นิพนธ์ต้นฉบับ

การแสดงออกของจีน membrane type-1-matrix metalloproteinase และ reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motif ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ภาคภูมิ อุณหเลขจิตร*, ชัยรัตน์ ตัณทราวัฒน์พันธ์*, ภาคภูมิ เขียวละม้าย*,
ศิริกุล มะโนจันทร์*, เยาวลักษณ์ อู่ปรัชญา**, อังกูรา สุโภคเวช***, สุรพล อิสรไกรศีล**

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเกิดจากความผิดปกติในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ตั้งต้นมะเร็งเม็ดเลือดขาวในไขกระดูก เซลล์ตั้งต้นเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัดและไม่สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ตัวแก่ได้ ทำให้มีปริมาณเซลล์ตัวอ่อนมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้นรวดเร็วภายในไขกระดูก นำไปสู่การเกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลว ขณะที่โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง เซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดขาวบางส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ตัวเต็มวัยและเคลื่อนที่ออกมาสู่กระแสเลือดได้ จึงไม่ทำให้เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลัน ผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์ membrane type-1-matrix metalloproteinase *(MT1-MMP)* และตัวยับยั้งเอนไซม์คือโปรตีน reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motif *(RECK)* มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ขณะที่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวออกนอกไขกระดูก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* และจีน *RECK* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและชนิดเรื้อรังโดยวิธี quantitative real-time polymerase chain reaction ผลการวิจัยพบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ในระดับที่ต่ำกว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีการแสดงออกของจีน *RECK* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการแสดงออกของเอนไซม์ต่อตัวยับยั้งพบว่าอัตราส่วนการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ต่อ *RECK* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีค่าน้อยกว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ *MT1-MMP* มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เจริญพัฒนาไปเป็นระยะตัวแก่สามารถเคลื่อนที่ออกนอกไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด และโปรตีน *RECK* มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์ *MT1-MMP* ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่กระแสเลือดได้และค้างอยู่ภายในไขกระดูกเป็นจำนวนมากจนทำให้เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลว

คำสำคัญ: โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว, จีน *MT1-MMP*, จีน *RECK*

* สาขาเซลล์วิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
** สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
*** ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปรกติของเซลล์ตั้งต้นมะเร็งเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกที่ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวได้ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวสามารถแบ่งตามอาการทางคลินิกได้ ๒ ประเภทใหญ่ๆ คือ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) เซลล์ตั้งต้นเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัดและไม่สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ระยะตัวแก่ได้ ทำให้มีปริมาณเซลล์ตัวอ่อนของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้นรวดเร็วในไขกระดูก นำไปสู่การเกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลว สำหรับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง เซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดขาวบางส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ระยะตัวแก่และเคลื่อนที่ออกมาสู่กระแสเลือดได้ เมื่อไปสะสมตามอวัยวะหรือต่อมน้ำเหลืองส่วนต่างๆ มีผลทำให้เกิดอวัยวะหรือต่อมน้ำเหลืองโตผิดปรกติร่วมกับจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงมากในกระแสเลือด พยาธิสภาพที่แตกต่างกันในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มนี้สันนิษฐานว่าเกิดจากกลไกที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับกลไกดังกล่าวน้อยมาก และไม่ทราบข้อมูลที่ชัดเจน

