Chulalongkorn Medical Journal

Volume 40
Issue 12 *December 1996*

Article 8

12-1-1996

In situ hybridisation in medical oncology

N. Charuruks

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

Charuruks, N. (1996) "In situ hybridisation in medical oncology," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 40: Iss. 12, Article 8.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol40/iss12/8

This Review Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

บทฟื้นฟูวิชาการ

เทคนิค In situ hybridisation ในอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยา

นวพรรณ จารุรักษ์*

Charuruks N. In situ hybridisation in medical oncology. Chula Med J 1996 Dec;40(12):1015-29

In situ hybridisation (ISH) is a molecular technique that has been used for over three decades to detect specific nucleic acid sequences of gene expression at the cellular level. It is a morphologic method of localizing specific DNA or RNA sequences in the individual cell. The technique can be applied to frozen cells or fixed tissues or whole organisms and cytologic preparations. Various types of probes can be utilized and the reaction can be visualized by autoradiography using isotopic markers or by colorimetric methods using fluorochromes or enzymes. It has been primarily used for localization of DNA sequences and was recently applied to the localization of viral DNA sequences and which provides insight into the pathology of viral infection and is enabling the diagnosis of viral infection. Analysis of gene expression by in situ hybridisation messenger RNA (mRNA) is a crucial step towards understanding gene function and biology at the molecular level. Nowadays, ISH is applied in three major categories; 1) infectious disease 2) cytogenetics and 3) gene expression.

*ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

This technique has undoubtedly become a powerful new tool for molecular diagnostic techniques and is increasingly important in several areas of molecular medicine, especially medical oncology. Finally, summarization of basic methodology and clinical application in medical oncology has been reviewed.

Key words: *In situ hybridisation, Medical oncology.*

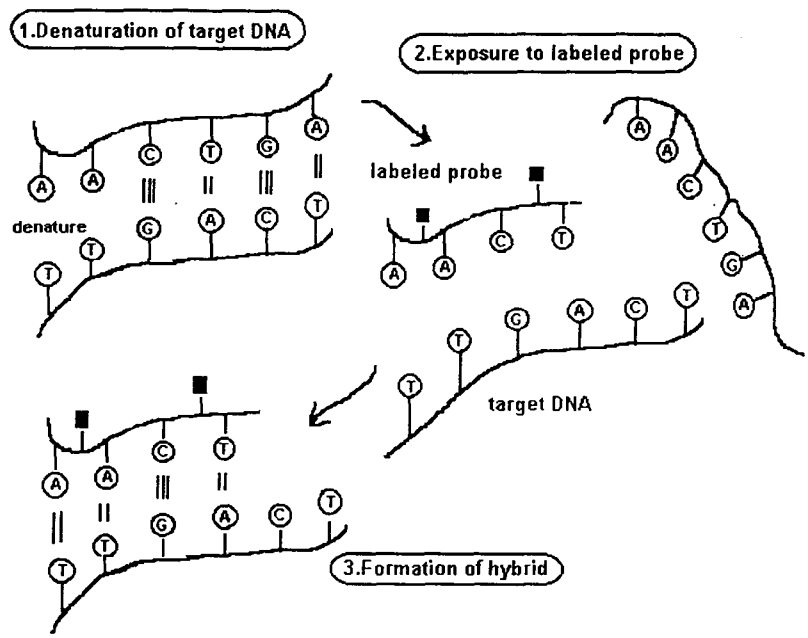
Reprint request : Charuruks N. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. October 18. 1996.

In Situ Hybridisation (ISH) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 (ค.ศ. 1969)[1-3] โดยเริ่มแรกนำมาใช้เพื่อศึกษาหรืออ่านลำดับการเรียงตัวของ nucleic acid ทั้ง DNA และ RNA ของเซลล์ต่างๆ ตลอดจนศึกษาหรืออ่านลำดับการเรียงตัวของ DNA ของไวรัส เป็นต้น โดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลาย[4-6] ในปัจจุบัน ISH ทางการแพทย์ถูกนำมาใช้ในการศึกษาใหญ่ๆ 3 ประการ[5-7] คือ 1) โรคติดเชื้อ 2) cytogenetics และ 3) gene expression ISH เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญกับศาสตร์ทุกสาขาวิชาการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิชามะเร็งวิทยา โรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มความสำคัญสูงขึ้นISH เองปัจจุบันถูกพัฒนาปรับปรุงจนมีเทคนิคแตกย่อยออกไปหลายเทคนิค โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มศักยภาพ ความถูกต้องแม่นยำ ความไว ความจำเพาะของเทคนิค ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัยต่อบุคลากร

