโดยทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งส่งตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บได้จากผู้ป่วยมะเร็งเพื่อทดสอบผลการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดนอกร่างกาย มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยแพทย์ในการเลือกใช้ยาที่ผู้ป่วยมะเร็งมีแนวโน้มในการตอบสนองดีที่สุด

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากผู้ป่วยมะเร็ง 8 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยมะเร็งปอด 2 รายและมะเร็งเต้านม 6 ราย ให้ผลยืนยันพบเซลล์มะเร็งทางเซลล์วิทยา 5 ราย (62.5%) โดยผู้ป่วยมะเร็งปอดทั้ง 2 รายให้ผลพบเซลล์มะเร็ง (100%) และผู้ป่วยมะเร็งเต้านมให้ผลพบเซลล์มะเร็ง 3 รายจากทั้งหมด 6 ราย (50%) ซึ่งมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาจากประเทศไทยในปี พ.ศ. 2564 โดย Chantharakhit C และคณะทำการเก็บตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากผู้ป่วยมะเร็ง 155 ราย ให้ผลพบเซลล์มะเร็งทางเซลล์วิทยาจำนวน 78 ราย (50.32%) โดยผู้ป่วยมะเร็งปอดพบว่ามีอุบัติการณ์ในการพบเซลล์มะเร็งมากที่สุดที่ 66.67% รองลงมาคือผู้ป่วยมะเร็งเต้านมให้ผลพบเซลล์มะเร็ง 38.46%[16] ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการนำเซลล์จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เหลือจากการวินิจฉัยเพื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มีรายงานการวิจัยในต่างประเทศที่ใช้ปริมาณน้ำในช่องปอดปริมาณมาก (200-1,000 มิลลิลิตร)[17]

ซึ่งการเจาะเก็บทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยบางรายไม่สามารถเจาะเก็บได้เนื่องจากมีปริมาณน้อย จากการเก็บสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเซลล์ในครั้งนี้พบว่า น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีปริมาณตั้งแต่ 3-40 มิลลิลิตร โดยเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งทั้ง 5 ราย ที่ให้ผลพบเซลล์มะเร็งทางเซลล์วิทยา สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งหมด (100%) ผู้ป่วยรายที่ 2 ซึ่งมีน้ำในช่องปอดเพียง 3 มิลลิลิตร สามารถทดสอบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ 1 ครั้ง แม้ไม่สามารถเก็บข้อมูลทางสถิติได้ แต่สามารถทราบแนวโน้มการตอบสนองต่อยาในเบื้องต้น โดยผู้ป่วย 3 รายที่ให้ผลลบต่อการตรวจทางเซลล์วิทยาและไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ ภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเกินที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสาเหตุอื่นหรือเซลล์มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนั้น พบว่าการแยกเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ให้ผลสำเร็จไม่แตกต่างจากการแยกเก็บเซลล์ทันที ซึ่งช่วงเวลารอคอยนี้ทำให้สะดวกต่อการวางแผนจัดการทางห้องปฏิบัติการ โดยสามารถเก็บข้ามคืนได้หากมีการเก็บน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดในเวลาค่ำที่ไม่มีเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงาน ถือเป็นผลพลอยได้จากการศึกษานี้

ยาเคมีบำบัดเข้ามามีบทบาทมากในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งในระยะแพร่กระจาย มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด จะมีชีวิตยืนยาวกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา[18,19] การศึกษานี้ทดสอบผลของการใช้ยาเคมีบำบัดชนิด Cisplatin ซึ่งอยู่ในกลุ่มยาแพลทินัม (Platinum-based drug) มีผลทำให้เซลล์หยุดการเจริญแบ่งตัวและตายในที่สุด เป็นยาพื้นฐานที่สามารถเลือกใช้ได้สำหรับทั้งผู้ป่วยมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด ทดสอบโดยการให้ยาเดี่ยว (Monotherapy) พบว่า ผู้ป่วยมะเร็งแต่ละรายให้ผลตอบสนองแตกต่างกัน ในจำนวนนี้มี 1 รายที่มีแนวโน้มในการตอบสนองต่อยาดี มีผู้ป่วย 1 รายไม่ตอบสนองต่อยาโดยไม่พบการตายของเซลล์หลังจากมีบ่มร่วมกับยาเป็นเวลา 3 วัน และผู้ป่วยอีก 2 รายสามารถตอบสนองต่อยาในระดับปานกลาง ประโยชน์ของการใช้ยาเคมีบำบัดร่วมกัน (Combination therapy) ได้รับการรายงานในหลายการศึกษา[20] ซึ่งการศึกษาผลของเซลล์เหล่านี้ต่อการใช้ยาเคมีบำบัดหลายชนิด รวมถึงปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์ของผู้ป่วยมะเร็งมีการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกันทางผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาต่อไปในอนาคต สำหรับการนำมาใช้จริงทางคลินิก ระยะเวลาในการออกผลมีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากจำเป็นต้องใช้ผลในการเลือกยาให้กับคนไข้ จากการศึกษานี้พบว่า ระยะเวลาที่เซลล์สามารถแบ่งตัวจนมีปริมาณเซลล์ที่เพียงพอในการทดสอบการตอบสนองต่อยาอยู่ที่ 7-14 วัน ซึ่งในอนาคต จำเป็นต้องมีการหาวิธีในการลดระยะเวลาในการทดสอบลง ข้อจำกัดของการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ผู้ป่วยมะเร็งที่เข้าร่วมงานวิจัยได้รับการรักษาโดยการให้ยาตามแนวทางเวชปฏิบัติการรักษาที่มีตัวยาแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำผลของการให้ยา Cisplatin ทางคลินิกมาเปรียบเทียบได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาผลของการให้ยาชนิดเดียวกันทั้งทางคลินิกและหลอดทดลองในการศึกษาถัดไป

