การแสดงออกของ แอนเน็กซิน เอ-วัน และ ยูซีเอช-แอลวัน ในเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวโรเอพิธีเลี่ยม

นางสาวกนกกาญจน์ ทาแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EXPRESSION OF ANNEXIN A1 AND UCH-L1 IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEUROEPITHELIAL TUMORS

MISS KANOKKARN TAKAEW

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของ แอนเน็กซิน เอ-วัน และ ยูซีเอช-แอลวัน ในเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวโรเอพิธีเลี่ยม
โดย	นางสาวกนกกาญจน์ ทาแก้ว
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชนพ ช่วงโชติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชนพ ช่วงโชติ)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายแพทย์ทรงคุณ วิญญูวรรธน์)

กนกกาญจน์ ทาแก้ว: การแสดงออกของ แอนเน็กซิน เอ-วัน และ ยูซีเอช-แอลวัน ในเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวโรเอพิธีเลี่ยม (EXPRESSION OF ANNEXIN A1 AND UCH-L1 IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEUROEPITHELIAL TUMORS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ชนพ ช่วงโชติ, 69 หน้า

<u>ที่มาและปัญหา</u>: ในการวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาของเนื้องอกกลุ่ม neuroepithelial tumorนั้น อาจจะเกิดปัญหาได้เนื่องจากลักษณะ histology ที่คล้ายคลึงกัน และเนื้องอกหลายชนิดที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันก็มักจะให้ผลต่อการย้อม immunohistochemistry เหมือนกัน ดังนั้นการค้นหา marker ใหม่ๆจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากในการวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกในกลุ่มนี้

<u>วัตถุประสงค์</u>: ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroeithelial tumor เพื่อพิจรณาสำหรับการนำไปใช้เป็น marker ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกในกลุ่มนี้

<u>วิธีการทดลอง</u>: ใช้เทคนิค tissue microarray และ immunohistochemistry ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroepithelial 16 ชนิด จำนวน 223 ตัวอย่าง

<u>ผลการทดลอง</u>: โปรตีน Annexin A1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma ส่วนใหญ่ (92%) แต่ใน central neurocytoma (P=0.0000002) และ medulloblastoma ($p<10^{-8}$) กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ โปรตีน UCH-L1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด glioblastoma สูงกว่าใน pilocytic astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.001) และจากการพิจารณาการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ร่วมกันพบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดมีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astrocytoma น้อยกว่าใน ependymoma อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0000009) นอกจากนี้ยังพบว่า Annexin A1 และ UCH-L1 มีการแสดงออกที่แปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่เพิ่มสูงขึ้น

<u>สรุปผลการทดลอง</u>: Annexin A1, UCH-L1 และ combined marker ระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิดน่าจะเป็น marker ที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกกลุ่ม neuroepithelial tumor ได้ และการแสดงออกที่แปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่สูงขึ้นนั้นก็อาจบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาของเซลล์จาก low-grade ไปเป็น high-grade astrocytoma

สาขาวิชา <u>วิทยาศาสตร์การแพทย์</u> ลายมือชื่อนิสิต...

ปีการศึกษา <u>2554</u> ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก……........................

5274845830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : ANNEXIN A1, UCH-L1, NEUROEPITHELIAL TUMOR, IMMUNOHISTOCHEMISTRY

KANOKKARN TAKAEW: EXPRESSION OF ANNEXIN A1 AND UCH-L1 IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEUROEPITHELIAL TUMORS. THESIS ADVISOR: PROF. SHANOP SHUANGSHOTI, MD. 69 pp.

Background: Pathological diagnosis of CNS neuroepithelial tumors can be problematic due morphological similarity, and many tumors in the group also share immunohistochemical profile as they have common cellular origin. New immunohistochemical marker is needed to enhance diagnosis.

Objective: To study Annexin A1 and UCH-L1 expression in CNS neuroepithelial tumors, with regard to a possible application of these markers for practical usage.

Methods: Expression of Annexin A1 and UCH-L1 was evaluated in 223 various neuroepithelial tumors by immunohistochemistry using tissue microarray.

Results: Annexin A1 was expressed by the majority of ependymoma (92%) but none of central neurocytoma (p = 0.0000002) and medulloblastoma ($p < 10^{-8}$). UCH-L1 expression level was significantly higher in glioblastoma than in pilocytic astrocytoma (p=0.001). Absence of Annexin A1 and/or UCH-L1 was associated with low-grade astrocytoma rather than ependymoma (p = 0.0000009). Percentage of positive Annexin A1 and UCH-L1 paralleled increasing histologic grades in diffuse astrocytomas.

Conclusion: Annexin A1, UCH-L1 and combined Annexin A1/UCH-L1 may be the additional markers that useful in the differential diagnosis of neuroepithelial tumors. Upregulation of Annexin A1 and UCH-L1 in increasing histologic grade of diffuse astrocytomas suggests their roles in the malignant transformation.

Field of Study : Medical Sciences Student 's Signature ....

Academic Year : 2011 Advisor 's Signature......................................

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ชนพ ช่วงโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำงาน รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีชา เรืองวรเวชชัย คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่คอยให้คำแนะนำ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านการทำแล็บจนงานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้องครอบครัวทาแก้ว ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ภาษาไทย……………………………………………………………………………..................ง

บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ..จ

กิตติกรรมประกาศ...ฉ

สารบัญ...ช

สารบัญตาราง ....ฌ

สารบัญภาพ ....ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ....ฏ

บทที่ 1. บทนำ..1

บทที่ 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง …………………………………………………………..9

2.1 แนวคิดและทฤษฎี...9

2.2 ทฤษฎีและหลักการของ immunohistochemistry……………………………………………..10

2.3 การแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1…………………………………………….16

2.4 Neuroepithelial Tumors ……………………………………………………………......18

บทที่ 3. วิธีดำเนินการวิจัย …………………………………………………………………...36

3.1 การคำนวณขนาดประชากร …………………………………………………….....,37

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย …………………………………………..…...38

3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย ………………………………………………………………..40

หน้า

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง 40

3.3.2 การทำ tissue microarray 40

3.3.3 การย้อม H&E 42

3.3.4 การย้อม immunohistochemistry 42

3.3.5 การบันทึกผล 43

3.3.6 การคำนวนค่าการแสดงออกของโปรตีน 46

3.3.7 การคำนวนค่าทางสถิติ 46

บทที่ 4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 47

4.1 ผลการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆ 47

4.2 ผลการแสดงออกของโปรตีน UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆ 49

4.3 ผลการแสดงออกของ Annexin A1 ร่วมกับ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor............51

บทที่ 5. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 54

รายการอ้างอิง 59

ภาคผนวก 64

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 69

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 การจัดจำแนกกลุ่มของ neuroepithelial tumor ตามการจัดจำแนกของ WHO ปี พ.ศ. 2550 19

2 ชนิดและ WHO grade ของเนื้องอก neuroeithelial tumor ที่ใช้ในการศึกษา 36

3 ผลการนับเซลล์จากการ random ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 1+ และ 2+.....45

4 ผลการแสดงออกของ Annexin A1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆ 47

5 ผลการแสดงออกของ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆ 49

6 ผลการแสดงออกของ Annexin A1 ร่วมกับ UCH-L1 ใน neuroepithelia tumor ชนิดต่างๆ 51

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 direct และ indirect method ของ immunohistochemistry ……………………………..………...11

2 Peroxidase anti – Peroxidase (PAP) method ……………………………………………….. 12

3 Avidin – Biotin Complex (ABC) method …………………………………………………... 13

4 Labeled Streptavidin – Biotin Complex (LSAB) method …………………………………... 14

5 Chain Polymer – Conjugated method …………………………………………..……… 16

6 ลักษณะ histology ของ pilocytic astrocytoma ……………………………………………….. 22

7 ลักษณะ histology ของ fibrillary astrocytoma ………………………………………….......24

8 ลักษณะ histology ของ anaplastic astrocytoma ………………………………...……25

9 ลักษณะ histology ของ glioblastoma ……………………………………………………………..26

10 ลักษณะ histology ของ oligidendroglioma ………………………………………………...… 27

11 ลักษณะ histology ของ ependymoma …………………………………………………………...29

12 ลักษณะ histology ของ anplastic ependymoma ……………………………………….……… 30

13 ลักษณะ histology ของ choroid plexus papilloma …………………………………………….. 31

14 ลักษณะ histology ของ central neurocytoma …………………………………………………...32

15 ลักษณะ histology ของ ganglioglioma …………………………………………………………33

16 ลักษณะ histology ของ medulloblastoma ………………………………………………………34

17 ระดับการแสดงออกของโปรตีน (immunoreactive score) ………………………………………..43

18 ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 1+ ……………………………………..… 44

19 ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 2+ ……………………………………..… 44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ		คำเต็ม
PNET	=	Primitive neuroectodermal tumor
GBM	=	Glioblastoma multiforme
DNET	=	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor
AT/RT	=	Atypical teratoid / rhabdoid tumor
PXA	=	Pleomorphic xanthoastrocytoma
UCH-L1	=	Ubiquitin carboxy – terminal esterase L1
GFAP	=	Glial fibrillary acidic protein
EGFR	=	Epidermal growth factor receptor
TMA	=	Tissue microarray
FFPE	=	Formalin–fixed paraffin-embedded
PAP	=	Peroxidase anti-peroxidase
APPAP	=	Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase
HRP	=	Horseradish peroxidase
ABC	=	Avidin-biotin complex
LSAB	=	Labeled streptavidin-biotin complex
MAPK / ERK	=	Mitogen-activated protein kinase / extracellular regulated kinase