หลักการของ ISH

หลักการ: ส่วนของ DNA หรือ RNA สายเดี่ยวที่ติดฉลาก (labeled single-stranded fragment of DNA or RNA) ที่เรียกว่า "labeled probe" มีการเรียงตัวของ nucleotide ที่เป็นคู่สมหรือคู่จำเพาะ (complementary) กับ DNA หรือ RNA เป้าหมาย (cellular of targeted DNA or RNA) สามารถจับ (hybridisation) กับ DNA หรือ RNA เป้าหมาย เกิดเป็น "hybrids" ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม[5-6] (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. แสดง Diagram การเกิด hybridisation เริ่มจากการเกิด denatured ของ DNA เป้าหมาย การเข้าจับของ probe ที่ติดฉลากไว้ จนได้ hybrid เกิดขึ้น (ดัดแปลงและปรับปรุงจาก Charuruks N, et al. J Med Assoc Thai 1996;79: 374-81)

ชนิดของ ISH

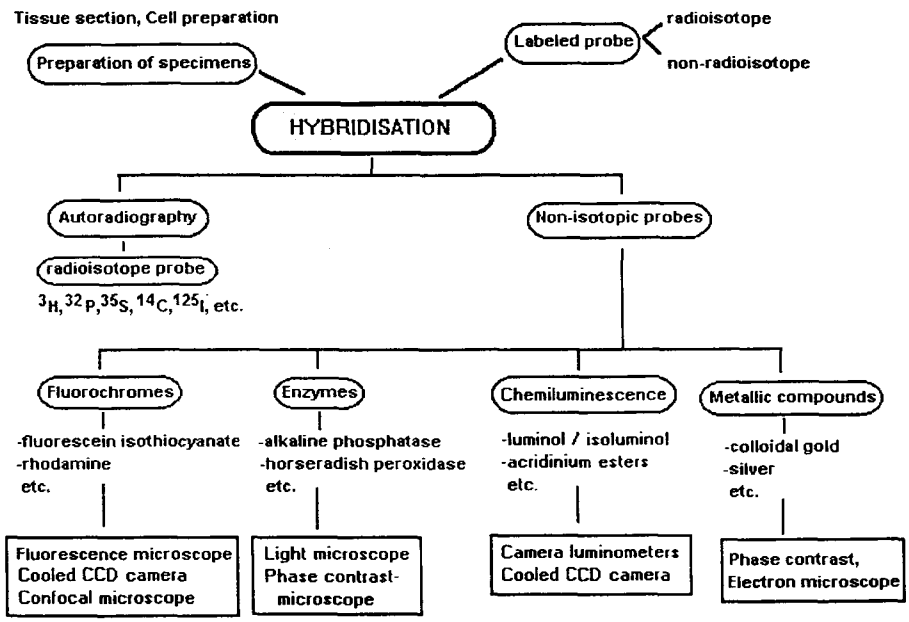
แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ตามการตรวจสัญญาณ (signal detection) (รูปที่ 2) คือ

1. การใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope) ในการตรวจหาสัญญาณเรียกว่า "Radioisotopic ISH" (RISH) โดยติดฉลากสารกัมมันตรังสีกับ probe เช่น ^{125}I, ^{32}P, ^{35}S เป็นต้น[8]

2. การใช้สารอกัมมันตรังสี (non-radioisotope) ในการตรวจหาสัญญาณเรียกว่า "Non-radioisotopic ISH" (NISH)[9] สารอกัมมันตรังสีที่นำมาใช้มีหลายชนิด ได้แก่

2.1 Fluorochromes เทคนิคการใช้สารเรืองแสง fluorochromes มีชื่อเรียกเฉพาะว่า "Fluorescence In situ Hybridisation" (FISH)[10] ถูกพัฒนามาในระยะ 10 ปีนี้ ปัจจุบันเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ค้นคว้าวิจัยในระดับอณูชีววิทยาอย่างแพร่หลาย ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์หลายแห่ง FISH ได้กลายเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้ในงานบริการนอกเหนือไปจากงานศึกษาค้นคว้าวิจัย[11]

2.2 Enzymes เทคนิคนี้นำ enzymes[12] มาใช้ในการตรวจหาสัญญาณ enzymes ที่นิยมใช้ เช่น peroxidase, alkaline phosphatase เป็นต้น ปัจจุบันเทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะเทคนิคการทำสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัย ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพงสามารถตรวจหาสัญญาณได้โดยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา (light microscope) สไลด์ผลการศึกษาเองก็สามารถเก็บได้นาน สามารถนำกลับมาศึกษาใหม่ได้



รูปที่ 2. แสดง Diagram ของ ISH ซึ่งแบ่งเป็นวิธีการที่ใช้สารกัมมันตรังสี และสารอกัมมันตรังสี ในการตรวจหาสัญญาณ การใช้สารกัมมันตรังสีเป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นก่อนและมีความไวสูง ส่วนการใช้สารอกัมมันตรังสีถูกพัฒนาขึ้นภายหลังเพื่อความสะดวก รวดเร็วและปลอดภัย สารอกัมมันตรังสีที่นำมาใช้ เช่น fluorochromes, chemiluminescences, enzymes, metalic compounds เป็นต้น (ดัดแปลงและปรับปรุงจาก Charuruks N, et al. J Med Ass Thai 1996; 79: 374-81).

