Neutrophil Chemotactic Distance

Natnicha Paungpan, Manatsaphon Sukmak, Nateelak Kooltheat, Thitiya Luetragoon and Kanchana Usuwanthim*

Cellular and Molecular Immunology Research Unit, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Neutrophils are the most abundant of granulocytes in blood circulation. They can migrate through the blood vessels directed to site of infection by chemoattractant inducing neutrophil chemotaxis, and then play an important role in microbial phagocytosis. Since neutrophil chemotaxis is important in the innate immune response, the defect of chemotaxis can reduce ability in phagocytosis and cause severe microbial infection. Here we study the chemotaxis of neutrophils. The purpose of this study was to determine the average value of neutrophil chemotactic distance. Neutrophils were isolated from peripheral blood of 20 healthy student volunteers from Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University. All were 20-25 years old and without inflammation and infection. Cells were isolated by density gradient centrifugation using Polymorphprep™. The purified neutrophils were then stimulated by N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLP), an end-target chemoattractant, to observe neutrophil chemotaxis by under agarose assay using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a negative control. The result showed that the average value of neutrophil chemotactic distance is ⩾ 1,134 μm (95% CI; 1,134-1,414). This value might be used as neutrophil chemotaxis data which can be applied for further study on neutrophil chemotaxis defect patients such as those with leukocyte adhesion deficiency (LAD), Chediak-Higashi syndrome and hyper-IgE (Job) syndrome.

Keywords: Neutrophils, Phagocytosis, Chemoattractant, Neutrophil chemotaxis

***Corresponding author E-mail address:** kanchanau@nu.ac.th

Received: 1 May 2018 Revised: 18 May 2018 Accepted: 6 March 2019

ระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล

ณัฐณิชา พ่วงพันธ์ มนัสพร สุขมาก นทีลักษณ์ กุลเทศ ฐิติยา ลือตระกูล
และ กาญจนา อู่สุวรรณทิม*

หน่วยวิจัยภูมิคุ้มกันวิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

นิวโทรฟิลเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบมากที่สุดในกระแสโลหิต เป็นเซลล์ชนิดแรกที่เดินทางออกจากกระแสโลหิตไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือบริเวณที่มีการอักเสบ มีบทบาทสำคัญในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) โดยมีสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ (chemoattractant) ซึ่งปล่อยออกมาจากเซลล์ในบริเวณดังกล่าว ทำให้นิวโทรฟิลสามารถเคลื่อนที่ไปสู่บริเวณที่มีการติดเชื้อ (chemotaxis) ความผิดปกติของกระบวนการ chemotaxis จะลดประสิทธิภาพการทำงานของนิวโทรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอม และส่งผลให้ร่างกายมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจุลชีพ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLP) โดยงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดครบส่วนจากอาสาสมัครซึ่งเป็นนิสิตสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อายุ 20-25 ปี ที่ไม่มีภาวะการอักเสบหรือการติดเชื้อ จำนวน 20 คน นำเลือดครบส่วนมาแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ด้วยหลักการ density gradient centrifugation โดยใช้น้ำยา Polymorphprep™ แล้วจึงนำนิวโทรฟิลมาทดสอบการเคลื่อนที่โดยใช้หลักการ neutrophil chemotaxis under agarose assay ซึ่งเป็นการศึกษาการเคลื่อนที่แบบ chemotaxis ของนิวโทรฟิลในภาวะ semi - solid ของ อะกาโรสเจล โดยใช้ fMLP เป็นสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ และใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารควบคุมลบ จากนั้นวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล และคำนวณค่าเฉลี่ย ผลการทดลองพบว่าระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลมีค่าเฉลี่ยมากกว่าหรือเท่ากับ 1,134 ไมโครเมตร (95% CI; 1,134 -1,414) ซึ่งเป็นค่าที่มีประโยชน์สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับศึกษาการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล (neutrophil chemotaxis) และใช้ศึกษาภาวะความผิดปกติของการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลซึ่งพบได้ในผู้ป่วยกลุ่ม neutrophil chemotactic defect เช่น leukocyte adhesion deficiency (LAD), Chediak-Higashi syndrome และ hyper—IgE (Job) syndrome เป็นต้น

คำสำคัญ: นิวโทรฟิล การจับกินสิ่งแปลกปลอม สารกระตุ้นการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** kanchanau@nu.ac.th
รับบทความ: 1 พฤษภาคม 2561 แก้ไขบทความ: 18 พฤษภาคม 2561 รับตีพิมพ์บทความ: 6 มีนาคม 2562

