

ระดับเพื่อวิดิงานน้ำเหลืองผู้ป่วยมะเร็ง



นาย อีระศักดิ์ พัทธวิภาส

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530


ISBN 974-567-408-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012842

I 10298๒41

Serum Ferritin Level in Cancers



Mr. Tirasak Pasharawipas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-408-7

Thesis Title            Serum Ferritin Level in Cancers  
By                            Mr. Tirasak Pasharawipas  
Inter-Department        Medical Microbiology  
Thesis Advisor            Professor Sodsai Vejjajiva, M.D.  
Co-Advisor                Associated Professor Dilok Yenbutra, M.D.  
                                  Petcharin Srivatanakul, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for Master's Degree.

*Thavorn Vajrabhaya*  
..... Dean of Graduate School  
( Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee:

*Santi Thoongsuwan*  
..... Chairman  
( Associated Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

*Sodsai Vejjajiva*  
..... Thesis Advisor  
( Professor Sodsai Vejjajiva, M.D.)

*D. Yenbutra*  
..... Thesis Co-advisor  
(Associated Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

*P. Srivatanakul*  
..... Thesis Co-advisor  
( Dr. Petcharin Srivatanakul, Ph.D.)

*Mr. Suttajit*  
..... Member  
(Associated Professor Maitree Suttajit, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็ง
ชื่อนิสิต	นาย อีระศักดิ์ พิศววิภาส
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศ. พญ. สติส วิเศษชาติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ. นพ. ฉิมก เย็นบุตร ดร. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล
สหสาขาวิชา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2529



บทคัดย่อ

เฟอร์ริติน (Ferritin) จัดเป็นสารประเภทออนโคพิตออลโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานว่า อาจใช้เป็นสารบ่งชี้การเป็นมะเร็ง ในโรคมะเร็งหลายชนิด การศึกษานี้ต้องการที่จะทำการศึกษาระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็ง โดยเน้นการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปอดเป็นสำคัญ เพื่อนำค่าที่ได้มาประเมินว่า จะเป็นไปได้หรือไม่ ที่จะใช้เฟอร์ริตินเป็น สารบ่งชี้การเป็นมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการศึกษา หรือ การวินิจฉัยโรคมะเร็งในระยะแรก ต่อไปในอนาคต โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้แอนติเฟอร์ริติน ที่เตรียมจากตับมาทำการศึกษาโดย วิธีอีไลซ่าซึ่งพัฒนาจากวิธีของ แอนเดอร์สันและเคลลี (Anderson and Kelly's ELISA technique) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว และ ความจำเพาะสูง ขณะเดียวกันก็ทำการศึกษาว่า จะสามารถใช้วิธีเคาท์เตอร์อิมมูโนอิเล็กโตรฟอเรซิส (Counter Immunoelectrophoresis, CIEP) และ วิธีเรเดียอิมมูโนดิฟฟูชัน (Radial Immunodiffusion, RID) สำหรับทดสอบ เฟอร์ริตินในน้ำเหลือง ของผู้ป่วยมะเร็ง ได้หรือไม่ ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์บางแห่งซึ่งอาจไม่อยู่ในสถานที่ที่พอที่จะใช้วิธีอีไลซ่า ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการได้

เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ศึกษา เก็บทั้งหมดจากผู้ป่วยโรคปอด ได้จากผู้ป่วยเพศชาย ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมจึงจะอภิปราย ผลการศึกษาเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างเพศชายเท่านั้น ซึ่งผลการศึกษาพบว่าไม่สามารถใช้ ระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลือง เพื่อแยกผู้ป่วยมะเร็งปอด ออกจากผู้ป่วยโรคปอดอื่นได้ แม้ว่า จำนวนผู้ป่วยมะเร็งปอด

ที่ยังไม่มีการอุทกสามและยังไม่ได้รับการรักษา จะมีผู้ที่มีระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองสูง คิดเป็น 64.5% (n=31) แต่ในกรณีผู้ป่วยโรคปอดอื่น ๆ คือผู้ป่วยปอดอักเสบ ผู้ป่วยวัณโรคปอด และผู้ป่วยนิ่วในไต ก็มีผู้ที่มีระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองสูง คิดเป็น 52.5% (n=21), 64.4% (n=28) และ 42.8% (n=7) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบว่าอาจสามารถชี้ ระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลือง เพื่อติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยวัณโรคปอดได้ ซึ่งจากการเปรียบเทียบทั้งจำนวนผู้ป่วยที่มีระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองสูง และ ระดับเกณฑ์เฉลี่ยของระดับเฟอร์ริติน ในผู้ป่วยวัณโรคปอด ก่อนการรักษา เปรียบเทียบกับ กลุ่มหลังการรักษา พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ทดสอบโดยใช้ Chi-square test และ unpaired t-test) ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดนั้น การศึกษานี้ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า ระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองจะใช้ติดตามผลการรักษาได้หรือไม่ อย่างไร?