2.3 Metallic compounds สาร metallic compounds ที่นิยมใช้ เช่น colloidal gold, silver[13] เป็นต้น

2.4 Chemiluminescences[14] เป็นการติดฉลากที่ probe ด้วยสารเคมีที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ทำให้สามารถตรวจสัญญาณได้ด้วยกล้องจุลทัศน์ fluorescence สาร Chemiluminescences ที่นิยมใช้เช่น luminol, lucigenin, lophine, acridinium esters เป็นต้น

ทั้ง RISH และ NISH ต่างเป็นเทคนิคที่มีรายละเอียดและข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) การนำมาใช้จึงควรเลือกใช้ให้เหมาะสมเป็นกรณีๆ

เทคนิคการทำ ISH

ขั้นตอนของเทคนิคการทำ ISH แบ่งเป็นหลายขั้นตอน ดังนี้

1. Slide preparation สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเซลล์ เช่น เซลล์เลือดและเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เตรียม slide โดยการทำความสะอาด slide ด้วย alcohol/ether อัตราส่วน 1:1 ส่วน สิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อ (tissue sections) ต้องใช้ slide ที่เตรียมขึ้นเป็นพิเศษเพื่อป้องกันการหลุดหายของชิ้นเนื้อในระหว่างขั้นตอนการทำ โดยนิยมเคลือบ slide ด้วย gelatin-chromic alum[15], หรือ poly-L-lysine[16], หรือ aminoalkysilane[17] เป็นต้น

2. Fixation เพื่อรักษารูปร่างโครงสร้างของเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ตรวจ สำหรับเซลล์นิยม fixed ด้วย methanol/acetic acid[15] ส่วนชิ้นเนื้อถ้าเป็นชิ้นเนื้อแช่แข็งนิยม fixed นาน 30 นาที ด้วย 4% formaldehyde[6] หรือ Bouin's fixative[15] หรือ paraformaldehyde vapor[6] ส่วนชิ้นเนื้อที่แช่ paraffin-embedded นิยม fixed ด้วย formalin[6] ข้อควรระวังของขั้นตอน fixation คือ สารเคมีที่ใช้สามารถทำปฏิกริยาจับ (cross-linking) กับ proteins ที่อยู่รอบๆ DNA หรือ RNA เป้าหมายที่ต้องการจะตรวจทำให้การตรวจผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง ฉะนั้นจึงต้องมีขั้นตอน permeabilization เพื่อขจัดปัญหานี้ โดยเป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอน Pretreatments[6,19] ซึ่งกำลังจะกล่าวต่อไป

3. Pretreatments เป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับเตรียมเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้มีความเหมาะสมต่อการเกิด hybridisation ต่อไป รวมทั้งลดหรือขจัดสิ่งรบกวนต่อการเกิด hybridisation[20] แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยๆ ดังนี้

3.1 Background staining prevention เพื่อกำจัดและลดสิ่งรบกวนต่อสัญญาณ

3.1.1 Endogenous enzyme inactivation[4,6] ในกรณีที่ haptens ที่ใช้เป็น enzymes จำเป็นต้อง inactivate สารจำพวก enzymes ที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตรวจนั้น (endogenous enzymes) เช่น ถ้าใช้ peroxidase เป็น hapten นิยมทำ endogenous enzyme inactivation ด้วย 1% H_2O_2 in methanol นาน 30 นาที ถ้าใช้ alkaline phosphatase เป็น hapten นิยมใช้ levamisole สำหรับทำ endogenous enzyme inactivation เป็นต้น

3.1.2 RNase treatment[4] ทำในกรณีของ DNA-DNA hybridisation เพื่อลดการรบกวนสัญญาณ (signal-to-noise ratio) จาก RNA ที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (endogenous RNA) ด้วย RNase โดยนิยม incubate เซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วย DNase-free RNase (100μg/ml) in 2 x SSC ที่ 37°C นาน 60 นาที (SSC = 150 mM NaCl, 15 mM Sodium citrate, pH 7.4)

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างและข้อดีข้อเสียของ RISH และ NISH