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื้องอกระบบประสาทที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวโรเอพิธีเลี่ยม (Neuroepithelial tumor) เป็นเนื้องอกปฐมภูมิกลุ่มใหญ่ของระบบประสาท ถูกจัดแบ่งชนิดตามเซลล์ที่เชื่อว่าเป็นต้นกำเนิดซึ่งเป็นเซลล์ที่แตกตัว (differentiate) มาจากเซลล์เยื่อบุท่อประสาทในระยะตัวอ่อน อันได้แก่ เซลล์ประสาท (neuron), เซลล์เกลีย (glial) ที่ประกอบด้วย astrocyte oligodendroglia และ ependyma, เซลล์เยื่อบุของ choroid plexus และ pineocyte ของต่อมไพเนียล เนื้องอกกลุ่มนี้ประกอบด้วยเนื้องอกชนิดรุนแรงน้อยหรือเนื้องอกเกรดต่ำ (WHO เกรด I และ II) ไปจนถึงชนิดรุนแรงมากหรือเนื้องอกเกรดสูง (WHO เกรด III และ IV) ตามการจัดจำแนกขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี พ.ศ. 2550 [1-3]

ในบางครั้งการวินิจฉัยแยกโรคทางพยาธิวิทยาของเนื้องอกในกลุ่ม neuroepithelial tumor ก็ทำได้ยาก เนื่องจากเนื้องอกหลายชนิดมีลักษณะทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ (histopathology) ที่คล้ายคลึงกัน อิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry) จึงได้เข้ามามีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคเป็นอย่างมาก ถึงกระนั้น การวินิจฉัยโรคก็ยังมีปัญหาอยู่ในหลาย ๆ ราย โดยเฉพาะในกรณีที่พยาธิแพทย์ได้รับสิ่งส่งตรวจปริมาณน้อย การหา marker ใหม่ ๆ จึงยังเป็นสิ่งจำเป็น ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย

อิมมูโนฮีสโตเคมีเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนหรือการแสดงออก (expression) ของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ วิธีนี้จะช่วยวินิจฉัยแยกโรคที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันได้ [4] ปัจจุบันมีการผลิตแอนติบอดีตัวใหม่ ๆ ออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนชนิดใหม่ในเนื้องอกชนิดต่าง ๆ มากมาย การเลือกโปรตีนที่จะนำมาศึกษานั้นอาจจะเลือกจากโปรตีนที่มีข้อมูลว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดเนื้องอก (tumorigenesis) [5, 28] หรืออาจเลือกจากโปรตีนที่ทราบข้อมูลการแสดงออกในเนื้องอกชนิดนั้น ๆ แล้วจากการศึกษาโดยวิธีโปรตีโอมิกส์ (proteomics) [6, 32] ซึ่งเป้าหมายหลักอย่างหนึ่งของการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนก็คือ เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้โรค (disease biomarker) เพื่อวินิจฉัยโรคต่างๆให้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

จากการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเนื้องอก ependymoma และ primitive neuroectodermal tumor (PNET) พบว่าโปรตีน Annexin A1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma แต่ไม่แสดงออกใน PNET [7] และจากการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเนื้องอก glioblastoma (GBM) พบโปรตีน UCH-L1 (ubiquitin carboxy-terminal esterase L1) มีการแสดงออกในบริเวณเซลล์มะเร็งเกรดต่ำ (เกรด II) ที่อยู่ในก้อน GBM และโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกน้อยลงหรือไม่แสดงออกเลยในบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งเกรดสูง (เกรด III-IV) [8] จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ ว่าจะสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรคในทางพยาธิวิทยาได้หรือไม่

Annexin A1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ calcium binding anti-inflammatory protein ต่อต้านการเกิดการอักเสบโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 และยับยั้งการสังเคราะห์สาร eicosanoid ซึ่งเป็น mediator ในกระบวนการอักเสบ [9] มีข้อมูลว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ (proliferation), การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiation), การตายของเซลล์แบบ apoptosis [10-12, 39-40] และนอกจากนี้ยังมีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด [16-20, 28-29] ส่วน UCH-L1 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญใน proteasome pathway ทำหน้าที่ย้ายโมเลกุลของ ubiquitin ออกจากโปรตีนที่จะถูกทำลาย, นำ ubiquitin จากโปรตีนที่ถูกทำลายกลับมาใช้ใหม่ และเชื่อมต่อโมเลกุลของ ubiquitin ในโปรตีนที่จะถูกทำลาย [13] มีข้อมูลว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ (proliferation), การตายของเซลล์แบบ apoptosis [14-15] และมีการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิด [8, 30-32]

เนื่องจากโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีการแสดงออกในเนื้องอกบางชนิดในกลุ่ม neuroepithelial tumor ซึ่งได้แก่ ependymoma และ diffuse astrocytoma อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์การเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง และการตายของเซลล์แบบ apotosis ซึ่งล้วนแต่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดเนื้องอก (tumorigenesis) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor ด้วยเทคนิค immunohistochemistry และ tissue microarray (TMA) เพื่อพิสูจน์สมมติฐานที่ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดน่าจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้องอกแต่ละชนิด ซึ่งข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกเนื้องอกบางชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ (histopathology) ที่คล้ายคลึงกัน อันจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยเนื้องอกของระบบประสาทต่อไปในอนาคต

คำถามงานวิจัย

โปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 มีการแสดงออกที่แตกต่างใน neuroepithelial tumor แต่ละชนิดหรือไม่ และการแสดงออกที่แตกต่างกัน สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor เพื่อพิจารณาสำหรับการนำไปใช้เป็น marker ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกในกลุ่มนี้

สมมติฐานของการวิจัย

โปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 น่าจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันใน neuroepithelial tumor และการแสดงออกที่แตกต่างกัน น่าจะช่วยในการวินิจฉัยแยกโรค

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อทุกตัวอย่างต้องผ่านการวินิจฉัยตาม WHO ปีพ.ศ. 2550 โดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญและทำการ review ซ้ำอีกครั้งเพื่อคัดเลือกชิ้นเนื้อตัวอย่างสำหรับใช้ในการศึกษาโดยพยาธิแพทย์ท่านเดิม
2. สำหรับชิ้นเนื้อที่จะใช้ทำ tissue microarray (TMA) block ต้องผ่านเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษาโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ
3. ข้อมูลตัวอย่างทั้งหมดถูกปิดบังไว้สำหรับผู้ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อป้องกันอคติในการวัดผลการทดลอง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Tissue microarray	คือการเจาะเอาชิ้นเนื้อในบริเวณที่ต้องการศึกษาจาก paraffin block หลายๆ block มารวมอยู่ใน paraffin block เดียวกัน ซึ่งสามารถบรรจุชิ้นเนื้อได้หลายร้อยชิ้น โดยจำนวนของชิ้นเนื้อที่บรรจุอยู่ใน block ขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อ
Immunohistochemistry	คือเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนภายในเนื้อเยื่อ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะไปจับกับแอนติเจนภายในเนื้อ เพื่อให้ทราบว่ามีแอนติเจนอยู่ในเนื้อเยื่อหรือไม่ และถ้ามีอยู่ในตำแหน่งใด
Neuroepithelial Tumor	คือเนื้องอกในระบบประสาทที่มีต้นกำเนิดมาจากนิวโรเอพิธีเลี่ยม จัดเป็นเนื้องอกกลุ่มใหญ่ของระบบประสาทซึ่งประกอบด้วยเนื้องอกตั้งแต่เกรด I ไปจนถึงเกรด IV

คำสำคัญ

Annexin A1, UCH-L1, neuroepithelial tumor, immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

สืบค้นชิ้นเนื้อตัวอย่างจากฐานข้อมูลของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และรวบรวมเนื้องอกชนิดต่างๆที่อยู่ในกลุ่ม neuroepithelial tumor จำนวน 16 ชนิด

พยาธิแพทย์ตรวจสอบสไลด์ H&E ของชิ้นเนื้อที่รวบรวมได้ เพื่อทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อที่จะใช้ในการศึกษา พร้อมทั้งกำหนดตำแหน่งที่ต้องการศึกษาของชิ้นเนื้อที่คัดเลือกได้

เจาะชิ้นเนื้อตรงตำแหน่งที่พยาธิแพทย์กำหนดไว้ และรวบรวมชิ้นเนื้อเหล่านั้นจาก paraffin block หลายๆ block ให้มารวมอยู่ใน paraffin block เดียวกันโดยใช้เทคนิค tissue microarray

ตัด section ชิ้นเนื้อบน tissue microarray block ให้มีความหนาประมาณ 3 ไมครอน

ย้อม H&E เพื่อตรวจสอบว่าตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาจาก paraffin block ของตัวอย่างตรงกับตำแหน่งที่พยาธิแพทย์เลือกไว้หรือไม่

ย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีโดยใช้ antibody 2 ชนิดได้แก่ Annexin A1 และ UCH-L1

วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. เนื่องจากเนื้องอกบางชนิดเป็นชนิดที่หายาก ทำให้จำนวนตัวอย่างของเนื้องอกชนิดนั้นๆ ที่จะใช้ในการศึกษามีจำนวนค่อนข้างน้อย
2. เนื่องจากเนื้องอกที่นำมาทำ TMA block นั้นมาจากต่าง block กันทำให้ชิ้นเนื้อมีความหนาไม่เท่ากัน บางตัวอย่างอาจตัดหมดก่อนตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถย้อมแอนติบอดี้ได้ครบทั้งสองชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกระบบประสาทกลุ่ม neuroepithelial tumor
2. สามารถนำข้อมูลหรือองค์ความรู้ที่ได้รับจากการศึกษามาประยุกต์ใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคของเนื้องอกในกลุ่ม neuroepithelial tumor ได้ในอนาคต
3. สามารถนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติ รวมถึงตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารที่เกี่ยวข้องในด้านของมะเร็งและพยาธิวิทยาได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. Sample collection (การเก็บตัวอย่าง)

ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้น จะอยู่ในรูป formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ซึ่งผ่านการวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histology) ว่าเป็นเนื้องอกในกลุ่ม neuroepithelial tumor จากพยาธิแพทย์ โดยรวบรวมชิ้นเนื้อจากฐานข้อมูลภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2553 ซึ่งเป็นชิ้นเนื้อที่เก็บไว้หลังการตรวจตามปกติ โดยไม่ได้มีการเปิดเผยข้อมูลความลับของเจ้าของชิ้นเนื้อ

2. Method (วิธีการทดลอง)

2.1) ขั้นตอนการทำ tissue microarray block

พยาธิแพทย์ทำการกำหนดตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาบนแผ่นสไลด์ที่ย้อมสี hematoxylin-eosin (H&E) แล้วนำแผ่นสไลด์ไปเทียบกับหน้าตัดของชิ้นเนื้อบน paraffin block ว่ามีรูปร่างลักษณะตรงกันหรือไม่ จากนั้นทำการเจาะชิ้นเนื้อบน paraffin block ด้วยแท่งเหล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 มม. ตรงตำแหน่งที่กำหนดไว้ แล้วนำชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาไปจัดเรียงเป็นแถวบน mold ที่จะใช้เป็นแบบ block จากนั้นทำการฝังชิ้นเนื้อลงใน paraffin (embleded) เพื่อให้ชิ้นเนื้อทั้งหมดรวมอยู่ใน paraffin block เดียวกัน

2.2) ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมี

นำชิ้นเนื้อบน tissue microarray block มาตัด section ให้มีความหนา 3 ไมครอน จำนวน 3 สไลด์ (2 สไลด์สำหรับการย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมี และ 1 สไลด์สำหรับย้อม H&E เพื่อตรวจสอบว่าตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาตรงกับตำแหน่งที่เลือกไว้หรือไม่) หลังจากนั้นนำสไลด์ไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60 °c ใช้เวลาอบประมาณ 4 ชั่วโมง

2.3) ขั้นตอนการย้อมอิมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry)

นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไปย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีโดยใช้เครื่องย้อมอัตโนมัติ Ventana automated immunostainer (Ventana, USA) โดยใช้แอนติบอดี 2 ชนิด ได้แก่ polyclonal rabbit anti–UCH-L1 (Invitrogen, USA) ในอัตราส่วน (dilution) 1: 1000 และ monoclonal mouse anti–Annexin A1 (Cell Marque, USA) ในอัตราส่วน 1:100 และใช้ชุด Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA) ในการตรวจสอบแอนติเจน

2.4) ขั้นตอนการเก็บข้อมูล

บันทึกข้อมูลการแสดงออกของโปรตีนซึ่งมีระดับการแสดงออกตั้งแต่ระดับ 0 ถึง 3+ ตาม immunoreactive score ซึ่งได้แก่

0 = ไม่มี positive tumor cell

1+ = มี positive cell น้อยกว่า 10 % ของ tumor cell ทั้งหมด

2+ = มี positive cell ตั้งแต่ 10-50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

3+ = มี positive cell มากกว่า 50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

โดยกำหนดให้ score 0 และ 1+ ให้ผล nagative และ score 2+ และ 3+ ให้ผล positive [37]

2.5) ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของโปรตีน (immunoreactivity) ในเนื้องอกแต่ละชนิด และเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกโรคโดยใช้วิธี Chi-Square test

ลำดับขั้นตอนในการนำเสนอผลการวิจัย

1. คำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor แต่ละชนิด
2. เปรียบเทียบร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกโรค รวมทั้งคำนวนค่าความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Chi-Square test
3. วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่ใกล้เคียงกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกระบบประสาทในกลุ่ม neuroepithelial tumor ต่อไปในอนาคต
4. สรุปผลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลและนำเสนอผลงานวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ในการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยานั้นโดยทั่วไปแล้วจะวินิจฉัยเนื้อเยื่อจากการย้อมสี Hematoxylin-Eosin แต่ในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้แน่นอนจากการศึกษาเนื้อเยื่อโดยวิธีดังกล่าว การย้อมพิเศษต่างๆจึงถือเป็นตัวช่วยที่มีประโยชน์ค่อนข้างมากในการวินิจฉัยโรค สำหรับเนื้องอกในกลุ่มของ neuroepithelial tumor ก็เช่นเดียวกัน เนื่องจากเนื้องอกในกลุ่มนี้หลายๆชนิดนั้นมีลักษณะทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อที่คล้ายคลึงกันซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนและความไม่แน่ใจในการวินิจฉัยได้ การย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry) จึงได้เข้ามามีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคเป็นอย่างมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ตัวอย่างสำคัญเช่น GFAP (glial fibrillary acidic protein) ซึ่งช่วยบอกถึง glial differentiation ของเนื้องอก และ Synaptophysin ที่บ่งบอกถึง neuronal differentiation [43-44] แต่ถึงกระนั้น marker ทั้งสองชนิดนี้ก็ยังไม่สามารถแยกเนื้องอกที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ดังนั้นการหา marker ใหม่ๆจึงยังเป็นสิ่งจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคของเนื้องอกกลุ่มนี้

ในการค้นหาตัวบ่งชี้โรคหรือ marker ใหม่ๆเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคให้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้นนั้นมักจะเริ่มต้นจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน โดยการเลือกโปรตีนทีจะนำมาศึกษานั้นอาจจะเลือกจากโปรตีนที่มีข้อมูลว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดเนื้องอก (tumorigenesis) [5, 27] หรืออาจเลือกจากโปรตีนที่ทราบข้อมูลการแสดงออกในเนื้องอกชนิดนั้นๆแล้วจากการศึกษาโดยวิธี proteomics analysis [6, 31] ซึ่งจากการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเนื้องอก ependymoma และ primitve neuroectodermal tumor (PNET) นั้น พบว่าโปรตีน Annexin A1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma แต่ไม่แสดงออกใน PNET [7] และจากการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเนื้องอก glioblastoma (GBM) พบว่าโปรตีน UCH-L1 มีการแสดงออกในบริเวณเซลล์มะเร็งเกรดต่ำ (เกรด II) ที่อยู่ในก้อน GBM และโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกน้อยลงหรือไม่แสดงออกเลยในบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งเกรดสูง (เกรด III-IV) [8] จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ได้

ข้อสันนิษฐานว่าโปรตีนทั้งสองชนิดน่าจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้องอกแต่ละชนิดซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยเนื้องอกในกลุ่ม neuroepithelial tumor ได้

สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายรวมถึงในการศึกษาครั้งนี้ด้วยคือเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนต่างๆทั้งที่อยู่บนผิวเซลล์ ภายในเซลล์และภายในนิวเคลียส โดยใช้แอนติบอดี้ที่จำเพาะเข้าไปจับกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อ [4] ในปัจจุบันเทคนิคนี้สามารถทำได้ทั้งวิธีการย้อมแบบ manual และใช้เครื่องย้อมแบบ automate ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสมกับลักษณะและความพร้อมของแต่ละห้องปฏิบัติการ และเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ใช้เวลาในการทำไม่นานทำให้ได้ผลออกมาค่อนข้างเร็ว และค่าใช้จ่ายสำหรับเทคนิคนี้ก็ไม่สูงมาก อีกทั้งยังมีการผลิตแอนติบอดี้ตัวใหม่ๆออกมาอย่างต่อเนื่อง [38] ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สะดวกสำหรับใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในงานวิจัยทางการแพทย์รวมถึงการวินิจฉัยโรคใน clinical routine อีกด้วย

ทฤษฎีและหลักการของ immunohistochemistry

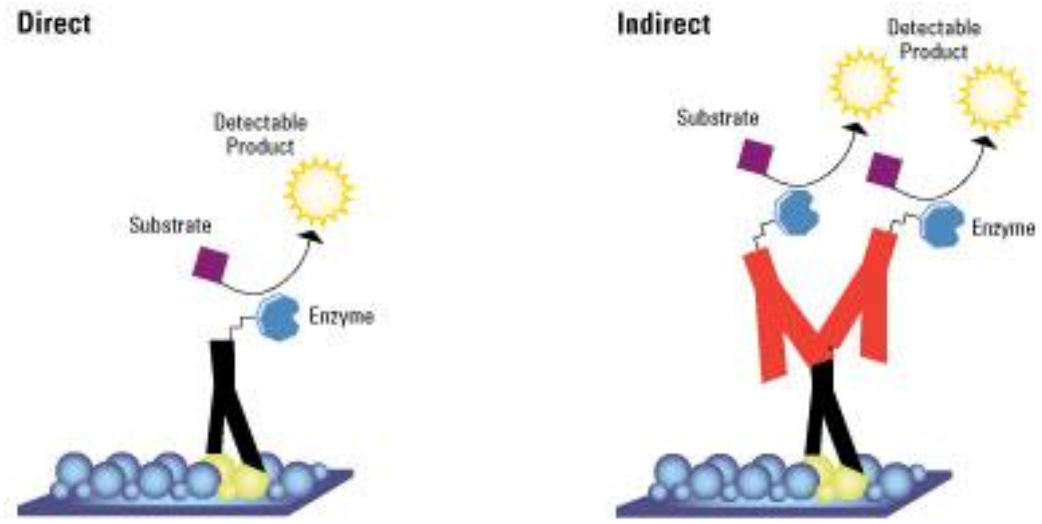
การตรวจด้วยวิธีอิมูโนฮีสโตเคมีเป็นเทคนิคการย้อมพิเศษเพื่อตรวจสอบแอนติเจนหรือการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ โดยการใช้ antibody ที่มีความจำเพาะสำหรับ antigen แต่ละชนิดเป็นตัวจับกับ antigen นั้นๆในเนื้อเยื่อ มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคจากเนื้อเยื่อในกรณีที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอนจากการศึกษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการย้อม H&E