ส่วนในผู้ป่วยมะเร็งตับเซลล์คาร์ซิโนมา (Hepatocellular carcinoma) พบว่า มีผู้ป่วยที่มีระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองสูงคิดเป็นจำนวนถึง 80% แต่ในกรณีผู้ป่วยมะเร็งอื่น ๆ ซึ่งได้ทำการสูมตัวอย่างเพื่อศึกษานี้ พบว่าเป็นไปได้ยากที่จะใช้เฟอร์ริตินเป็นสารบ่งชี้การเป็นมะเร็งในโรคมะเร็งหลายชนิด อย่างมีประสิทธิภาพได้ เนื่องจากผลการศึกษาพบว่า ผู้ที่มีระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองสูงในตัวอย่างที่ทำการสูมมาศึกษานี้ มีจำนวนค่อนข้างต่ำมาก

สำหรับวิธีเคาต์เตอร์อิมมูโนโอเลคโตรฟอเรซิส และเรเดียอิมมูโนดิฟฟัซัน นั้น มีความไวที่ต่ำมาก จนไม่เหมาะสมที่จะใช้หว่าระดับเฟอร์ริตินในน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งได้ ทั้งความพยายามที่จะเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์ริติน โดย วิธีคูดส่วนน้ำของน้ำเหลืองออก ก็พบว่า เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมทั้งในแง่ผลการทดสอบ และวิธีการปฏิบัติ

เนื่องจากเฟอร์ริตินสามารถจำแนกได้เป็นหลายชนิดซึ่งเรียก แต่ละชนิดว่า ไอโซเฟอร์ริติน (Isoterritin) นั้น มีคุณสมบัติของปฏิกิริยาทาง ภูมิคุ้มกันวิทยาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า เฟอร์ริตินในน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งเป็น ไอโซเฟอร์ริตินที่ไม่จำเพาะกับ แอนติเฟอร์ริติน ที่เตรียมจากตับ แต่อาจจำเพาะกับ แอนติเฟอร์ริตินชนิดอื่น ๆ ก็ได้ ซึ่งหากเราสามารถศึกษาให้ทราบได้ว่าแอนติเฟอร์ริติน

ชนิดใดที่มีความจำเพาะ กับ ไอโซเพอร์ดิโนนน้ำเหลือง ของผู้ป่วยมะเร็งเท่านั้นแล้ว ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการที่จะใช้เพอร์ดิโนนเป็น สารบ่งชี้การเป็นมะเร็ง เพื่อ นำมาใช้ช่วยป้องกันและกำจัดโรคมะเร็งร้ายนี้ให้ได้ผลอย่างดีที่สุด ต่อไป



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title        Serum Ferritin Level in Cancers  
 Name                Mr. Tirasak Pasharawipas  
 Thesis Advisor     Professor Sodsai vejjajiva, M.D.  
 Co-Advisor        Associated Professor Dilok Yenbutra, M.D.  
                          Dr. Petcharin Srivatanakul, Ph.D.  
 Inter-Department Medical Microbiology  
 Academic Year     1986



### Abstract

Ferritin is one of the oncofaetal proteins which was reported that it may be a tumour marker for many kinds of cancers. The purpose of this study is to test serum ferritin levels of cancer patients, especially, in lung cancer in order to evaluate the ferritin in the term of "how suitable to use ferritin as a tumour marker?". In this study, the ferritin level in patients' serum were detected by serological methods against commercially prepared anti-liver ferritin. The ELISA technique which is previously known to be very sensitive and satisfactorily specific method was used. However, simpler methods of the Counter Immuno-electrophoresis (CIEP) and the Radial Immunodiffusion (RID) were also studied. Both methods were tried in order to test the possibility of using them in small laboratories.

Because most of the samples from patients with lung diseases were obtained from males. The discussion was unavoidable focused on the results from male samples. The

results showed that serum ferritin was not useful for the differentiation of lung cancer from other lung diseases. Although the percentage of samples showing high level of serum ferritin was 64.5% (n=31). But other lung patients (inflammatory lung disease, non-treated tuberculosis and pneumonitis) were 52.5% (n=21), 46.4% (n=28) and 42.8% (n=7) respectively. However, the study revealed that serum ferritin might be used for the follow-up of the treatment for tuberculosis patients because the comparison between non-treated tuberculosis and tuberculosis after treated was significantly different in both numbers of samples showing high level of serum ferritin and the average level of serum ferritin in each group (calculated by chi-square test and unpaired t-test, respectively). However, in the case of lung cancer, the usefulness of ferritin for follow-up of the treatment required further studies.