โปรตีนที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ปรกติและเซลล์มะเร็ง แบ่งออกเป็น ๒ กลุ่ม ได้แก่ ๑) กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์คือเอนไซม์กลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs)[๑] ซึ่งได้แก่ membrane type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase - 9 (MMP-9), matrix metalloproteinase - 2 (MMP-2) และ ๒) กลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์คือโปรตีนกลุ่ม inhibitors of matrix metalloproteinases ได้แก่ โปรตีน reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motif (RECK), เอนไซม์ tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)โดยมีรายงานว่าโปรตีนทั้ง ๒ กลุ่มทำงานร่วมกันในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งโดย MT1-MMP เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinase ชนิด membrane bound proteins ซึ่งจะทำหน้าที่ในการย่อยโมเลกุลโปรตีนในกลุ่ม extracellular matrix ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการเคลื่อนที่[๒,๓] ในขณะที่โปรตีน RECK ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MT1-MMP รวมทั้ง MMPs ชนิดอื่นๆ เช่น MMPs ในกลุ่ม fibronectin type II ได้แก่ MMP-2 และ MMP-9[๔] เป็นต้น นอกจากนี้ เอนไซม์ MT1-MMP สามารถไปกระตุ้นเอนไซม์ MMP-2 โดยการตัดส่วน pro-domain ของเอนไซม์ MMP-2 และเอนไซม์ MMP-2 ทำหน้าที่กระตุ้นเอนไซม์ MMP-9 ให้ทำงานต่อไป[๕] โดยการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ถูกยับยั้งโดยเอนไซม์ TIMP-2[๖] และ เอนไซม์ TIMP-1[๗] ตามลำดับ

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษากลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวออกจากไขกระดูกในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* และจีนในกลุ่มตัวยับยั้งคือจีน *RECK* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างจำนวน ๓๒ คน แบ่งออกเป็น ๒ กลุ่ม คือ ๑) ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันจำนวน ๑๙ คน และ ๒) ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังจำนวน ๑๓ คน ซึ่งได้รับการตรวจวินิจฉัยคัดกรองโรคจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโลหิตวิทยา ตัวอย่างไขกระดูกและเลือดได้มาจากผู้ป่วยที่มารับการเจาะไขกระดูกและเลือดเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคและ/หรือติดตามผลการรักษาโรค ณ โรงพยาบาลศิริราช โดยกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดได้รับคำอธิบายรายละเอียดโครงการวิจัยจากผู้วิจัยก่อนลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ระเบียบวิธีวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

การคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดและไขกระดูก

ไขกระดูก ๑ มิลลิลิตรหรือเลือด ๕ มิลลิลิตรถูกนำใส่ในหลอดทดลองที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA จากนั้นนำเลือดทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันกับสารละลาย red cell lysis buffer ในอัตราส่วน ๑:๕ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๑๐ นาที เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ ๒,๓๐๐xg นาน ๑๐ นาที ที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงดูดส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอน ๑ ครั้งด้วย phosphate buffered saline (PBS) pH=๗.๕ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ ๑,๐๐๐xg นาน ๕ นาที หลังจาก

นั้นจึงดูดส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนด้วย PBS ปริมาตร ๑๐ ไมโครลิตร แบ่งเซลล์ไปนับปริมาณเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่องนับเซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Cell dyn-1800 (Abbott, Canada) นำเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน ๒ × ๑๐^{๗} เซลล์ใส่ในสารละลาย Trizol® (Invitrogen, USA) ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๕ นาที เพื่อนำไปแยกสกัด RNA ต่อไปหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๘๐ องศาเซลเซียส

การแยกสกัด RNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยวิธี Phenol-chloroform (Phenol-chloroform RNA extraction)

ใส่ chloroform ๒๐๐ ไมโครลิตรในตัวอย่าง RNA ที่อยู่ในสารละลาย Trizol® ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ ๑๔,๘๐๐xg ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที แยกเอาส่วนที่เป็น aqueous phase ซึ่งมี RNA ใส่ใน หลอด appendorf ขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร จากนั้นเติม isopropanol ๕๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๑๐ นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ ๑๔,๘๐๐xg นาน ๑๐ นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน RNA ด้วยสารละลาย ๗๕% ethanol ในน้ำ diethylpyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่ความเร็ว ๕,๔๐๐xg ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส ๕ นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ ๕ นาทีเพื่อให้ ethanol ระเหย จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร ๒๐-๕๐ ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอน RNA จากนั้นตรวจวัดปริมาณของ RNA โดยใช้เครื่อง NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) และเก็บ RNA ที่แยกสกัดได้ในตู้เย็น -๘๐ องศาเซลเซียส เพื่อตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การสังเคราะห์สาย complementary deoxyribonucleic acids (cDNA synthesis)

การสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้น้ำยา Super Script™ III First-Strand Synthesis (Invitrogen, USA) ประกอบด้วย ๒ ขั้นตอน ดังนี้

๑) การทำ Pre-reverse transcription polymerase chain reaction (Pre-RT PCR)

เตรียมชุดน้ำยาซึ่งประกอบด้วย ๑ ไมโครลิตรของ ๕๐ ไมโครโมล Oligo-d(T) primer, ๑ ไมโครลิตรของ ๑๐ มิลลิโมล dNTPs mix, ๑ ไมโครกรัมของ RNA และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ ๑๐ ไมโครลิตร ด้วยน้ำ DEPC นำส่วนผสมในหลอด appendorf ไปบ่มที่อุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที

๒) การทำ reverse transcription PCR

เตรียมชุดน้ำยา master mix ประกอบด้วย ๒ ไมโครลิตร ของ ๑๐x RT buffer, ๔ ไมโครลิตร ของ ๒๕ มิลลิโมล $MgCl_2$, ๒ ไมโครลิตร ของ ๐.๑ โมล DTT, ๑ ไมโครลิตร ของ RNase OUT™ และ ๑ ไมโครลิตร ของ Super Script™ III โดยหลังจากที่ทำขั้นตอนการเตรียม pre RT-PCR เสร็จเติมน้ำยา master mix ดังกล่าว ลงในหลอดที่ได้จากการทำ pre RT-PCR และให้ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที, อุณหภูมิ ๘๕ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที และอุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาทีตามลำดับ ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Applied BioSystem; ABI, USA)

การทำ Quantitative Real time PCR (qRT-PCR) โดยน้ำยา SYBR green I (ABI, USA)

ผสมน้ำยาใน ๙๖ well plate ซึ่งประกอบด้วย ๓ ไมโครลิตรของตัวอย่าง cDNA, ๑๐ ไมโครลิตรของน้ำยา ๒X master mix, ๐.๕ ไมโครลิตรของ ๒๐ ไมโครโมล ต่อลิตร forward primer และ reverse primer ซึ่งประกอบด้วยจีนดังต่อไปนี้ จีน *MT1-MMP* forward primer 5'-GCAGAAGT-TTTACGGCTTGC-3'; reverse primer 5'-TAGCG-CTTCCTTCGAACATT-3', จีน *RECK* forward primer 5'-CCCAGATTAT-TGCCCAGAGA-3'; reverse primer 5'-TAGCGCT-TCCTTCGAACATT-3' และ ๖ ไมโครลิตรของน้ำกลั่น (PCR grade) ผสมน้ำยาทั้งหมดให้เข้ากัน และปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติกสำหรับ ๙๖ well plate (ABI, USA) จากนั้นนำ plate ไปปั่นที่ความเร็ว ๕๘๐xg นาน ๒ นาที ก่อนนำเข้าเครื่อง Step One Plus™ Real-Time PCR system Thermal Cycle (ABI, USA) ทำการตั้งค่าขั้นตอนจุดทดสอบ และอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาตามลำดับดังนี้ ขั้นตอน pre-incubation (holding stage) จำนวน ๑ รอบ ที่อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที ขั้นตอน amplification (cycling stage) จำนวน ๔๐ รอบ ประกอบด้วย ขั้นตอนการ denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ วินาที ขั้นตอนการ annealing

ที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ วินาที และ ขั้นตอนการ extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๒๐ วินาที ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตั้งค่าเพื่อวิเคราะห์ melting curve ที่อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที ๖๐ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง และ extension ที่อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Step One Software version 2.0 (ABI, USA)

การตรวจวิเคราะห์ผลและทดสอบทางสถิติ

ปริมาณการแสดงออกของจีนต่าง ๆ สามารถคำนวณโดยใช้จีน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *(GAPDH)* เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