การศึกษาทางอิมมูโนสำหรับเนื้อเยื่อเริ่มมีขึ้นประมาณปี ค.ศ. 1941 โดยในระยะแรกนั้นการศึกษาจะมีเฉพาะวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescence) ซึ่งเป็นการใช้สารเรืองแสงติดฉลากกับ antibody แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดหลายๆอย่างคือ ต้องใช้เนื้อสดในการศึกษา ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และนอกจากนี้สารเรืองแสงยังเสื่อมสภาพเร็วเมื่อถูกแสงสว่างจึงต้องเก็บสไลด์ในตู้เย็นซึ่งเก็บได้ไม่นานจะเก็บได้เฉพาะรูปถ่ายเท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ถือเป็นวิธีการบุกเบิกในการศึกษาพัฒนาเทคนิคและวิธีการใหม่ๆสำหรับ immunohistochemistry โดยในระยะต่อมามีผู้ค้นคว้านำ enzyme มาติดกับ antibody เพื่อใช้แทนสารเรืองแสง ซึ่งวิธีนี้สามารถ

ศึกษาจาก paraffin section ได้ สามารถเก็บสไลด์เป็นสไลด์ถาวรได้ และสามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ Immunohistochemistry แบ่งออกเป็น 2 method ใหญ่ๆ ได้แก่

Direct method

เป็นวิธีการใช้ antibody ที่ conjugate กับ enzyme ไว้แล้วมาจับกับ antigen บนเนื้อเยื่อ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ก็ได้แก่ peroxidase และ alkaline phosphatase ซึ่งเมื่อ enzyme ทำปฏิกิริยากับ substrate อย่าง hydrogenperoxide แล้ว เมื่อหยด chomogen ลงไปจะปรากฏสีตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มี antibody ไปจับกับ antigen อยู่ และเนื่องจาก antibody หนึ่งตัวสามารถ conjugate กับ enzyme ได้เพียงแค่ตัวเดียวทำให้วิธีการนี้มี sensitivity ค่อนข้างน้อย [4]



รูปที่ 1. แสดง method ของ immunohistochemistry ทั้งแบบ direct และ indirect method (อ้างอิงรูปจาก www.piercenet.com/browse.cfmfldID=5E986FD4-A5D1-05EB-3A4D-A1DE7D348FEE)

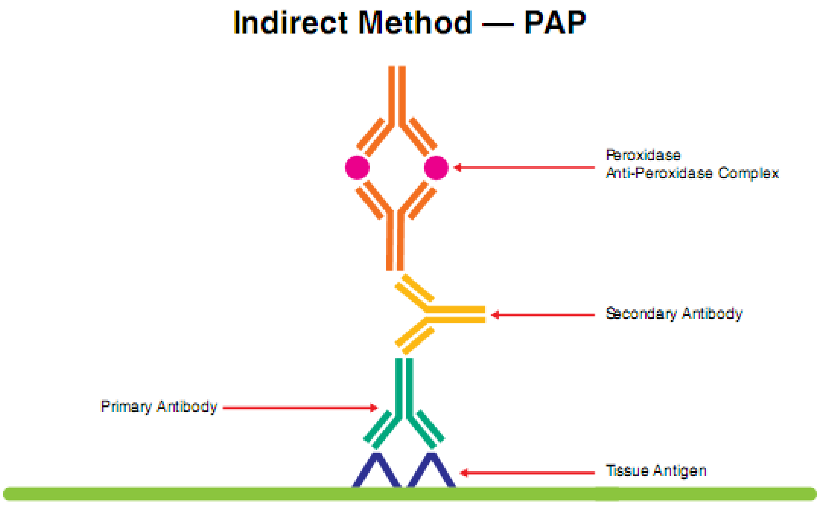
Indirect method

เป็นวิธีการที่ใช้ antibody 2 ชนิด ชนิดแรกคือ primary antibody ซึ่งเป็น antibody ที่มีความจำเพาะกับ antigen ที่ต้องการตรวจหาบนเนื้อเยื่อ และชนิดที่สองคือ secondary antibody ที่ conjugate กับ enzyme ไว้แล้ว ซึ่ง secondary antibody นั้นจะต้องมีคุณสมบัติที่จะสามารถจับกับ primary antibody ได้ โดยเตรียมจากสัตว์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้เตรียม primary antibody

Indirect method สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 เทคนิค ได้แก่

1. <u>Unlabelled antibody method</u>

เป็นการใช้ secondary antibody เป็นตัวเชื่อมระหว่าง primary antibody กับ teriary antibody ที่มี enzyme complex ซึ่งได้แก่ peroxidase anti-peroxidase complex (PAP) และ alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (APAAP) conjugate อยู่ เมื่อ enzyme และ substrate ทำปฏิกิริยากันแล้ว เมื่อหยด chomogen ลงไปก็จะสามรถ detect ตำแหน่งที่ antibody และ antigen จับกันอยู่ได้ [4]



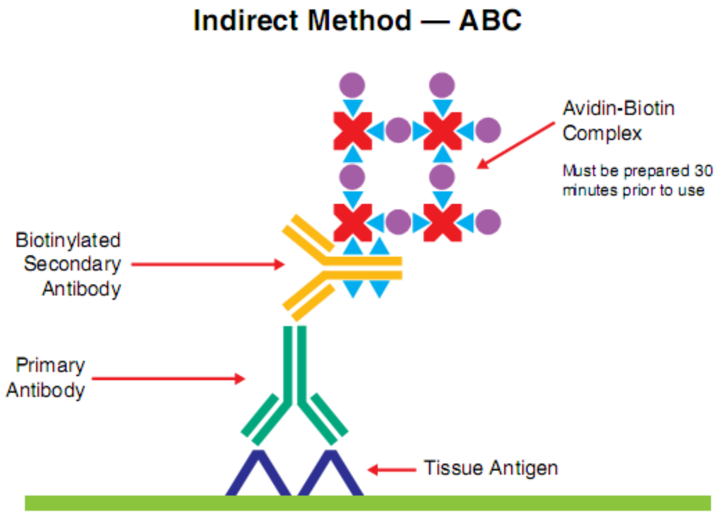
รูปที่ 2. แสดงภาพ Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) method (อ้างอิงรูปจาก www.dako.com/dist/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_9.pdf)

2. (Strept) Avidin-Biotin technology

เทคนิคนี้เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1981 เป็นวิธีการที่อาศัยคุณสมบัติในการจับตัวกันของ avidin และ biotin ที่จะจับตัวกันอย่างแน่นหนาและจำเพาะเจาะจง เป็นเทคนิคที่ยังใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 method ได้แก่

2.1) Avidin-Biotin Complex (ABC) method

Avidin เป็นไกลโคโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของไข่ขาวและมี structure เป็นรูปสี่เหลี่ยมที่มี binding site 4 ด้านสำหรับที่จะให้ biotin เกาะได้ ส่วน biotin นั้นเป็น B-complex vitamin ที่มีน้ำหนักเบาซึ่งสามารถที่จะ conjugate กับ secondary antibody และ เอนไซม์ได้ ซึ่งใน method นี้นั้น secondary antibody จะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่าง primary antibody และ avidin-biotin-peroxidase complex [45]

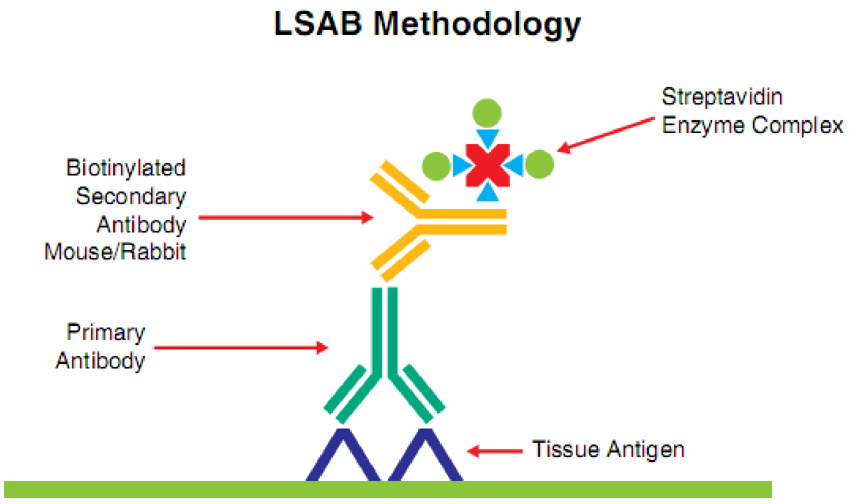


รูปที่ 3. แสดงภาพ Avidin-Biotin Conplex (ABC) method (อ้างอิงรูปจาก www.dako.com/dist/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_9.pdf)

2.2) Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) method

เนื่องจาก avidin เป็นส่วนประกอบของไข่ขาวจึงมี oligosaccharide residue ของไข่ขาวติดมาด้วย และสารดังกล่าวมักจะไปจับกับ nonspecific lecitin-like ที่อยู่บนเนื้อเยื่อทำเกิดสีที่ไม่จำเพาะหรือ nonspecific staining ต่อมาจึงมีการใช้สาร streptavidin ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Streptomycesavidinii ซึ่งมีคุณสมบัติในการจับกับ biotin เช่นเดียวกันกับ avidin มาใช้ทดแทน avidin ซึ่งสารตัวนี้จะมีส่วนประกอบที่เป็น carbohydrate moieties น้อยกว่า ทำให้มีการเกิด nonspecific staining น้อยกว่าการใช้ avidin [45]