ข้อมูล	RISH	NISH
1. การตรวจหาสัญญาณ (signal detection)	ใช้สารกัมมันตรังสี เช่น ^{125}P, ^{32}P, ^{35}S, etc.	ใช้สารกัมมันตรังสีในปัจจุบัน แบ่งเป็น 4 ชนิด 1. Fluorochromes เช่น fluorescein isothiocyanate, rhodamine, etc. 2. Enzyems เช่น horseradish peroxidase alkaline phosphatase, etc. 3. Metallic compounds เช่น colloidal glod, silver, etc. 4. Chemiluminescence เช่น luminol/isoluminol, acridinium esters, etc.
2. การอ่านสัญญาณ	autoradiography	ใช้อุปกรณ์ตามแต่ชนิดของ NISH เช่น fluorescence microscope, light microscope, phase contrast microscope, electron micro scope, camera luminaters, cooled CCD camera
3. ข้อดี	มีความไวสูง, ไม่ต้องใช้อุปกรณ์เพิ่มเติมในการอ่านสัญญาณ	ปลอดภัย, ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี, สะดวก, รวดเร็ว, สัญญาณมีความคงทนอยู่ได้นาน ยกเว้น FISH, สัญญาณสามารถให้สีต่างๆ กันได้ ทำให้สามารถตรวจหาความผิดปกติหลายๆ สิ่งในคราวเดียวกัน
4. ข้อเสีย	ใช้สารกัมมันตรังสีทำให้มีปัญหาในเรื่องความปลอดภัย และยุ่งยากในวิธีการทำ, ขั้นตอนในการตรวจอ่านสัญญาณใช้เวลายาวนาน, การเกิด autoradiography มีอายุจำกัดตาม half life ของสารกัมมันตรังสีที่ใช้	มีความไวต่ำกว่าวิธี RISH ยกเว้น FISH, ส่วนวิธี chemiluminescence ยังอยู่ในระหว่างพัฒนา, บางเทคนิคต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการอ่านสัญญาณ เช่น FISH ต้องใช้ fluorescence microscope เป็นต้น

3.2 Permeabilization เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีความเหมาะสมต่อการเกิด hybridisation และเพิ่ม accessibility ในขั้นตอน hybridisation

3.2.1 HCI treatment เพื่อขจัดโปรตีนส่วนเกินและทำให้เกิด partial hydrolysis กับ nucleotides เป้าหมาย นิยมใช้ 200 mM HCl นาน 20-30 นาที

3.2.2 detergent treatment เพื่อขจัดไขมันที่ผิวเซลล์ สารที่นิยมเช่น Triton^{R} X-100[6], sodium dodecyl sulfate เป็นต้น

3.2.3 Protease treatment เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่อยู่รอบๆ DNA หรือ RNA เป้าหมาย สารที่นิยม เช่น proteinase K[6], pronase[20], pepsin[5], trypsin[5], เป็นต้น ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้แปรตามความเหมาะสมเป็นกรณีๆ ไป

4. Prehybridisation[6,21] นิยม incubate เซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วย hybridisation mixture ซึ่งยังไม่ได้เติม probe และ dextran sulfate เรียกว่า "prehybridisaton mixture" เชื่อว่าช่วยลด และป้องกันการเกิด background staining

5. Denaturation of probe and target ในกรณีที่ probe ที่ใช้เป็น double-stranded DNA หรือ nucleotides เป้าหมายที่เป็น chromosomal DNA จะต้องแยกให้เป็นสายเดี่ยวจึงสามารถจับกันได้ สามารถทำได้ด้วย "denaturation" ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น ใช้กรด[21], ใช้ด่าง[21], ความร้อน[4-6,21] เป็นต้น

6. Hybridisation เป็นขั้นตอนที่ labeled probes จับกับ nucleotides เป้าหมายภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างกันเป็นกรณีๆ ไป "stringency" คือภาวะที่ลดหรือส่งเสริมการจับกันของ labeled probes กับ nucleotides เป้าหมาย การที่ labeled probe จับกับ nucleotides เป้าหมายได้นั้นแสดงว่ามีการเรียงตัวเป็นคู่สมกัน คือมี homology ต่อกัน การจับกันนี้สามารถลดหรือส่งเสริมโดยการปรับอุณหภูมิในขณะเกิด hybridisation ความเข้มข้นของสารละลายเกลือ ความเข้มข้นของ formamide ที่ใช้ในขณะเกิด hybridisation หรือในขณะล้าง (post-hybridisation washing) "high stringency" คือภาวะที่ยอมให้เฉพาะ labeled probes ที่มี homology สูง (high specificity) เช่น

ตารางที่ 2 แสดง fluorochromes ต่างๆ ที่นิยมใช้ในการตรวจหาสัญญาณในเทคนิค NISH

Fluorochromes	Color	Excitation max (nm)	Emission max (nm)
Amino-methylcoumarin-acetic acid (AMCA)	Blue	399	446
Fluorescein	Green	494	523
CY3	Red	552	565
Rhodamine	Red	555	580
Texas red	Red	590	615

ร้อยละร้อย หรือใกล้เคียงร้อยละร้อยกับ nucleotides เป้าหมาย จับกันเกิดเป็น "hybrids" ที่มีเสถียรภาพสูง (high stability) "low stringency" คือภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดการจับกันทั้งที่ labeled probes มี homology ต่ำ (low specificity) เช่น ร้อยละเจ็ดสิบ เป็นต้น จับกับ nucleotides เป้าหมายเกิดเป็น "hybrids" ที่มีเสถียรภาพต่ำ (low stability or unstability)[22,23]