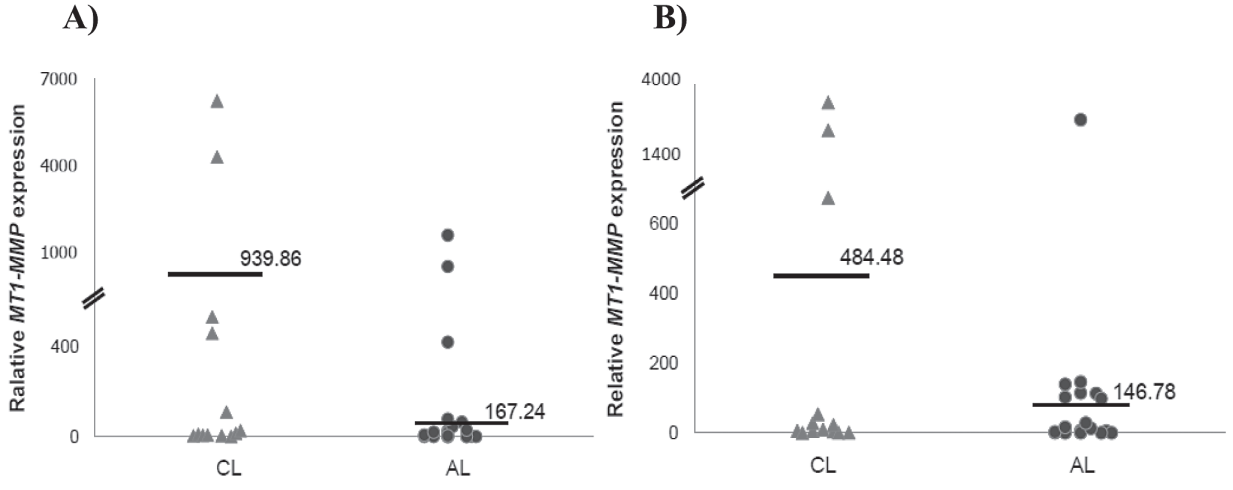
Normalized target gene = 2^n - [c(T) target gene/c(T) GAPDH gene]

โดยที่ค่า c(T) คือ จำนวนรอบของการเพิ่มจำนวนของสาย DNA ที่แสงฟลูออเรสเซนต์สามารถตรวจวัดได้และ n คือ จำนวนรอบของการทำ PCR การตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติในการแสดงออกของจีนแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ Mann-Whitney Test ที่ระดับความเชื่อมั่น ๙๕% (P-value < ๐.๐๕)

ผลการวิจัย

ระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* พบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดมีค่าเฉลี่ยระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* เท่ากับ ๙๓๙.๘๖ และ ๔๘๔.๔๘ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ ๑๖๗.๒๔ และ ๑๔๖.๗๘ ตามลำดับ) (รูปที่ ๑A และ ๑B) อย่างไรก็ตามพบว่าความแตกต่างของทั้งสองกลุ่มไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P=๐.๒๕ และ P=๐.๗๖ ตามลำดับ)



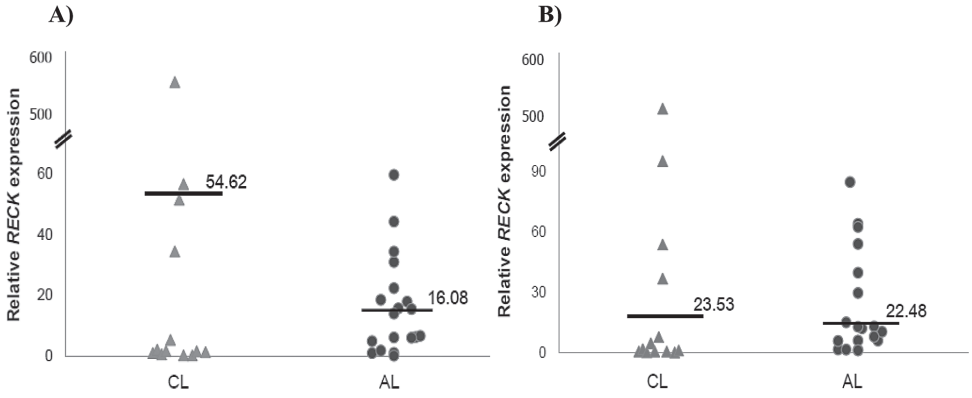
รูปที่ ๑ กราฟกระจายตัวของระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูก (รูป A) และกระแสเลือด (รูป B) ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia; CL: n = ๑๓) และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia; AL: n=๑๙)