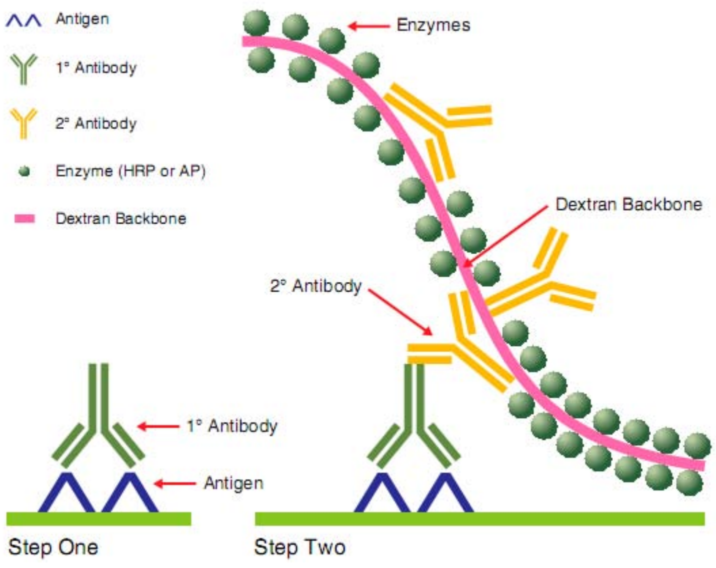
สำหรับใน ABC และ LSAB method นั้น primary antibody หนึ่งตัวจะสามรถ link กับ enzyme ได้หลายๆตัวทำให้สัดส่วนของจำนวน enzyme ต่อ antibody นั้นมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคเดิมๆอย่าง direct peroxidase-conjugated method ซึ่งจากสัดส่วนที่สูงขึ้นทำให้ method ทั้งสองมี sensitivity ที่เพิ่มสูงขึ้น [45-46]



รูปที่ 4. แสดงภาพ Labeled Streptavidin-Biotin Conplex (LSAB) method (อ้างอิงรูปจาก www.dako.com/dist/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_9.pdf)

3. Chain polymer-conjugated technology

ถึงแม้ว่า streptavidin-biotin method จะยังใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ว่า method นี้ก็ยังพบข้อจำกัดอยู่บ้าง อย่างเช่นในกรณีที่มี endogenous biotin ใน tissue จะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะคือเกิดสีที่ไม่ได้เกิดจากการจับกันของ antigen และ antibody หรือที่เรียกว่า background staining เกิดขึ้น และแม้ว่าใน formalin-fix paraffin embedded tissue จะมีการแสดงออกของ endogenous biotin ลดลงแล้ว แต่ว่าในเนื้อเยื่อบางอย่าง เช่น เนื้อเยื่อของตับ (liver) และไต (kidney) ก็ยังพบว่ามีการแสดงออกของ endogenous biotin อยู่ และนอกจากนี้ในขั้นตอนของการคืนสภาพของ antigen ก่อนการย้อมโดยใช้ความร้อน (heat-induce antigen retrieval) นั้น นอกจากจะเป็นการกู้ antigen กลับคืนมาแล้วยังมีผลข้างเคียงเกิดขึ้นคือมีการคืนสภาพ (recovery) ของ endogenous biotin ในเนื้อเยื่อด้วย ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีขั้นตอนของการ block endogenous biotin ก่อนการย้อมที่ได้ผลดีพอสมควร แต่ก็ถือว่าเป็นการเพิ่มขั้นตอนในการย้อมให้ยุ่งยากมากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงมีการคิดค้นเทคนิคใหม่ๆที่ไม่มีการใช้ avidin biotin ที่ทำเกิด nonspecific staining จาก endogenous biotin ซึ่งเทคนิคนั้นก็คือ chain polymer-conjugated technique ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ enzyme (HRP, AP) และ secondary antibody มาติดบน spine molecule ของ dextran ซึ่งในหนึ่ง spine molecule ของ dextran สามารถติด enzyme ได้ถึง 70 molecule พร้อมกับ antibody อีก 10 molecule ด้วยเหตุนี้เทคนิคนี้จึงช่วยเพิ่ม sensitivity ลดเวลารวมถึงลดขั้นตอนในการย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีได้ ตัวอย่างของเทคนิคนี้ได้แก่ DAKO EPOS และ DAKO En Vision เป็นต้น [45]



รูปที่ 5. แสดงภาพ chain polymer-conjugate method (อ้างอิงรูปจาก www.dako.com/dist/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_9.pdf)

ในปัจจุบันยังคงมีการปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคสำหรับ immunohistochemistry อยู่อย่างต่อเนื่อง เพื่อคิดค้นวิธีการหรือ method ใหม่ๆให้มี sensitivity ที่สูงขึ้นและลดปัญหาในการย้อมอย่างเช่น background staining ที่อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการแปลผล รวมถึงปรับปรุง protocol ต่างๆเพื่อลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและลดระยะเวลาในการย้อม ทั้งนี้ก็เพื่อให้ immunohistochemisry เป็นแทคนิคที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพสำหรับงานวิจัยทางการแพทย์รวมไปถึงการตรวจวินิจฉัยโรคใน clinical routine

การแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในระบบประสาทส่วนกลางและในมะเร็งชนิดต่างๆ

Annexin A1 เป็นโปรตีนที่ encode โดย ANXA1 gene ที่อยู่บน chromosome 19q24 มีมวลโมเลกุลประมาณ 37 kDa เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ calcium binding anti-inflammatory protein ทำหน้าที่ต่อต้านการเกิดการอักเสบโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2

และยับยั้งการสังเคราะห์สาร eicosanoid ซึ่งเป็น mediator ในกระบวนการอักเสบ [9] มีข้อมูลว่า Annexin A1 มีความเกี่ยวข้องกับ MAPK/ERK pathway และทำหน้าที่เป็น substrate ของ EGF receptor tyrosine kinase ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการแบ่งเซลล์ (proliferation), การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiation) และกระบวนการที่ทำให้เกิดมะเร็ง (cancer development) [39-40] นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่ามีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งเคยมีรายงานว่าการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ Annexin A1 จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ caspase3 และการปลดปล่อย Ca^{2+} (calcium release) ในกระบวนการ apoptosis [12, 41]

Annexin A1 มีการแสดงออกในลักษณะที่แตกต่างกันในมะเร็งหลายชนิด โดยมีการแสดงออกมากขึ้น (over expression) ในมะเร็งเต้านม, มะเร็งเม็ดเลือดขาว (hairy cell leukemia), มะเร็งตับ, มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับอ่อน [16-20] และพบว่า Annexin A1 มีการแสดงออกลดลงหรือไม่แสดงออกเลยในมะเร็งหลอดอาหาร, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งศีรษะและคอ และมะเร็งของต่อมน้ำเหลือง [21-24]

สำหรับในระบบประสาทส่วนกลาง ในสภาวะปกติจะพบ Annexin A1 แสดงออกใน ependymal cell, microglia, neuron และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในสมอง [25] แต่เมื่อเกิดพยาธิสภาพของสมอง จะพบการแสดงออกของ Annexin A1 ใน macrophage, reactive astrocyte และ lymphocyte ที่อยู่รอบๆหลอดเลือด [26-27] ในเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลาง พบการแสดงออกของ Annexin A1 ใน ependymoma, astrocytoma, anaplastic astrocytoma และ glioblastoma โดยพบว่าการแสดงออก Annexin A1 จะแปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกที่ค่อนข้างน้อยหรือไม่แสดงออกในเนื้องอกชนิด oligodendroglioma และ PNET [7, 28-29] อย่างไรก็ดี ข้อมูลการแสดงออกของ Annexin A1 ใน neuroepithelial tumor บางชนิดเช่น central neurocytoma ก็ยังมีไม่มากนัก

Ubiquitin carboxyterminal esterase L1 (UCH-L1) เป็นโปรตีนที่ encode โดย UCH-L1 gene ที่อยู่บน chromosome 4p14 มีมวลโมเลกุล 9 kDa เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญใน proteasome pathway ซึ่งทำหน้าที่ 2 อย่างคือ เป็นเอนไซม์ hydrolase และเอนไซม์ ligase ในส่วนของ hydrolase จะทำหน้าที่ย้ายโมเลกุลของ ubiquitin ออกจากโปรตีนที่จะถูกทำลายและนำ ubiquitin จากโปรตีนที่ถูกทำลายกลับมาใช้ใหม่ และในส่วนของ ligase จะทำหน้าที่เชื่อมต่อ

โมเลกุลของ ubiquitin ให้เป็น polyubiquitin ในโปรตีนที่จะต้องถูกทำลาย [13] เคยมีรายงานว่า UCH-L1 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์แบบ apoptosis [14-15] นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดมะเร็ง (cancer development) ซึ่งมีข้อสันนิษฐานว่า การทำงานที่ผิดปกติของ proteasome degradation จะทำให้เกิดผลอย่างใดอย่างหนึ่งคือ ทำให้ oncoprotein ทำงานมากขึ้นหรือไม่ก็ทำให้จำนวนของ suppresser protein ลดลง [42]

UCH-L1 มีการแสดงออกในลักษณะที่แตกต่างกันในมะเร็งหลาย ๆ ชนิด กล่าวคือ มีการแสดงออกที่มากขึ้นในมะเร็งตับอ่อน, มะเร็งหลอดอาหาร และมะเร็งปอด [30-32] ซึ่งการแสดงออกของ UCH-L1 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้โรค (marker) ของมะเร็งเหล่านี้ได้ แต่ในมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งรังไข่, มะเร็งศีรษะและคอ และมะเร็งตับ กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว เนื่องจากเกิดเมธิลเลชั่น (methylation) ขึ้นที่ส่วนที่ควบคุมการแสดงออก (promoter) ของยีน UCH-L1 [33-35] ในระบบประสาท โดยปกติจะพบการแสดงออกของ UCH-L1 ในเซลล์ประสาท (neuron) ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลาย [36] สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของ UCH-L1 ในเนื้องอกในระบบประสาทส่วนกลางยังมีน้อยมาก มีเพียงรายงานการพบ UCH-L1 ในบริเวณของเซลล์มะเร็งเกรดต่ำ (เกรด II) ในก้อนเนื้องอก glioblastoma [8] ส่วน neuroepithelial tumor ชนิดอื่น ๆ นั้น ยังไม่มีข้อมูล