In liver cancer (hepatocellular carcinoma), the percentage of samples showing high level of serum ferritin is 80% (n=25). However, other cancers such as cancers of GI-tract, esophagus, cervix, breast, and others which were randomly selected to study, had no significantly increased of serum ferritin level. So, serum ferritin is less promising to be an effective tumour marker for general diagnosis of cancers.

When testing serum ferritin by the CIEP and the RID method, it was found that the sensitivity of the CIEP is 3  $\mu\text{g/ml}$  and the RID is only 10  $\mu\text{g/ml}$  while almost all of



samples have serum ferritin level less than  $1 \mu\text{g/ml}$  (1000 ng/ml) when tested by ELISA method. So that the sensitivity of both tests were too low to be used.

Ferritin may be potentially employable for diagnosis of a cancer or all cancers if we can find the suitable antiferritin for the test because each ferritin is different in immunological properties. So, if specific ferritin of each cancer or all cancer is discovered, Ferritin might become an effective tumour marker in the future.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ACKNOWLEDGEMENT

The completion of my study at the graduate school, Chulalongkorn University for the Master's Degree in Medical Microbiology and Immunology could never been happened without any heartfully supports and advices of the following persons whom I wish to express my very special thanks to and acknowledge their valuable helps in this thesis. Their great memorable hornors shall be recognized by me and those who find its usefulness forever.

My deeplty appreciation to:

Professor Sodsai Vejjajiva, M.D., (retirement), Immunology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her indispensable advices concerning every important things needed to be done throughout the study.

Associate professor Dilok Yenbutro, M.D., Bacteriology Unit, Depertment of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his valuable advices concerning planning, budget, his memorable care and understanding.

Dr. Petcharin Srivatanakul, Ph.D., Reserch unit, National of Cancer Institute, Medical department, Ministry of public Health, my co-advisor, for her valuable advices

concerning specimen collection, criticism and solving difficult problems.

Associate professor Chaivey Nuchprayoon, M.D. and staff, Lung disease Unit, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,

Associate professor Thira Limsila, M.D., and staff, Department of surgery, Siriraj hospital, Faculty of Medicine, Mahidol University.

Associate professor Sachaphan Israsena, M.D., Gastrointestinal Unit, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Dr. Nalinphan Kangsumrith, M.D., and staff, chemotherapy Unit, The National of Cancer Institute, Medical department, Ministry of Public Health.

Dr. Suchart Daramas, M.D., and staff, Lung Division, Department of Communicable diseases control, Ministry of Public Health,

For their excellent support collecting the specimens and give high morale supporting for the research,

Associate Professor Kaevee Pupaibul, M.D.,  
head of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University, for my opportunity to study this  
thesis.

Associate professor Somponge Chinayon, M.D.,  
Department of Medical Technology, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University, for her valuable advice concerning  
the methods of the laboratorial Quality control.

Miss Somrat charnrit, Department of Preventive  
and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn  
University, for her kindly suggestion and criticism in  
statistically part in this work.

The officers of RIA units (Poshayanont), Radiology  
department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,  
for their supplying sera which had been determined ferritin  
level by the RIA technique.

The officers of the library of Medical party,  
Chulalongkorn University and all persons in the Department  
of Microbiology, for providing facilities needed.

Finally, I am deeply indebted to my family for their  
encouragement and understanding and other persons who gave  
memorable kindness and thier lenience to me, whom I can  
not completely present.

This thesis was supported by the Graduate school,  
and Department of Microbiology, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS



page

THAI ABSTRACT.....	II
ENGLISH ABSTRACT.....	V
ACKNOWLEDGEMENT.....	VIII
CONTENTS.....	XII
LIST OF TABLES.....	XV
LIST OF FIGURES.....	XVI
ABBREVIATIONS.....	XIX
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
Lung Cancer.....	7
Liver Cancer.....	9
Ferritin.....	12
Structure and Properties.....	12
Synthesis and Function.....	20
Previous studies of Ferritin and Malignancies.....	21
Serum Ferritin in Other Diseases..	22

Normal Serum Ferritin Level.....	23
Direction for Study.....	24
The Purpose of the Study.....	26