ระดับการแสดงออกของจีน *RECK* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

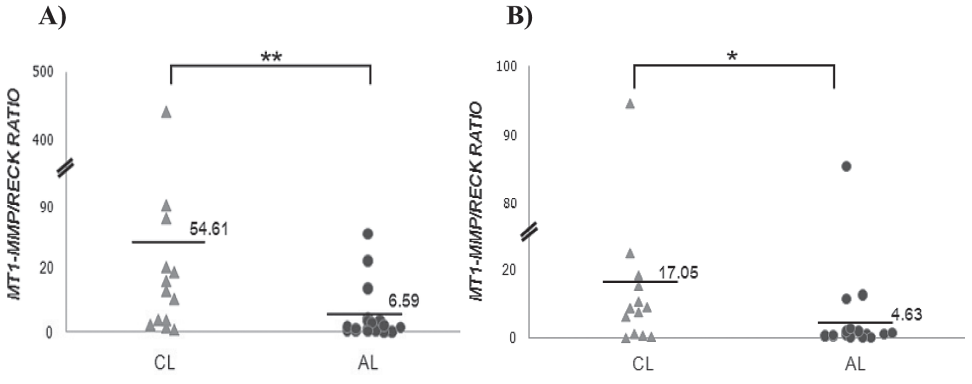
ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของจีน *RECK* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ ๕๔.๖๒ และ ๒๓.๕๓ ตามลำดับ และระดับการแสดงออกของจีน *RECK* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ ๑๖.๐๘ และ ๒๒.๔๘ ตามลำดับ (รูปที่ ๒A และ ๒B) ซึ่งพบว่าทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P=๐.๓๐ และ P=๐.๑๒ ตามลำดับ)

อัตราส่วนระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ต่อจีน *RECK* (*MT1-MMP/RECK* ratio) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนการแสดงออกของเอนไซม์ *MT1-MMP* ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์กับตัวยับยั้งของเอนไซม์คือโปรตีน *RECK* ในผู้ป่วยแต่ละรายพบว่าค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ต่อจีน *RECK* (*MT1-MMP/RECK* ratio) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดมีค่าเท่ากับ ๕๔.๖๑ และ ๑๗.๐๕ ตามลำดับซึ่งมีระดับสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ ๖.๕๕ และ ๔.๖๓ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=๐.๐๐๗ และ P=๐.๐๕ ตามลำดับ) (รูปที่ ๓A และ ๓B)



รูปที่ ๒ กราฟกระจายตัวของระดับการแสดงออกของจีน RECK ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูก (รูป A) และกระแสเลือด (รูป B) ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia; CL: n = ๑๓) และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia; AL: n=๑๕)



รูปที่ ๓ กราฟกระจายตัวของอัตราส่วนการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ต่อจีน *RECK* (*MT1-MMP/RECK* ratio) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูก (รูป A) และกระแสเลือด (รูป B) ของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia; CL: n = ๑๓) และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia; AL: n=๑๕) *P < ๐.๐๕, **P < ๐.๐๑