Neuroepithelial tumors [1]

เป็นเนื้องอกปฐมภูมิกลุ่มใหญ่ของระบบประสาท ถูกจัดแบ่งชนิดตามเซลล์ที่เชื่อว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดซึ่งเป็นเซลล์ที่ differentiate มาจากเซลล์เยื่อบุท่อประสาทในระยะตัวอ่อน อันได้แก่ เซลล์ประสาท, เซลล์เกลีย, เซลล์เยื่อบุของ choroid plexus และ pineocyte ของต่อมไพเนียล โดยเนื้องอกในกลุ่มนี้จะประกอบไปด้วยเนื้องอกชนิดที่มีความรุนแรงน้อยหรือเนื้องอกเกรดต่ำ (เกรด I และ II) ไปจนถึงเนื้องอกชนิดรุนแรงมากหรือเนื้องอกเกรดสูง (เกรด III และ IV) ตามการจัดจำแนกขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี พ.ศ. 2550 [2-3] ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้เป็นกลุ่มต่างๆ ตามชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดดังนี้

Neuroepithelial Tumors	Tumor Type	Grade			
		I	II	III	IV
Astrocytic tumors					
Circumscribed	Subependymal giant cell astrocytoma	X			
	Pilocytic astocytoma	X			
	Pilomyxoid astrocytoma		X		
	Pleomorphic xanthoastrocytoma		X		
Diffuse (infiltrating), low-grade	Low-grade diffuse astrocytoma		X		
Diffuse (infiltrating),	Anaplastic astrocytoma			X	
high-grade	Gliomatosis cerebri			X	
	Glioblastoma				X
Oligodendroglial tumors	Oligodendroglioma		X		
	Anaplastic oligodendroglioma			X	
Mixed gliomas	Oligoastrocytoma		X		
	Anaplastic oligoastrocytoma			X	
Ependymal tumors	Subependymoma	X			
	Myxopapillary ependymoma	X			
	Ependymoma		X		

	Anaplastic ependymoma			X	
Choroid plexus tumors	Choroid plexus papilloma	X			
	Atypical choroid plexus papilloma		X		
	Choroid plexus carcinoma			X	
Neuronal/mixed neuronal-glial tumors	Gangliocytoma	X			
	Ganglioglioma	X			
	Anaplastic ganglioglioma			X	
	Dysplastic gangliocytoma of the cerebellum (Lhermitte-Duclos disease)				
	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	X			
	Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	X			
	Central neurocytoma		X		
	Papillary glioneuronal tumor	X			
	Rosette-forming glioneuronal tumor of the 4th ventricle	X			
	Extraventricular neurocytoma		X		
	Cerebellar liponeurocytoma		X		

	Spinal paraganglioma	X			
Pineal parenchymal tumors	Pineocytoma	X			
	Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation		X	X	
	Pineoblastoma				X
	Papillary tumor of the pineal region		X	X	
Embryonal tumors	Medulloblastoma				X
	Atypical teratoid/rhabdoid tumor				X
	CNS Primitive neuroectodermal tumor				X
Other neuroepithelial tumors	Astroblastoma (no grading recommended)				
	Angiocentric glioma	X			
	Chordoid glioma of the 3rd ventricle		X		

ตารางที่ 1. แสดงการจัดจำแนกกลุ่มของ neuroepithelial tumor ตามชนิดของเซลล์ต้นกำเนิด รวมถึงแสดงเกรดของเนื้องอกแต่ละชนิดตามการจัดจำแนกของ WHO ปี พ.ศ. 2550

1. Astrocytic tumors

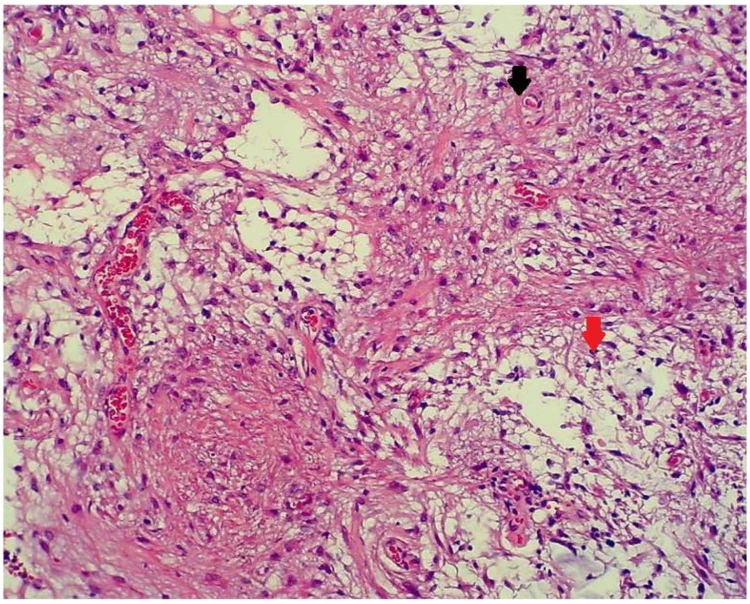
เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจาก astrocyte ซึ่งเป็นเซลล์เกลียที่ไซโตพลาสซึมมีการแตกแขนงดูคล้ายดาว แต่จากการย้อม H&E แทบจะมองไม่เห็นแขนงของ astrocyte เลยจะเห็นเพียงเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมรี โครมาตินโปร่งและถูกล้อมรอบด้วยช่องว่าง เนื้องอกในกลุ่ม astrocytic tumor สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะขอบเขตของก้อน ได้แก่ circumscribe astrocytoma ซึ่งเป็นเนื้องอกที่มีขอบเขตชัดเจน และ diffuse หรือ infiltrating astrocytoma ซึ่งจะ

มีขอบเขตไม่ชัดเจนเนื่องจากเซลล์เนื้องอกมีการแทรกแซงเข้าไปในเนื้อสมองบริเวณข้างเคียง ตัวอย่างของเนื้องอกในกลุ่ม astrocytic tumor ได้แก่

Pilocytic astrocytoma

เป็นเนื้องอกเกรด I ที่อยู่ในกลุ่มของเนื้องอกที่มีขอบเขตชัดเจน พบเป็นร้อยละ 6 ของเนื้องอกในโพรงกะโหลกศีรษะ ส่วนมากจะพบในคนอายุน้อยโดยร้อยละ 75 ของผู้ป่วยจะมีอายุต่ำกว่า 20 ปี (พบมากสุดในช่วงอายุ 8-13 ปี) ตำแหน่งทีพบบ่อยคือในแนวกึ่งกลางสมองซึ่งได้แก่ รอบๆ ventricle, visual system, hypothalamus, cerebellum, brain stem และ spinal cord โดยตำแหน่งที่พบบ่อยที่สุดคือ cerebellum เป็นเนื้องอกเกรด I ที่ไม่ร้ายแรงการพยากรณ์โรคขึ้นอยู่กับตำแหน่งของก้อนว่าทำการผ่าตัดเอาออกได้หมดหรือไม่

ลักษณะทางพยาธิวิทยา มีการเรียงตัวแบบ biphasic คือพบทั้งส่วนที่มีเซลล์หนาแน่นและส่วนทีเซลล์อยู่กันอย่างหลวมๆ (รูปที่ 6) ส่วนแรกประกอบด้วยเซลล์เนื้องอกรูปกระสวยที่มีแขนงหยาบคล้ายเส้นผม ในบริเวณนี้จะพบ Rosenthal fiber ได้บ่อย สำหรับส่วนที่สองจะประกอบด้วยเซลล์เนื้องอกรูปดาว (stellate cell) พบ microcyst และ eosinophilic granular body ได้บ่อยในบริเวณนี้ pilocytic astrocytoma ถือเป็นเนื้องอกที่มีหลอดเลือดฝอยจำนวนมาก บางทีอาจพบ endothelial proliferation นอกจากนี้นิวเคลียสของเซลล์เนื้องอกยังอาจมี pleomorphism ได้ด้วย



รูปที่ 6. แสดงลักษณะ biphasic ของ pilocytic astrocytoma ซึ่งมีบริเวณที่มีเซลล์หนาแน่น (ลูกศรสีดำ) สลับกับบริเวณที่เซลล์อยู่กันอย่างหลวมๆ (ลูกศรสีแดง)

Low – grade diffuse astrocytoma

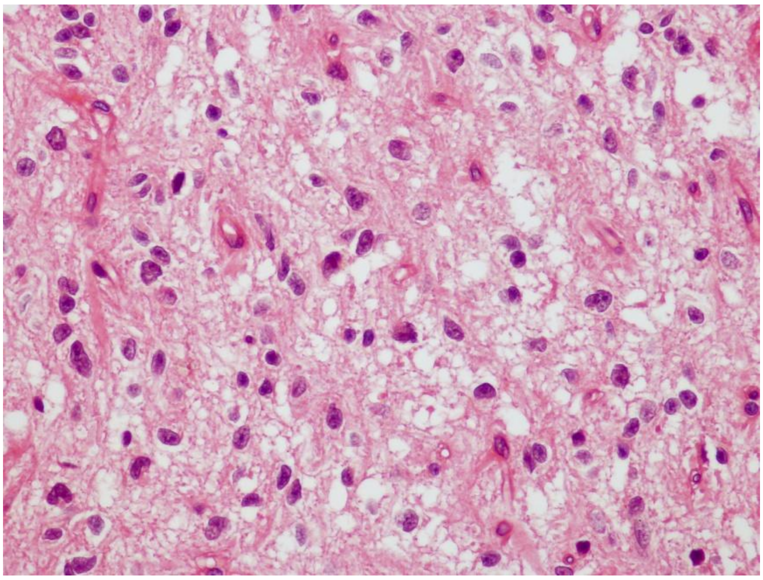
เป็นเนื้องอกเกรด II ที่พบได้บ่อยในผู้ใหญ่ในช่วงอายุระหว่าง 20-40 ปี โดยตำแหน่งที่เกิดบ่อยที่สุดคือสมองใหญ่ ในเด็กอาจพบเนื้องอกได้ที่บริเวณก้านสมองและ thalamus เนื้องอกมีขอบเขตไม่ชัดเจนเนื่องจากเซลล์เนื้องอกมีการแทรกแซงเข้าไปในเนื้อสมองบริเวณข้างเคียง นอกจากนี้เนื้องอกชนิดนี้ยังสามารถพัฒนาไปเป็นเนื้องอกที่มีความรุนแรงมากขึ้นได้