7. **Posthybridisation washing** เป็นขั้นตอนเพื่อล้างหรือกำจัดสารส่วนเกินต่างๆ ออกไป เพื่อลดการเกิดปฏิกริยาที่ไม่จำเพาะ (non-specific reaction)

8. **Detection of signals** วิธีการในการตรวจหาสัญญาณนี้มีรายละเอียดแตกต่างกันเล็กน้อยตามชนิดของสารที่ใช้ในการตรวจหาสัญญาณ ซึ่งได้กล่าวไว้บ้างแล้วในหัวข้อชนิดของ ISH การตรวจหาสัญญาณในเทคนิค FISH วิธีการตรวจจับสัญญาณแบ่งเป็น 2 วิธี คือ "direct method" และ "indirect method" วิธี direct method นั้น สารเรืองแสงจะจับหรือติดอยู่กับ labeled probe โดยตรง ทำให้ตรวจสัญญาณได้ทันทีหลังจาก hybridisation[24] ส่วนวิธี indirect method นั้น probe จะติดฉลากด้วยสาร haptens (hapten modified probe) เช่น biotin, digoxigenin, photobiotin, bromodeoxyuridine, acetylaminofluorescence[10,25] เป็นต้น แล้วจึงตรวจหาสัญญาณหรือฉลากด้วยสารเรืองแสงอีกขั้นหนึ่ง สารเรืองแสงที่นิยมใช้ในเทคนิค FISH แสดงในตารางที่ 2 โดยการติดสารเรืองแสงไว้กับ specific antibodies ต่อ haptens นั้น สัญญาณสีเรืองแสงที่ได้จากเทคนิค FISH นั้นอาจเป็นสีเดียว "single-color FISH" หรือ "multi-color FISH" ขึ้นอยู่กับจำนวนและอัตราส่วนของสีเรืองแสงที่เลือกใช้ ในปัจจุบันมีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดสีต่างๆ ได้ถึง 12 สี[26]

การตรวจหาสัญญาณโดยการใช้ enzymes ที่นิยมมี peroxidase และ alkaline phosphatase ซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับ substrate ต่างๆ กัน ให้สีต่างๆ กันออกไป (ตารางที่ 3)[12]

ตารางที่ 3 แสดง enzymes ที่นิยมใช้ในการตรวจหาสัญญาณในเทคนิค NISH

Enzyme	Substrate	Color / Detection
1. Peroxidase	H_2O_2 / DAB*	Brown color / bright-field microscopy
	H_2O_2 / Chloronaphthol	Purple color / bright-field microscopy
	H_2O_2 / TMB**	Green color / bright-field microscopy
2. Alkaline phosphatase	BCIP*** / NBT****	Blue color / bright-field microscopy
	nophthol-p / Fast Red	Red color / bright-field microscopy
		Red fluorescence / fluorescence microscopy
	naphthol-p / New Fuchsin	Red color / bright-field microscopy
		Red fluorescence / fluorescence microscopy

DAB* diaminobenzidine
TMB** tetramethylbenzidine
BCIP*** bromo-chloro-indolylphosphate
NBT**** nitroblue tetrazolium

ประโยชน์ของ ISH ในโรคมะเร็ง

ISH สามารถนำมาใช้ในโรคมะเร็งทั้งในแง่ของการตรวจวิเคราะห์, วินิจฉัย, รักษา, ติดตาม, ทำนายผลการรักษาโรค, และในงานวิจัยอย่างกว้างขวาง (ตารางที่ 4) ได้แก่

ตารางที่ 4 การทำ ISH มาใช้ในโรคมะเร็ง

1. ตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม ทั้งจำนวนและโครงสร้าง
2. ติดตามผลการรักษา และตรวจหาร่องรอยโรค
3. ตรวจหาอัตราความเสี่ยงและการทำนายโรค
4. ศึกษาขบวนการเกิดและดำเนินโรคของโรคมะเร็ง
5. ตรวจหาเซลล์ผู้บริจาคไขกระดูกในไขกระดูกผู้ป่วยหลังการเปลี่ยนถ่ายและปลูกไขกระดูก
6. ศึกษาเซลล์วิทยาของเซลล์มะเร็ง

1. ตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม ทั้งจำนวนและโครงสร้าง

ISH ถูกนำมาใช้ในการศึกษา gene expression ในระดับอณูชีววิทยาของโรคมะเร็ง ISH สามารถนำมาใช้ศึกษา oncogene overexpression ในโรคมะเร็งชนิดต่างๆ กัน เช่น N-myc oncogene overexpression ในโรคมะเร็ง neuroblastomas[27], BCL2/myc expression ในโรคมะเร็ง non-Hodgkin's lymphoma[28], Her2/neu oncogene overexpression ในโรคมะเร็งเต้านม[29], เป็นต้น โดยสามารถศึกษาได้ทั้งระดับ DNA และ RNA ISHยังสามารถนำมาใช้ศึกษาความไม่มีเสถียรภาพของยีน (genomic instability) ในโรคมะเร็งต่างๆ เช่น โรคมะเร็งศีรษะและคอ[30], มะเร็งเต้านม[31], มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ[32] เป็นต้น ใช้ตรวจหา translocations และ chromosome deletions ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น chronic myelogenous leukemia[33,34] เป็นต้น ตรวจหา gene ampilification เช่น c-ERB-B2 gene ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม[11] เป็นต้น