บทวิจารณ์

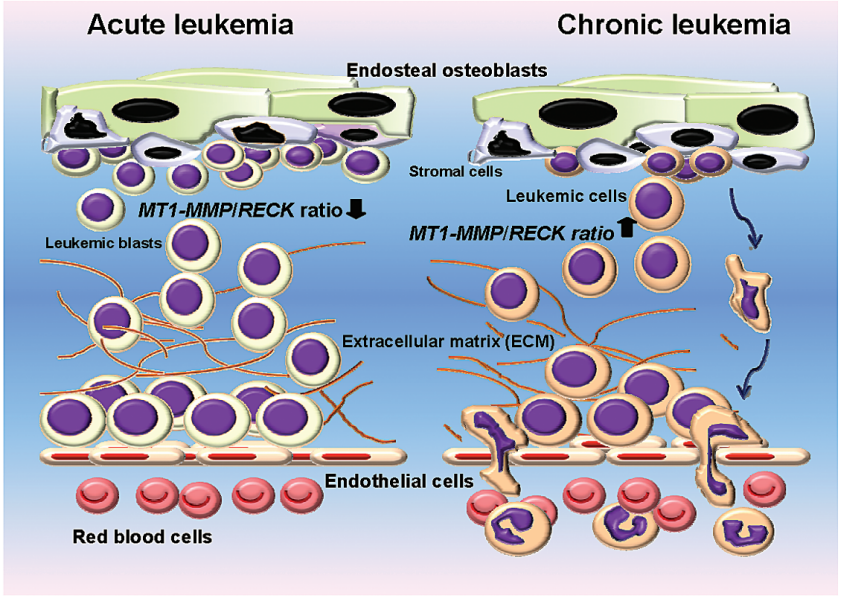
โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว คือกลุ่มโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ภายในไขกระดูก ซึ่งอาจเกิดกับเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดขาวสายใดสายหนึ่งหรือมากกว่า ๑ ชนิด โดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง หากแต่มีรายงานปัจจัยที่อาจนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้แก่ พันธุกรรม[๘,๙] แสง รังสี[๑๐,๑๑] สารเคมี[๑๒] หรือยาเคมีบำบัด[๑๓] เป็นต้น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบ่งออกได้ ๒ ชนิดใหญ่ๆ คือ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง ซึ่งมีความแตกต่างกันในหลายลักษณะโดยเฉพาะอย่างยิ่งพยาธิสภาพของผู้ป่วย กล่าวคือไขกระดูกของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีเซลล์เม็ดเลือดขาวระยะตัวอ่อนประมาณร้อยละ ๓๐ ของเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียส ซึ่งจะอัดแน่นภายในไขกระดูก ทำให้การสร้างเม็ดเลือดชนิดอื่นๆ ลดลงและนำไปสู่การเกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลัน ขณะที่โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีลักษณะจำเพาะที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวระยะตัวอ่อนที่สร้างมากผิดปรกติสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นระยะตัวแก่และเคลื่อนที่ออกนอกไขกระดูกได้ ทำให้ไม่เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลัน ดังนั้นการดำเนินโรคจึงค่อนข้างช้าและไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน กลุ่มผู้วิจัยจึงมีข้อสันนิษฐานว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวระยะตัวแก่ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีกลไกบางอย่างที่สามารถทำให้เซลล์เคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระเลือด ขณะที่เซลล์ตัวอ่อนมะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดชนิดเฉียบพลันไม่มีกลไกดังกล่าวจึงอัดแน่นภายในไขกระดูก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษากลไกที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวระยะตัวแก่ใช้เคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรวจวัดระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* และจีน *RECK* ซึ่งมีรายงานเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของจีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันและโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง

จากการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง มีแนวโน้มการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ในระดับสูงกว่า (P=๐.๒๕ และ P=๐.๗๖ ตามลำดับ) และมีแนวโน้มการแสดงออกของจีน *RECK* ในระดับสูงกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P=๐.๓๐ และ P=๐.๑๒ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ขณะที่อัตราส่วนการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* ต่อจีน *RECK* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีระดับสูงกว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=๐.๐๐๗ และ P=๐.๐๓ ตามลำดับ) โดยเอนไซม์ MT1-MMP เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases ที่พบบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound protein) หรือเรียกอีกชื่อว่าเอนไซม์ MMP-14 ทำหน้าที่ตัด extracellular matrix ชนิด collagen type I, II และ III รวมถึง laminin, fibronectin, vitronectin, fibrin และ aggrecan[๑,๑๔] และทำหน้าที่ตัด pro-domain ของเอนไซม์ MMP-2 ทำให้เอนไซม์ MMP-2 ทำงานได้[๑๕] นอกจากนี้ MT1-MMP ยังสามารถตัดโมเลกุล CD44 ซึ่งจับกับเส้นใยแอกทินมีผลทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่ได้[๓] อีกทั้งมีรายงานเพิ่มเติมว่าเอนไซม์ MT1-MMP มีผลต่อการแพร่กระจายและการลุกลามของเซลล์มะเร็งไปยังช่องท้องและระบบน้ำเหลือง[๑๖] และการเคลื่อนที่ของเซลล์ตั้งต้นเม็ดเลือด ($CD34^+$ cells) ออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด[๑๗] ขณะที่โปรตีน RECK ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MT1-MMP มีผลต่อการยับยั้งการลุกลามและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[๔] โดยมีรายงานว่าโปรตีน RECK มีบทบาทยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม[๑๘] และยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารไปยังระบบน้ำเหลืองอีกด้วย[๑๙]