ลักษณะทางพยาธิวิทยา เป็นเนื้องอกที่มีเซลล์หนาแน่นปานกลาง พบความผิดปกติของนิวเคลียส เช่น มีการติดสีเข้ม รูปร่างหยักไปมาไม่กลมรีตามปกตินอกจากนี้ยังพบความแตกต่างในรูปร่างของเซลล์ (pleomorphism) อีกด้วย การที่จะบอกว่าเป็นรอยโรคของ astrocyte ให้สังเกตจากแขนงของเซลล์และพื้นเส้นใย (fibrillary background) เป็นสำคัญ อาจพบการเรียงตัวของเซลล์เนื้องอกล้อมรอบหลอดเลือดได้ และจากคุณลักษณะการแทรกแซงของเนื้องอกทำให้พบ secondary structure ได้ low – grade diffuse astrocytoma สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

Fibrillary astrocytoma ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสเปลือยที่พบความผิดปกติของนิวเคลียส (nuclear atypia) เช่นมีการย้อมติดสีเข้ม รูปร่างหยักไปมาไม่กลมรีเหมือนปกติ และเซลล์เหล่านี้จะฝังตัวอยู่ในเส้นใยละเอียดที่สานกันไปมา (fibrillary background) (รูปที่ 7)

Gemistrocytic astrocytoma ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะเป็น gemistocyte คือเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมปริมาณมาก ย้อมติดสีชมพูแดงสม่ำเสมอ และนิวเคลียสของเซลล์ถูกดันชิดไปที่ขอบข้างหนึ่ง low-grade astrocytoma ชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่แย่กว่าชนิดอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน ในทางปฏิบัติจะสามารถพบทั้งสองลักษณะนี้ได้ใน lesion เดียวกัน และจะจัดเป็น gemistrocytic astrocytoma ได้ต่อเมื่อพบ gemistocyte มากกว่า 20%

Protoplasmic astrocytoma เป็น low-grade astrocytoma ที่พบได้น้อย รอยโรคประกอบด้วยเซลล์รูปดาว (stellate cell) ที่มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง แขนงของเซลล์มองเห็นไม่ชัดเจนและมักพบ microcyst ได้บ่อย

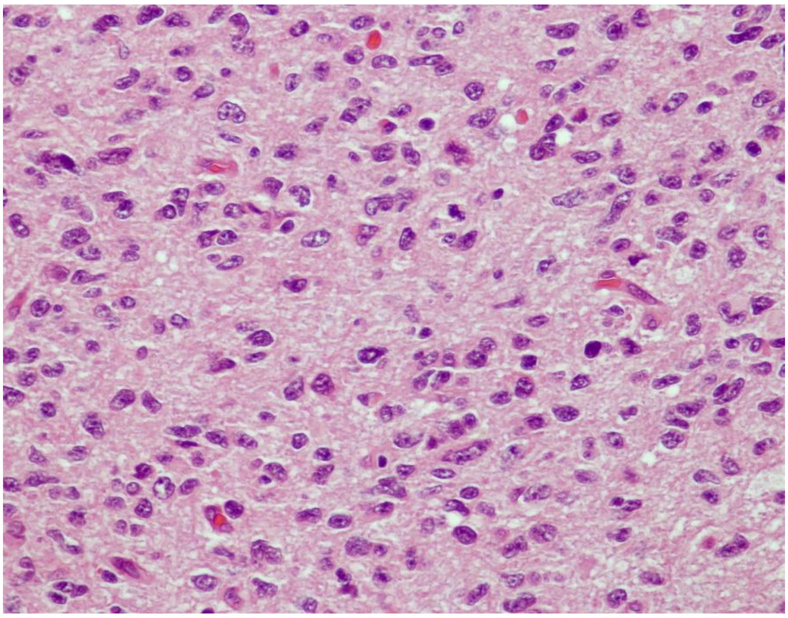


รูปที่ 7. แสดงลักษณะ histology ของ fibrillary astrocytoma ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียส เปลือยที่พบความผิดปกติของนิวเคลียสฝังตัวอยู่ในเส้นใยละเอียดที่สานกันไปมา

Anaplastic astrocytoma

เป็นเนื้องอกเกรด III ที่พบในผู้ใหญ่ กลุ่มอายุของผู้ป่วยที่พบจะมากกว่าในพวกที่เป็น low-grade diffuse astrocytoma โดยมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 41 ปี ตำแหน่งที่พบเนื้องอกได้บ่อยคือบริเวณสมองใหญ่ ในเด็กอาจพบเนื้องอกที่บริเวณก้านสมองและ thalamus ได้

ลักษณะพยาธิวิทยา จากการตรวจด้วยตาเปล่า anaplastic astrocytoma และ low-grade diffuse astrocytoma แยกกันค่อนข้างลำบาก แต่เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ใน anaplastic astrocytoma มีมากกว่าจึงอาจมองเห็นขอบเขตของก้อนเนื้องอกชัดเจนกว่า จากกล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์เนื้องอกที่อยู่กันอย่างหนาแน่น (รูปที่ 8) มีลักษณะผิดปกติของนิวเคลียส พบ mitosis ได้บ่อยแต่ไม่พบ endothelial proliferation และ necrosis



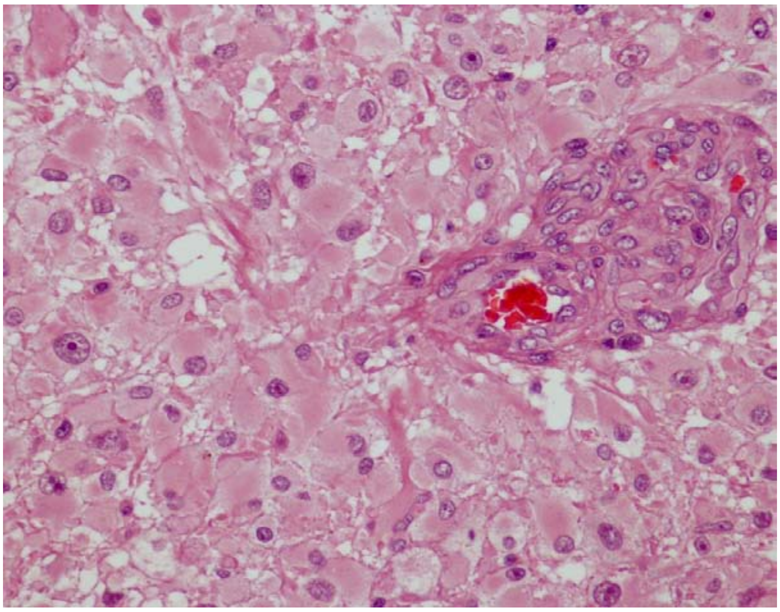
รูปที่ 8. แสดงลักษณะ histology ของ anaplastic astrocytoma ที่พบเซลล์เนื้องอก astrocytes อยู่กันอย่างหนาแน่น

<u>Glioblastoma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด IV ที่ร้ายแรงที่สุดในกลุ่ม glioma พบได้ร้อยละ 12-15 ของเนื้องอกภายในโพรงกะโหลกศีรษะและคิดเป็นร้อยละ 60 ของเนื้องอกกลุ่ม astrocytoma เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยในผู้ใหญ่โดยผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 53 ปี glioblastoma สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ primary glioblastoma ซึ่งเป็นชนิดที่เกิดขึ้นเองมักพบในคนที่มีอายุมากกว่า และ secondary glioblastoma เกิดตามหลัง diffuse astrocytoma ที่เกรดต่ำกว่าซึ่งมักจะพบในคนที่มีอายุน้อยกว่าในกลุ่มแรก โดยผู้ป่วยในกลุ่ม primary glioblastoma มักจะมีการพยากรณ์โรคที่แย่กว่าและมีการดำเนินโรคที่เร็วกว่าในกลุ่ม secondary glioblastoma จากการศึกษาทางอนูพันธุศาสตร์พบว่า GBM ทั้งสองชนิดมีกลไกการเกิดที่แตกต่างกัน โดย primary GBM มักตรวพบ EGFR amplification ในขณะที่ secondary GBM มักพบการกลายพันธุ์ของยีน p53 [47]

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> GBM เป็นรอยโรคที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง เซลล์เนื้องอกมีรูปร่างแตกต่างกันได้มาก อาจพบเซลล์เนื้องอกทั้งแบบตัวกลม รี หรือรูปกระสวย และการเรียงตัวของเนื้องอกก็มีได้หลายรูปแบบเช่นกัน ลักษณะสำคัญทางพยาธิวิทยาของ GBM คือ การพบ necrosis และรอบๆบริเวณหย่อมของ necrosis ก็มักจะมีเซลล์เนื้องอกมาเรียงแถวโดยรอบ ซึ่งเรียก

necrosis ชนิดนี้ว่า “psudopalisading necrosis” นอกจากนี้การพบ endothelial proliferation ก็ถือเป็นลักษณะสำคัญของ GBM เช่นเดียวกัน (รูปที่ 9)