บทนำ

นิวโทรฟิล (neutrophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เดินทางออกจากกระแสโลหิตไปยังบริเวณที่มีการอักเสบหรือบริเวณที่ติดเชื้อ มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity system) และยังเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 50-75 ของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในกระแสโลหิต นิวโทรฟิลจะพบได้มากในบริเวณที่มีการอักเสบติดเชื้อหลังจากมีการติดเชื้อ 6-24 ชั่วโมง มีบทบาทสำคัญในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) โดยสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล (chemoattractant) จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์เนื้อเยื่อ และเซลล์เม็ดเลือด ที่อยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อจุลชีพ ทำให้นิวโทรฟิลสามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่ติดเชื้อได้ เรียกการเคลื่อนที่นี้ว่า chemotaxis[1]

การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil chemotaxis) คือการเคลื่อนที่ของเซลล์ไปตามระดับความเข้มข้นของสารเคมีที่มากระตุ้นโดยมีสารเคมีหรือปัจจัยที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ เช่น C5a หรือ cytokine บางชนิด อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า N - formylmethionine - leucyl - phenylalanine (fMLP) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial - derived peptide) เป็นสารตัวแรกที่กระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล เมื่อร่างกายมีการติดเชื้อจะมีการส่งสัญญาณผ่านตัวรับสัญญาณที่มีความจำเพาะต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของนิวโทรฟิลส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ microfilament - actomyosin system ทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนไหวและเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีระดับความเข้มข้นสูงของสาร chemoattractant ซึ่งทำหน้าที่ชักนำเซลล์ให้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีการอักเสบหรือติดเชื้อ นำไปสู่การกำจัดเชื้อจุลชีพด้วยวิธี phagocytosis ในที่สุด[2] ความผิดปกติของการเคลื่อนที่แบบ chemotaxis ในเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล สามารถพบได้ในผู้ป่วยกลุ่มโรค leukocyte adhesion deficiency (LAD), Chediak-Higashi syndrome และ Hyper - IgE (Job) syndrome ทำให้เกิดการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้น้อยลงและส่งผลให้ร่างกายมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจุลชีพได้ง่ายกว่าปกติ ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำและอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อจุลชีพที่มีความรุนแรงในการก่อโรค ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าเฉลี่ยของระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเมื่อถูกกระตุ้นด้วย fMLP โดยใช้หลักการ neutrophil chemotaxis under agarose assay วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยของระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล ซึ่งสามารถนำมาใช้ประกอบการศึกษาและอาจพัฒนาเป็นค่าอ้างอิงต่อไปเพื่อช่วยในการวินิจฉัยภาวะความผิดปกติของการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลในผู้ป่วยที่มีภาวะความผิดปกติเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างเลือดครบส่วนปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากการเจาะหลอดเลือดดำบริเวณแขนของกลุ่มอาสาสมัครซึ่งเป็นนิสิตสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในช่วงอายุ 20-25 ปี ที่ไม่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อจำนวน 20 คน โดยใช้แบบสอบถามเพื่อคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างซึ่งมีเกณฑ์การคัดเข้า (inclusion criteria) คือเพศชายหรือหญิงที่มีอายุในช่วง 20-25 ปี และเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) คือผู้ที่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อ โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (IRB No.0543/60)

2. การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล

แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยหลักการ density gradient centrifugation โดยใช้น้ำยา Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Norway) ที่มีส่วนผสมของ sodium diatrizoate (13.8% w/v) และ Dextran 500 kDa (8.0% w/v) โดยนำตัวอย่างเลือดครบส่วนปริมาตร 5 มิลลิลิตร มา overlay ลงบนน้ำยา Polymorphprep™ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ชนิด swing-out rotor ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดเก็บส่วนที่เป็น polymorphonuclear จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย Hank's balanced salt solution (HBSS) ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาผสมกับ RPMI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์

3. การตรวจวัดร้อยละของนิวโทรฟิลที่แยกด้วยวิธี density gradient centrifugation

นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 2 มาผสมกับ staining buffer และปั่นที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเติมแอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ anti-CD11b-PE (BioLegend, USA) และ anti-CD16-FITC (BD Biosciences, USA) บ่ม (incubate) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วย staining buffer ที่ความเร็ว 4,800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปวิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ (FC500, Beckman Coulter, Inc., USA)

4. การเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยวิธี neutrophil chemotaxis under agarose assay

เตรียมแผ่นอะกาโรส (agarose plate) โดยใช้ 2% อะกาโรส ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตรกับ 2.2X RPMI medium ปริมาตร 2.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทอะกาโรสเจลลงใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.4 เซนติเมตร ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 15-30 นาที แล้วจึงเจาะหลุมทั้งหมด 3 แถว แถวละ 3 หลุม (Fig. 1) แต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร และเว้นระยะห่างระหว่างแต่ละหลุม 2.5 มิลลิเมตร[3] นำแผ่นอะกาโรส ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5% CO_2 incubator นาน 30 นาที จากนั้นจึงเติมสารลงในแต่ละหลุมจากด้านซ้ายไปด้านขวาตามลำดับดังนี้ หลุมแรกเติม DMSO ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (1:2,500) หลุมกลางเติมนิวโทรฟิลที่ได้จากการแยกชนิดเม็ดเลือดขาวปริมาตร 5 ไมโครลิตร ซึ่งมีนิวโทรฟิลจำนวน 4×10^4 เซลล์ และหลุมสุดท้ายเติม fMLP ความเข้มข้น 4×10^{-7} โมลต่อลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำในแผ่นอะกาโรสเดียวกัน (Fig. 1) จากนั้นนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5% CO_2 incubator นาน 90 นาที แล้วจึงนำมาสังเกตการเคลื่อนที่และวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarizing microscope ซึ่งเชื่อมต่อกับอุปกรณ์คอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Axio vision 4.8

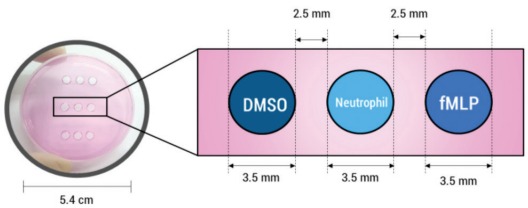

Fig. 1 Diagrammatic representation of neutrophil chemotaxis under agarose assay Neutrophil chemotaxis under agarose migration assay models were used to examine the ability of neutrophils to migrate to fMLP and DMSO.

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 6 วิเคราะห์ด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test และ T - statistic confidence interval ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยน้ำยา Polymorphprep™

ผลการแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยหลักการ density gradient centrifugation โดยใช้น้ำยา Polymorphprep™ (Axis-Shield PoC AS, Norway) แล้วนำเซลล์นิวโทรฟิลมาย้อมสี trypan blue และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด พบว่ามีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเฉลี่ยจากกลุ่มตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง อยู่ที่ $10.11 \pm 3.66 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การทดสอบร้อยละของนิวโทรฟิลที่แยกด้วยวิธี density gradient centrifugation

เมื่อนำนิวโทรฟิลที่เตรียมได้จากการแยกเซลล์ด้วยหลักการ density gradient centrifugation โดยใช้น้ำยา Polymorphprep™ ย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD11b และ CD16 แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธีโฟลไซโทเมตรีพบว่ามีค่าความบริสุทธิ์เฉลี่ยของนิวโทรฟิลอยู่ที่ร้อยละ 99.76 ของ $CD11b^+$ และร้อยละ 99.92 ของ $CD16^+$ (Fig. 2)

3. ระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล

เมื่อเติมนิวโทรฟิลลงในหลุมที่อยู่ระหว่าง DMSO และ fMLP (Fig. 1) แล้วนำแผ่นอะกาโรสไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5% CO_2 incubator นาน 90 นาที นำมาวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด polarizing microscope ที่มีการเชื่อมต่อกับอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม Axio vision 4.8

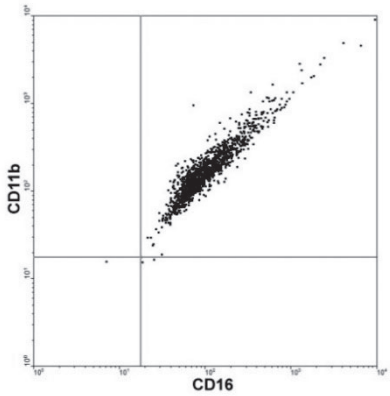

Fig. 2 Flow-cytometric analysis of neutrophil with anti- CD11b/CD16 antibody Neutrophils were isolated from healthy donors. Expression of cell surface markers on human neutrophil was investigated by flow cytometry using anti-CD11b/CD16 antibody. Expression of cell surface marker on human neutrophil was 99.76% $CD11b^+$ and 99.92% $CD16^+$