2. ติดตามผลการรักษาและตรวจหาร่องรอยโรค

ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว ISH โดยเฉพาะ FISH ถูกนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ยังหลงเหลืออยู่หลังจากได้รับการรักษาแล้ว เช่น ในผู้ป่วย CML ที่ได้รับ alpha-interferon ใช้ FISH ตรวจหา Philadelphia chromosome[11], ในผู้ป่วย acute promyelocytic leukemia ที่ได้รับการรักษาด้วย all-trans retinoic acid[11], และในผู้ป่วย myelodysplastic syndrome[11] เป็นต้น

3. ตรวจหาอัตราความเสี่ยงและการทำนายโรค

มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ oncogenes expression และ tumor-suppressor gene alterations และใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงอัตราความเสี่ยงหรือการทำนายโรค เช่น ras oncogenes ในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่[35], โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ[36], เป็นต้น การศึกษาความไม่มีเสถียรภาพของยีนและการเกิด second primary tumor หรือการกลับเป็นซ้ำของ primary tumor[37] เป็นต้น

4. ศึกษาขบวนการเกิดและดำเนินโรคของโรคมะเร็ง

มีการนำ ISH มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนและโครโมโซมในขั้นตอนต่างๆ แต่ละขั้นตอนของขบวนการเกิดโรคมะเร็ง (multistep tumorigenesis) เช่น การศึกษาการเกิด aneuploidy หรือ polysomy ในโรคมะเร็งศีรษะและคอ[30,38] เป็นต้น

5. ตรวจหาเซลล์ผู้บริจาคไขกระดูกผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายและปลูกไขกระดูกใหม่

ในการเปลี่ยนถ่ายและปลูกไขกระดูกใหม่ (bone marrow transplantation) FISH ถูกใช้ตรวจหาจำนวนเซลล์ของผู้บริจาค และผู้ป่วยเพื่อติดตามความสำเร็จของการเปลี่ยนถ่ายและปลูกไขกระดูกใหม่[39,40]

6. ศึกษาเซลล์วิทยาของเซลล์มะเร็ง

ISH ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาเซลล์มะเร็งวิทยา เช่น ศึกษา proliferative activity ของเซลล์มะเร็ง[41] เป็นต้น ISH ยังถูกนำมาใช้ศึกษา hormone receptors ของเซลล์มะเร็ง[42], tumor-associated markers เช่น carcinoembryonic antigen (CEA)[43], growth factors and growth-factor receptors[44,45], cytokines[46], T-cell receptor β-chain, immunoglobulin (Ig) light chain[47] เป็นต้น

บทสรุป

ISH เป็นเทคนิคในระดับอณูชีววิทยาที่ใช้ศึกษา DNA, และ RNA มีความไวและจำเพาะสูง สามารถศึกษาเซลล์ต่างๆที่ได้มาใหม่ๆ หรือที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง หรือชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็ง หรือเก็บรักษาไว้โดยน้ำยา เช่น น้ำยา formalin ซึ่งเก็บชิ้นเนื้อไว้ได้นานนับ 10 ปี เป็นเทคนิคที่มีรายละเอียดแตกย่อยออกเป็นหลายเทคนิคตามสารที่นำมาใช้ตรวจหาสัญญาณ มีทั้งสารกัมมันตรังสีและสารอกัมมันตรังสี เป็นเทคนิคที่ถูกแตกย่อยและมีชื่อเรียกต่างๆ กันไปตามสารที่ทำมาใช้ตรวจหาสัญญา เช่น RISH, NISH, และ FISH เป็นต้น และยังเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาปรับปรุงเพื่อเพิ่มศักยภาพของเทคนิค ทั้งทางด้านความไว ความจำเพาะและความสามารถในการตรวจวิเคราะห์แยกความผิดปกติได้หลายๆ ชนิดในคราวเดียวกัน เช่น การใช้ multicolor FISH เป็นต้น นอกจากนี้ ISH ยังเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายโครงสร้างของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสามารถนำมาศึกษาให้เกิดความสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆได้ด้วย และที่สำคัญยังเป็นเทคนิคที่สามารถพัฒนาให้ใช้กับระบบเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติในอนาคต โดยในอนาคตอันใกล้นี้เชื่อว่าจะสามารถพัฒนาสู่ระบบการใช้เครื่องมือกึ่งอัตโนมัติและเครื่องมืออัตโนมัติในที่สุด