ดังนั้นจากผลการวิจัยมีความเป็นไปได้ว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นระยะตัวแก่ได้นั้นมีระดับการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* มากกว่าตัวยับยั้งของมันคือ RECK (*MT1-MMP/RECK* ratio สูง) มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังสามารถเคลื่อนที่จากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือดได้ และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเหล่านั้นไปสะสมตามอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดความผิดปรกติที่อวัยวะเหล่านั้น ในทางตรงกันข้ามเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไขกระดูกและกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเม็ดเลือดขาวระยะตัวอ่อนมีระดับการ

แสดงออกของจีน *RECK* มากกว่าจีน *MT1-MMP* (*MT1-MMP/RECK* ratio ต่ำ) มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเหล่านั้นสะสมและอัดแน่นอยู่ภายในไขกระดูกแต่เคลื่อนที่เข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย จึงทำให้เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (รูปที่ ๔) อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวออกนอกไขกระดูก อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายๆ ชนิด ได้แก่เอนไซม์ cathepsin-G[๒๐] และ elastases[๒๑], MMP-2 และ MMP-9 รวมถึงตัวยับยั้งการทำงานเอนไซม์กลุ่ม matrix metalloproteinases ซึ่งได้แก่เอนไซม์ TIMP-1 และ TIMP-2 เป็นต้น โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเฉพาะเอนไซม์ MT1-MMP และตัวยับยั้งของมันคือโปรตีน RECK ดังนั้นการศึกษาในเชิงลึกร่วมกับการศึกษาเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งอาจช่วยให้สามารถอธิบายกลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวออกนอกไขกระดูกได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีการแสดงออกของจีน *MT1-MMP* มากกว่าตัวยับยั้งคือจีน *RECK* เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ในทางตรงกันข้ามมีการแสดงออกของจีน *RECK* มากกว่าจีน *MT1-MMP* ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง



รูปที่ ๔ แบบจำลองแสดงสมมติฐานกลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมีอัตราการแสดงออกของจีน *MT1-MMP/RECK* ระดับต่ำอาจทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวไม่สามารถเคลื่อนที่ออกจากไขกระดูก จึงเกิดการสะสมส่งผลให้เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลันได้ ขณะที่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมีอัตราการแสดงออกของจีน *MT1-MMP/RECK* ระดับสูงอาจทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังสามารถเคลื่อนที่ออกจากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือดได้ จึงไม่เกิดภาวะไขกระดูกล้มเหลวเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรัง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ทุนวิจัยเลขที่ RTA๔๘๘-๐๐๐๗) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (ทุนวิจัยเลขที่ CHE-RES-RG-๔๙) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัยทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

๑. Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). Curr Top Dev Biol 2003;54:1-74.

๒. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem 1997;272:2446-51.

๓. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. J Cell Biol 2001;153:893-904.

๔. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell 2001;107:789-800.

๕. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. EMBO J 2001;20:4782-93.

๖. Waleh NS, Murphy BJ, Zaveri NT. Increase in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) levels and inhibition of MMP-2 activity in a metastatic breast cancer cell line by an anti-invasive small molecule SR13179. Cancer Lett 2010;289:111-8.

๗. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors J Cell Mol Med 2006;10:499-510.