พบว่านิวโทรฟิลเคลื่อนที่ไปยังหลุมที่มี fMLP ทั้ง 20 ตัวอย่าง (Fig. 3) ด้วยระยะทางที่แตกต่างกัน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลทั้งหมดด้วยโปรแกรม GraphPad Prism Version พบการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลเฉลี่ย (mean) 1,274 ไมโครเมตร และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระยะทางการเคลื่อนที่ (2SD) 598.4 ไมโครเมตร โดยมีค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลที่น้อยที่สุด (minimum) 633 ไมโครเมตร และที่มากที่สุด (maximum) 1,841 ไมโครเมตร การทดสอบการแจกแจงของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 6 ทดสอบการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution) ด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ จากการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

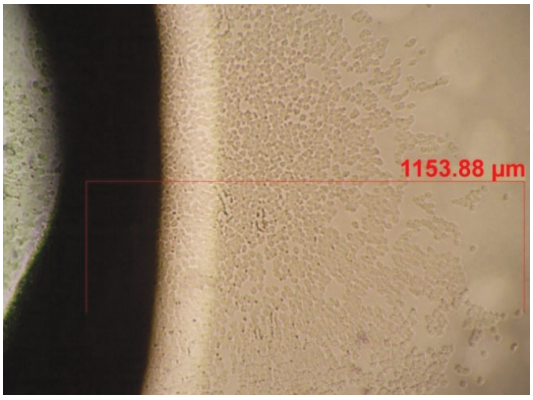

Fig. 3 Representative images of under agarose neutrophil migration Neutrophil migration under agarose assay were observed by polarizing microscope using Axio vision 4.8. The migration distance was 1153.88 µm

และเมื่อนำค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่ามีค่า 1,274 ± 598.4 ดังนั้นผลการคำนวณค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลโดยใช้การประมาณค่าแบบช่วงร่วมกับสถิติทดสอบ t (t-test) พบว่ามีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1,134 ไมโครเมตร (95% CI; 1,134-1,414)

วิจารณ์

การทดสอบการทำงานของนิวโทรฟิลมีหลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษา เช่น การศึกษาการทำหน้าที่จับกินเชื้อโรค (phagocytosis assay) การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ (chemotaxis assay) การทดสอบที่คณะผู้วิจัยสนใจศึกษานี้เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่อสิ่งเร้าที่มากระตุ้น โดยใช้สาร chemoattachtant ได้แก่ fMLP ซึ่งเป็นสารที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรียเป็นสารกระตุ้น ปัจจุบันสามารถทดสอบการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลได้หลายวิธี เช่น Boyden chamber assay, microfluidic assay, under-agarose assay และ µ-slide chemotaxis assay ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษาและการนำไปใช้ นอกจากนั้นระยะเวลาการทดสอบของแต่ละวิธีก็มีความแตกต่างกัน เช่น microfluidic assay ใช้สิ่งส่งตรวจเพียง 5 ไมโครลิตร และได้ผลการทดสอบในเวลาที่รวดเร็ว ผลการวิเคราะห์จึงบ่งชี้สภาวะหน้าที่ของเซลล์ในร่างกายผู้ป่วย ณ เวลานั้นจริง ขณะที่ Boyden chamber method เป็นวิธีที่ใช้เลือดปริมาตรมากเนื่องจากจำเป็นต้องแยกนิวโทรฟิลออกจากเลือดครบส่วนก่อนแล้วจึงนำมาทดสอบ วิธีนี้เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์จาก upper chamber มายัง lower chamber ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนทำหน้าที่เป็นผนังกั้นระหว่างสองชั้น เซลล์สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนนี้ได้โดยอาศัยความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ (chemotactic gradient) เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิล โมโนไซต์ แมคโครฟาจ รวมทั้งศึกษาเซลล์มะเร็ง ข้อควรระวังของวิธีนี้คือการอุดตันบริเวณรูพรุนในเมมเบรน ส่วนวิธี µ-slide chemotaxis เป็นการพัฒนาอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์ ให้ผลการศึกษาที่แม่นยำและทราบทิศทางการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้การย้อมสีเซลล์และติดตามด้วย time-lapse video microscopy[4-6] ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี neutrophil chemotaxis under agarose assay ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกใช้เลือดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไม่ใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อนและราคาแพง วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลตอบสนองต่อสาร chemoattractant โดยเลือกใช้ fMLP เป็นสารกระตุ้น จากผลการศึกษาในงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่านิวโทรฟิลเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ชนิด end-target chemoattractant ได้มากกว่าในบริเวณที่มีสารกระตุ้นการเคลื่อนชนิด intermediary chemoattractant[7]