ISH เป็นเทคนิคที่ไม่ยากมาก มีประโยชน์และศักยภาพในการวิเคราะห์สูง สามารถพัฒนาขึ้นในสถาบันการแพทย์ โดยไม่ต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพงหรือซับซ้อน ทั้งยังเป็นเทคนิคที่สามารถประยุกต์ พัฒนา ปรับปรุงได้หลายวิธี สามารถพัฒนาปรับปรุงสู่ระบบเครื่องมืออัตโนมัติในอนาคต ความสำคัญและประโยชน์ของ ISH เชื่อว่าจะเพิ่มทวีขึ้น และเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อ การวินิจฉัย การพยากรณ์โรค การติดตามผลการรักษา และการวินิจฉัยการกลับเป็นซ้ำของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ตลอดจนใช้ในการวินิจฉัยทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานทางการแพทย์

อ้างอิง

1. Buongiorno-Nardelli M, Amaldi F. Autoradiographic detection of molecular hybrids between RNA and DNA in tissue sections. Nature 1969 Mar 1; 225 (236): 446-7
2. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci 1969 Jun;63 (2): 378-81
3. John HA, Birnestiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 1969 Aug 9;223 (206): 912-3
4. DeLellis RA. In situ hybridization techniques for the analysis of gene expression: applications in tumor pathology. Hum Pathol 1994 Jun; 25 (6): 580-5
5. Charuruks N, Voravud N. In situ hybridization: a new tool in molecular medicine. J Med Assoc Thai 1996 Jun;79 (6): 374-81
6. Hofler H. Principles of In situ hybridization principles. In: Polak JM, McGee JO, eds. In situ hybridization: Principles and practice. New York: Oxford University Press, 1990: 15-22
7. Stoler MH. In situ hybridization. A research technique or routine diagnostic test? Arch Pathol Lab Med 1993 May;117 (5): 478-81
8. Brady MAW, Finlan MF. Radioactive lebels: autoradiography and choice of emulsions for In situ hybridization. In: Polak JM, McGee JO, eds. In situ Hybridization: Principles and practice. New York: Oxford University Press, 1990: 31-57
9. Chan VT, McGee JO. Non-radioactive probes: preparation, characterization, and detection. In: Polak JM, McGee JO, eds. In situ Hybridization: Principles and Practice. New York: Oxford University Press, 1990: 59-70
10. Charuruks N. Fluorescence In situ hybridisation. In: Chareoansuk N, ed.: Basic molecular biology in medicine. Bangkok:, 1997: (in press)
11. Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization in cancer diagnosis. In: De Vita VT, Hellman S, Steven A, Rosenberg JB, eds. Important Advances in oncology. Philadelphia: Lippincott, 1993: 29-45
12. Hopman AHN, Speel EJM, Voorter CEM, Ramaekers FCS. Probe labelling methods. In: Levy ER, Herrington CS, eds. Non-Isotopic Methods in Molecular Biology: a Practical Approach. New York: Oxford University Press, 1995: 1-24
13. Lewis FA, Wells M. Detection of virus in infected human tissue by in situ hybridization. In: Wilkinson DG, eds. In situ Hybridization: a Practical Approach. New York: Oxford University Press,

1992: 121-36

14. Campbell AK, Hallett MB, Weeks I, Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. In: Glick D, ed. Methods of Biochemical Analysis. New York: John Wiley & Sons, 1985: 317-416
15. Gall JG, Pardue ML. Nucleic acid hybridisation in cytological preparations. Meth Enzymol 1971; 38: 470-80
16. Huang WM, Gibson SJ, Facer P, Gu J, Polak JM. Improved section adhesion for immunohistochemistry using molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. Histochemistry 1983; 77 (2):275-9
17. Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J. Aminoalkysilane-treated glass slide as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment condition. Histochem J 1986 May;18 (5): 271-6
18. McAllister HA, Rock DL. Comparative usefulness of tissue fixatives for in situ viral nucleic acid hybridization. J Histochem Cytochem 1985 Oct; 33 (10): 1026-33
19. Hofler H, Mueller J. In situ hybridization in pathology. Verh Dtsch Ges Path 1994; 78: 124-35
20. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalhoz B, Travis SZ, Fong CK, Hsing GD, Ward DC. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. Virology 1983 Apr 15;126 (1): 32-50
21. Szabo P. In situ hybridization. In: Verma RS, Bubu A, eds. Human Chromosomes Priciples and Techniques. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 280-91
22. Herrington CS, McGee JO. Discrimination of closely homologous human genomic and viral sequence in cells and tissues: further characterization of Tmt. Histochem J 1994 Jul;26 (7): 545-52
23. Gibson SJ, Polak JM. Principles and application of complementary RNA probes. In: Polak JM, McGee JO, eds. In situ Hybridization: Principles and Practice. New York: Oxford University Press, 1990: 81-9
24. Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, Van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK, In situ hybridization with fluoresceinated DNA. Nucleic Acids Res 1991 Jun;19 (12): 3237-41
25. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. Nature 1977 Feb 3;265 (5593): 472-3
26. Dauwerse JG, Wiegant J, Raap AK, Breuning MH, Van Ommen GJB. Mutiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labeled DNA

probes create a molecular karyotype. Hum Mol Genet 1992 Nov;1 (8): 593-8

27. Cohen PS, Seeger RC, Triche TJ, Israel MA. Detection of N-myc gene expression in neuroblastoma tumor by in situ hybridization. Am J Pathol 1988 Jun; 131 (3): 391-7