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้สิ่งส่งตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เหลือจากการตรวจวินิจฉัยเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์และทดสอบการตอบสนองต่อยาในห้องปฏิบัติการ สามารถแสดงความแตกต่างของระดับการตอบสนองได้ในผู้ป่วยมะเร็งแต่ละราย สามารถนำมาใช้ต่อยอดเพื่อช่วยแพทย์ในการเลือกยาที่เหมาะสมให้กับคนไข้มะเร็งแต่ละบุคคลสำหรับการแพทย์แม่นยำ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ปีงบประมาณ 2565 (รหัสโครงการ 164172) จากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) และผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่เข้าร่วมโครงการวิจัยมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. Esparza-Lopez J, Martinez-Aguilar JF, Ibarra-Sanchez MJ. Deriving Primary Cancer Cell Cultures for Personalized Therapy. Rev Invest Clin. 2019;71(6):369-80.
2. Kodack DP, Farago AF, Dastur A, Held MA, Dardaei L, Friboulet L, et al. Primary Patient-Derived Cancer Cells and Their Potential for Personalized Cancer Patient Care. Cell Rep. 2017;21(11):3298-309.
3. Mathur S, Sutton J. Personalized medicine could transform healthcare. Biomed Rep. 2017;7(1):3-5.
4. Krzyszczyk P, Acevedo A, Davidoff EJ, Timmins LM, Marrero-Berrios I, Patel M, et al. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. Technology (Singap World Sci). 2018;6(3-4):79-100.
5. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Cancers (Basel). 2021;13(9): 1-22.
6. Son B, Lee S, Youn H, Kim E, Kim W, Youn B. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. Oncotarget. 2017;8(3):3933-45.
7. Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, Shipanga H, Munro D, Mazeedi M, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. Int J Mol Sci.2017;18(7):1-30.
8. Jany B, Welte T. Pleural Effusion in Adults-Etiology, Diagnosis, and Treatment. Dtsch Arztebl Int. 2019;116(21):377-86.
9. Kulandaisamy PC, Kulandaisamy S, Kramer D, McGrath C. Malignant Pleural Effusions-A Review of Current Guidelines and Practices. J Clin Med. 2021;10(23):1-7.
10. Rodriguez-Panadero F, Janssen JP, Astoul P. Thoracoscopy: general overview and place in the di agnosis and management of pleural effusion. Eur Respir J. 2006;28(2):409-22.
11. Basak SK, Veena MS, Oh S, Huang G, Srivatsan E, Huang M, et al. The malignant pleural effusion as a model to investigate intratumoral heterogeneity in lung cancer. PLoS One. 2009;4(6):1-12.
12. Hillerdal CO, Otvos R, Szatmari T, Own SA, Hillerdal G, Dackland AL, et al. Ex vivo evaluation of tumor cell specific drug responses in malignant pleural effusions. Oncotarget. 2017;8(47):82885-96.
13. Xu Y, Zhang F, Pan X, Wang G, Zhu L, Zhang J, et al. Xenograft tumors derived from malignant pleural effusion of the patients with non-small-cell lung cancer as models to explore drug resis tance. Cancer Commun (Lond). 2018;38(1):1-12.
14. Seo HY, Kim SC, Roh WL, Shin YK, Kim S, Kim DW, et al. Culture and multiomic analysis of lung cancer patient-derived pleural effusions revealed distinct druggable molecular types. Sci Rep. 2022;12(1):1-30.

15. Cutler DM. Early Returns From the Era of Precision Medicine. JAMA. 2020;323(2):109-10.
16. Chantharakhit C, Sujaritvanichpong N. Developing a Prediction Score for the Diagnosis of Malignant Pleural Effusion: MPE Score. Asian Pac J Cancer Prev. 2022;23(1):25-31.
17. Roscilli G, De Vitis C, Ferrara FF, Noto A, Cherubini E, Ricci A, et al. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients che mosensitivity. J Transl Med. 2016;14(61):1-14.
18. Bruzzi P, Del Mastro L, Sormani MP, Bastholt L, Danova M, Focan C, et al. Objective response to chemotherapy as a potential surrogate end point of survival in metastatic breast cancer patients.J Clin Oncol. 2005;23(22):5117-25.
19. Esnaola NF, Rubin BP, Baldini EH, Vasudevan N, Demetri GD, Fletcher CD, et al. Response to che motherapy and predictors of survival in adult rhabdomyosarcoma. Ann Surg. 2001;234(2):215-23.
20. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. Oncotarget. 2017;8(23):38022-43.