ซึ่งสาร chemoattractant ที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ fMLP จัดอยู่ในกลุ่มสารกระตุ้นการเคลื่อนที่ชนิด end -target chemoattractant โดยในปี ค.ศ. 2012 Donghyuk Kim และคณะพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นการเคลื่อนที่แบบ chemotaxis ของนิวโทรฟิลต่อสาร chemoattractant 4 ชนิดได้แก่ fMLP, CXCL8, CXCL2 และ Leukotriene B4 พบว่า fMLP เป็นสาร chemoattractant ที่กระตุ้นการ chemotaxis ของนิวโทรฟิลได้ดีที่สุด[8]

งานวิจัยนี้ได้ศึกษากลุ่มตัวอย่างที่เป็นนิสิตสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้แบบสอบถามในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างซึ่งมีเกณฑ์การคัดเข้าคือเพศชายหรือหญิงที่มีอายุในช่วง 20-25 ปีและเกณฑ์การคัดออกคือผู้ที่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อเพื่อให้ได้มาซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดจำนวน 20 ตัวอย่าง ทั้งนี้การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากการใช้แบบสอบถามเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถคัดเลือกผู้ที่ไม่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อได้ทั้งหมด คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากการวินิจฉัยโดยแพทย์และมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเพื่อให้ได้มาซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีการอักเสบหรือการติดเชื้อเนื่องจากการอักเสบหรือการติดเชื้อจะส่งผลกระทบต่อค่าเฉลี่ยของระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล ในงานวิจัยครั้งนี้ค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลมาจากกลุ่มตัวอย่างเพียง 20 ราย เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องเวลาในการทำวิจัยและการคัดเลือกอาสาสมัครที่ไม่มีการอักเสบ ซึ่งผลการวิจัยพบว่าได้ค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลอยู่ระหว่าง 1,134-1,414 ไมโครเมตร แต่หากจะให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือและสามารถพัฒนาเป็นค่าอ้างอิงของการทดสอบ ควรต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นตามเกณฑ์มาตรฐาน[9] และกลุ่มตัวอย่างต้องเป็นผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายปกติ

สรุป

จากผลการศึกษาหาค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลโดยใช้หลักการ under agarose assay และใช้ N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) เป็นสารกระตุ้น สามารถสรุปได้ว่าค่าเฉลี่ยระยะทางการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1,134 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในประเทศไทยที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะความผิดปกติของการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนิสิตสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ที่เป็นกลุ่มตัวอย่างของโครงการวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Hanvivatvong O. Basic and clinical immunology. 2nd ed. Bangkok: Parbpim Ltd., Part.; 2009. (in Thai)
2. Mark T. Quinn, Frank R. DeLeo, Gary M. Bokoch. Neutrophil Methods and Protocols. USA: Humana Press Inc.; 2007.
3. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. J Cell Biol 2002; 159: 91-102.

4. Zengel P, Hoang AN, Schildhammer C, Zantl R, Kahl V, Horn E. μ -Slide Chemotaxis: A new chamber for long-term chemotaxis studies. BMC Cell Biology 2011; 21: 1-14.
5. Chen HC, Boyden chamber assay. Methods Mol Biol [serial on the Internet]. 2005 [cited 2017 Oct 10]; 294. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576901.
6. Somersalo K, Salo OP, Björksten F, Mustakallio KK. A simplified Boyden chamber assay for neutrophil chemotaxis based on quantitation of myeloperoxidase. Anal Biochem 1990; 185: 238-42.
7. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. Trends Immunol 2011; 32: 461-9.
8. Kim D, Haynes CL. Neutrophil Chemotaxis within a Competing Gradient of Chemoattractants. Anal Chem 2012; 84: 6070-8.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition, United State October 2010. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.