28. Murty VV, Ladanyi M, Houldsworth J, Mikraki V, Chaganti RS. Analysis of BCL2 and MYC expression in non Hodgkin's lymphomas by in situ hybridization: correlation with chromosome translocations. Diagn Mol Pathol 1992 Dec;1 (4): 221-8

29. Naber SP, Tsutsumin Y, Yin S, Zolnay SA, Mobtaker H, Marks PJ, McKenzie SJ, DeLellis RA, Wolfe HJ. Strategies for the analysis of oncogene overexpression. Studies of the neu oncogene in breast Carcinoma. Am J Clin Pathol 1990 Aug;94 (2): 125-36

30. Charuruks N, Shin DM, Voravud N, Ro JY, Hong WK, Hittleman WN. Genetics instabilities of chromosome 9, 17 and accumalation of p53 overexpression during multistage tumorigenesis in head and neck cancer. J Med Assoc Thai (in press)

31. Devilee P, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AH, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ. Detection of chromosome aneuploidy interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific DNA probes. Cancer Res 1988 Oct 15;48 (20): 5825-30

32. Hopman AH, Moesker O, Smeets AW, Pauwells RP, Vooizs GP, Ramaekers FC. Numerical chromosome 1, 7, 9 and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. Cancer Res 1991 Jan 15;51 (2): 644-51

33. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreef M, Dolon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D. Detection of ber-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. Science 1990 Oct 26;250 (4980): 559-62

34. Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen M, Westbrook CA. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly delected region of chromosome 5 in myeloid leukemias. Proc Natl Acad Sci USA 1993 Jun 15; 90 (12): 5484-8

35. Gallick GE, Kurzrock R, Kloetzer WS, Arlinghaus RB, Guttermors JU. Expression of p21ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1985 Mar; 82 (6): 1795-9

36. Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Schlom J. ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant

lesions and high-grade bladder carcinoma. J Exp Med 1985 May 1;161 (5): 1213-8

37. Charuruks N, Shin DM, Voravud N, Ro JY, Wong KH, Hittelman WN. Genetic instability and the development of recurrence of primary tumor and second primary tumor during head and neck tumorignesis. J Med Assoc Thai (in preparation)

38. Voravud N, Shin DM, Ro JY, Hong KH, Hittelman WN. Increased polysomies of chromosome 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. Cancer Res 1993 Jun 15;53 (12): 2874-83

39. Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O' Quigley J, Bryant EM, Thomas ED. Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-speific in situ hybridization assay. Blood 1989 Nov 1;74 (6): 2220-6

40. Van Dekken H, Hagenbeek A, Bauman JGJ. Detection of host cells following sex-mismatched bone marrow transplantation by fluorescent in situ hybridization with a Y-chromosome-specific probe. Leukemia 1989 Oct; 3 (10): 724-8

41. Chou MY, Chang AL, McBride J, Donoff B, Gallagher GT, Wong DT. A rapid method to determine proliferation patterns of normal and malignant tissue by H3 mRNA in situ hybridization. Am J Pathol 1990 Apr;136 (4): 729-33

42. Bosman FT. Histochemical techniques for receptor detection: Histochemical techniques for receptor localization. Prog Histochem-Cytochem 1992; 26 (1-4): 30-8

43. Jothy S, Yuan SY, Shirota K. Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma: In situ hybridization study and implications for a new in vivo functional model. Am J Pathol 1993 Jul;143 (1): 250-7

44. Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Black PM, Antoniades HN. Coexpression of platelet derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance. J Clin Invest 1990 Jul; 86 (1): 131-40

45. Tsutsumi Y, Naber SP, Delellis RA, Wolfe HJ, Marks PJ, McKenzie SJ, Yin S. Neu oncogene protein and epidermal growth factor are independently expressed in benign and malignant breast tissue. Hum Pathol 1990 Jul;21 (7): 750-8

46. Zheng RQH, Abney E, Chu CQ, Field M, Maini RN, Lamb JR, Feldmann M, Grubeck-Loebenstein B. Detection of

interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive in situ hybirdization and immunohistochemical methods. Clin Exp Immunol 1991 Feb; 83 (2): 314-9

47. Weiss LM, Movahed LA, Chem YY, Shin SS, Stroup RM, Bui N, Estess P, Bindl JM. Detection of immunoglobulin light-chain mRNA in lymphoid tissue using a practical in situ hybridization method. Am J Pathol 1990 Oct;137 (4): 979-88