## II MATERIALS AND METHODS

Instruments.....	27
Reagents	
Commercial Reagent.....	28
Prepared Solution.....	28
Samples of	
Lung Cancer.....	29
Non-Cancer Lung Diseases.....	30
Liver Cancer.....	31
Non Lung and Liver Cancers.....	31
Normal Individuals.....	32
Methods	
Serum Collection.....	32
Determination of Serum Ferritin	
ELISA Technique.....	33
RID Technique.....	38
CIEP Technique.....	38

## III RESULTS

### The Studies of ELISA Technique

Conditions for Tests.....	40
The Precision of the Test.....	44
The Accuracy of the Test.....	45
The Sensitivity of the Test....	45

The RID and the CIEP Technique.....	46
Serum Ferritin Level of Samples.....	47

#### IV DISCUSSION

The Studies of the ELISA Technique...	73
The RID and the CIEP Technique.....	75
The Possibility of Ferritin to be Tumour Marker.....	76
Further Studies.....	83
REFERENCES.....	84
APPENDIX I.....	104
APPENDIX II.....	109
BIOGRAPHY.....	113

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF TABLES

Table	Page
1	Incidence of Registered Cancers (1981).....5
2	The pI values of normal human serum and tissue ferritin from different source.....16
3	The subunit composition of each ferritin.....18
4	The precision study of the modified Anderson and Kelly's ELISA technique.....58
5	Numbers and percentage of each sample group which elevated serum ferritin.....67
6	Values of mean and standard deviation of serum ferritin level in each sample group.....68
7	Comparison of result of unpaired t-test in each sample group.....69
8	Chi-square test between non-treated and during treated non-metastatic lung cancer.....70
9	Chi-square test between non-treated tuberculosis and tuberculosis after treated.....71
10	Cell type of lung cancer showing mean, standard deviation range and percentage of samples which showing elevation of serum ferritin.....72

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 The relationships between tumour burden and the probability of establishing a diagnosis of cancer in various real and hypothetical studies.....	4
2 Incidence and mortality of each cancer (the data of SEER programs).....	10
3 Structure of ferritin .....	14
4 Different motives of each ferritin in isoelectric focusing technique (IEF).....	15
5 Different motives of subunit composition of each ferritin.....	17
6 Difference in immunological reaction of different ferritin.....	19
7 Diagram of Anderson and Kelly's ELISA technique...35	35
8 Diagram of modified Anderson and Kelly's ELISA technique.....	36
9 Diagram of an ELISA plate showing pattern for applying samples.....	37
10 The comparison of incubating temperature at room temperature and at 37°C (water bath) for the reaction of ferritin with antiferritin and peroxidase conjugated antiferritin with ferritin of the ELISA technique.....	49
11 Incubation period for the reaction of ferritin with antiferritin of the ELISA technique when varied to be 15, 30, and 60 minutes for comparison.....	50

12	Incubation period for the reaction of peroxidase conjugated antiferritin with ferritin of the ELISA technique when varied to be 15, 30, and 60 minutes for comparison.....	51
13	The comparison of incubation period between 15,15 minutes and 30,30 minutes for the reactions of ferritin with antiferritin and peroxidase conjugated antiferritin with ferritin of the ELISA technique.....	52
14	The comparison of the ELISA technique using various dilution of antiferritin for coating plate.....	53
15	The comparison of the ELISA technique using various volumes of peroxidase conjugated antiferritin for test.....	54
16	The precision of ELISA technique in low level serum control.....	55
17	The precision of the ELISA technique in medium level serum control.....	56
18	The precision of the ELISA technique in high level serum control.....	57
19	Correlation curve of modified Anderson and Kelly's ELISA technique and RIA technique.....	59
20	Photograph of ELISA technique result.....	60
21	The sensitivity curve of modified Anderson and Kelly's ELISA technique.....	61
22	Photograph of the RID pattern in RID technique....	62
23	The standard curve of the RID technique.....	63

24	Photograph of the CIEP pattern in CIEP technique..	64
25	Results of serum ferritin level of studios samples.....	65
26	The standard curve of the RIA technique.....	112



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATION

Ab	Antibody
AFP	Alpha-1-Faetoprotein
Ag	Antigen
°C	Degree Celcius
Ca	Cancer
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CIEP	Counter Immunoelctrophoresis
CV	Coefficient of variation
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
met	Metastasis
ml	Millilitre
n	Numbers
ng	Nanogram
no.	Numbers
O.D.	Optical density
pg	Picogram
r	Coefficient corration
RIA	Radio Immuno Assay
RID	Radial Immunodiffusion
rpm.	Rotate per minute
RT.	Room temperature
S.D.	Standard deviation
µg	Microgram
WHO	World Health Organization
$\bar{X}$	Mean
$\chi^2$	Chi-square
yrs.	Years(ages)