๘. Horwitz M, Allen E, Apel LL, Gyetko MR, Weiss SL. Anticipation in familial leukemia. Am J Hum Genet 1996;59:990-8.

๙. Shaw G, Lavey R, Jackson R, Austin D. Association of childhood leukemia with maternal age, birth order, and paternal occupation. A case-control study. Am J Epidemiol 1984;119:788-95.

๑๐. Finch SC. Leukemia: lessons from the Japanese experience. Stem Cells 1997;15:135-9.

๑๑. Ichimaru M, Ichimaru T, Belsky JL. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki 1950-71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. J Radiat Res 1978;19:262-82.

๑๒. Sathiakumar N, Delzell E, Cole P, Brill I, Frisch J, Spivey G. A case-control study of leukemia among petroleum workers. J Occup Environ Med 1995;37:1269-77.

๑๓. Pederson-Bjergaard J, Philip P. Two different classes of therapy-related and de-novo acute myeloid leukemia? Cancer Genet Cytogenet 1991;55:119-24.

๑๔. Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. Essays Biochem 2002;38:21-36.

๑๕. Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. J Biol Chem 1996;271:17124-31.

๑๖. Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, Ishikawa K, Iwatsuki M, Yokobori T, et al. A large-scale study of MT1-MMP as a marker for isolated tumor cells in peripheral blood and bone marrow in gastric cancer cases. Ann Surg Oncol 2008;15:2934-42.

๑๗. Vagima Y, Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Tesio M, Kalinkovich A, et al. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. J Clin Invest 2009;119:492-503.

๑๘. Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. Cancer 2003;97:2710-5.

๑๙. Song SY, Son HJ, Nam E, Rhee JC, Park C. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. Eur J Cancer 2006;42:101-8.

๒๐. Delgado MB, Clark-Lewis I, Loetscher P, Langen H, Thelen M, Baggiolini M, et al. Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. Eur J Immunol 2001;31:699-707.

๒๑. Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. J Biol Chem 2002;277:15677-89.

Abstract

The expressions of membrane type-1-matrix metalloproteinase and its inhibitor gene in leukemic cells

Pakpoom Oumhalekjit*, Chairat Tantrawatpan*, Pakpoom Kheolamai*, Sirikul Manochantr*, Yaowalak U-Pratya**, Aungkura Supokawej***, Surapol Issaragrisil**

* Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University

** Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

*** Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

Leukemia is a clonal disease resulting from uncontrolled neoplastic proliferation of WBC precursors in the bone marrow. In acute leukemia, WBC precursors have unlimited proliferation without differentiation, as a consequence there is a rapid growth of leukemic blasts in the bone marrow giving the clinical manifestation of acute bone marrow failure syndrome. In chronic leukemia, the proliferating WBC precursors can partially differentiate into mature cells and egress into peripheral blood; therefore they cannot cause acute bone marrow failure. Previous reports demonstrated that MT1-MMP and RECK are involved in cancer cells invasion and metastasis. However, the mechanism of egression of leukemic cells into peripheral blood is unclear. Our objective is to study gene expression of membrane type-1-matrix metalloproteinase *(MT1-MMP)* and its inhibitor, reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motif *(RECK)* in the bone marrow and peripheral blood of patients with acute and chronic leukemia by quantitative real-time polymerase chain reaction. The results demonstrated lower *MT1-MMP* expressions in leukemic cells obtained from bone marrow and peripheral blood of acute leukemia patients in comparison to chronic leukemia patients. On the other hand, *RECK* expressions on leukemic cells from bone marrow and peripheral blood of acute and chronic leukemia patients were not significant difference. Interestingly, the expressions of *MT1-MMP/RECK* ratio in leukemic cells from bone marrow and peripheral blood of acute leukemia were significantly lower than in differentiated WBCs from chronic leukemia. These results indicated that MT1-MMP may play the important role in egression of leukemic cells into peripheral blood in chronic leukemia, whereas RECK is an important regulator for leukemic cells retention in bone marrow of acute leukemia.

Key words: Acute leukemia, Chronic leukemia, *MT1-MMP, RECK*