รูปที่ 9. แสดงเซลล์เนื้องอกของ gemistocyte ที่อยู่กันอย่างหนาแน่น และ endothelial proliferation ที่พบในเนื้องอกชนิด glioblastoma

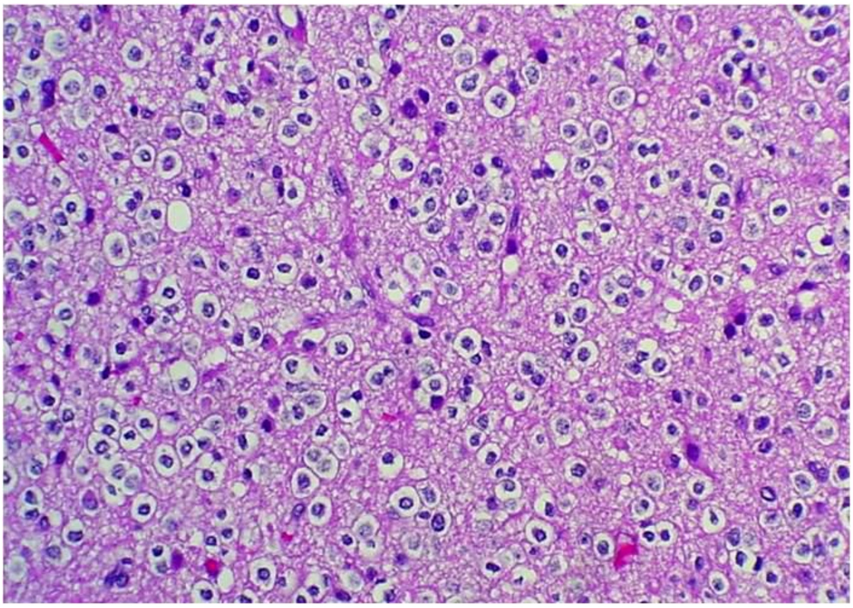
2. Oligodendrogial tumors

เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจาก oligidendroglia ซึ่งเป็นเซลล์เกลียที่มีนิวเคลียสกลมเล็กย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม รอบนิวเคลียสเป็นช่องว่างใสหรือที่เรียกว่า “perinuclear halo” ตัวอย่างของเนื้องอกในกลุ่มนี้ได้แก่

<u>Oligodendroglioma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด II ที่พบได้ร้อยละ 5 ของเนื้องอกภายในโพรงกะโหลกศีรษะ อุบัติการณ์สูงสุดของเนื้องอกชนิดนี้อยู่ในช่วงอายุ 30 - 60 ปี โดยเนื้องอกชนิดนี้มักเกิดในสมองใหญ่ พบการแทรกแซงของเซลล์เนื้องอกเข้าไปใน cerebral cortex ได้บ่อย และจากการแทรกแซงนี้เองเชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องกับอาการลมชักที่มักเกิดร่วมกับเนื้องอกชนิดนี้ oligodendroglioma สามารถพัฒนาไปเป็นชนิดร้ายได้แต่พบปารกฏการณ์เช่นนี้ได้น้อยกว่าในกลุ่ม diffuse astrocytoma

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> ก้อนเนื้องอกอาจมีขอบเขตชัดเจนบางบริเวณ แต่จะไม่ชัดเจนในบริเวณที่เซลล์เนื้องอกมีการแทรกแซงเข้าไปใน cerebral cortex ซึ่งในบริเวณที่มีการแทรกแซงนี้จะเห็นรอยต่อระหว่าง gray และ white matter ไม่ชัดเจน ลักษณะจุลพยาธิวิทยานอกจากจะพบเซลล์รูปไข่ดาวแล้ว ยังสามารถพบเซลล์รูปร่างอื่นได้อีก อาทิเช่น minigemistocyte และ gliofibrillary oligodendrocyte ซึ่ง minigemistocyteเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมขนาดเล็กเท่าๆกันเหมือนเซลล์ทั่วไปใน oligodendroglioma แต่มีไซโตพลาสซึมมากย้อมติดสีแดงสม่ำเสมอและมีการแตกแขนงเล็กน้อย ทำให้นิวเคลียสถูกเบียดดันให้ชิดไปที่ขอบด้านใดด้านหนึ่ง ส่วน gliofibrillary oligodendrocyte นั้นมีรูปร่างเหมือนกับ oligodendroglia ทั่วไปแต่มักอยู่กันเป็น sheet และมองเห็นขอบเขตระหว่างเซลล์ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบร่างแหของหลอดเลือดฝอยจำนวนมากที่มีการแตกแขนงไปทั่วมองดูคล้ายกรงไก่ (chicken wire) หินปูน และ microcyst ได้อีกด้วย



รูปที่ 10. แสดงลักษณะเซลล์เนื้องอกใน oligodendroglioma ที่มีนิวเคลียสกลมสม่ำเสมอและมีช่องว่างล้อมรอบเซลล์แต่ละเซลล์

<u>Anaplastic oligodendroglioma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด III ที่มักพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่าในกลุ่มที่เป็น oligodendroglioma โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 47 ปี มักพบรอยโรคที่สมองใหญ่โดยเฉพาะกลีบ frontal และ temporal เนื้องอกชนิดนี้เป็นเนื้องอกเกรดสูงที่มีการพยากรณ์โรคดีกว่ากลุ่ม high-

grade diffuse astrocytoma โดยเฉพาะในรายที่พบ LOH 1p และ 19q เพราะมีการตอบสนองที่ดีต่อเคมีบำบัด [48]

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> เซลล์เนื้องอกมีลักษณะคล้ายกับ oligodedroglioma แต่มีความหนาแน่นของเซลล์มากขึ้น เซลล์ยังมีนิวเคลียสกลมเท่าๆกัน มักพบ minigemistocyte และ gliofibrillary oligodendrocyte ได้บ่อย บางครั้งพบ filament ในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้มักเห็นลักษณะอื่นๆที่บ่งบอกถึง oligidendroglia ด้วย เช่น หลอดเลือดฝอยที่แตกแขนงแบบ chicken wire หินปูน และการแทรกแซงของเซลล์เนื้องอกเข้าไปใน cerebral cortex ส่วนข้อแตกต่างจาก oligodendroglia (เกรด II) ที่สำคัญคือ ต้องพบ mitosis บ่อยๆ นอกจากนี้ยังสามารถพบ endothelial proliferation และ necrosis ทั้งแบบที่มีและไม่มีเซลล์เนื้องอกมาล้อมรอบ

3. Ependymal tumors

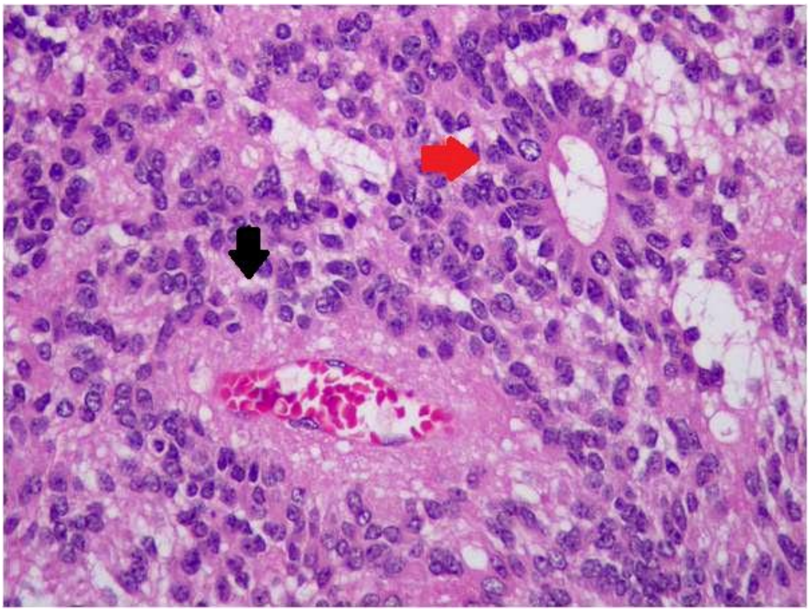
เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ ependyma ซึ่งเป็นเซลล์เกลียที่มีลักษณะเป็น columnar cell ที่บุผนังช่องสมอง ตัวอย่างของเนื้องอกในกลุ่มนี้ได้แก่

<u>Ependymoma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด II ที่พบได้บ่อยในเด็กและวัยรุ่น พบได้ร้อยละ 6-9 ของเนื้องอกภายในโพรงกะโหลกศีรษะ และคิดเป็นร้อยละ 30 ของเนื้องอกปฐมภูมิของระบบประสาทในเด็กที่อายุน้อยกว่า 3 ปี เนื่องจาก ependyma เป็นเซลล์ที่บุผนังช่องสมองเนื้องอกชนิดนี้จึงมักเกิดในช่องสมองโดยตำแหน่งที่พบบ่อยที่สุดคือช่องสมองที่ 4 หรือ 4^{th} ventricle โดยเนื้องอกตำแหน่งนี้มักยื่นตัวออกจากพื้นช่องสมองเข้าไปภายในช่องทำให้เกิด hydrocephalus และบางครั้งสามารถพบ ependymoma อยู่ภายในเนื้อสมองได้ ก้อนเนื้องอกมีขอบเขตชัดเจน มักเบียดดันเนื้อเยื่อประสาทบริเวณข้างเคียงมากกว่าจะแทรกแซงเข้าไป

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> เนื้องอกมีความหนาแน่นของเซลล์ระดับปานกลาง เซลล์เนื้องอกมีนิวเคลียสรูปร่างกลมรีย้อมติดสีน้ำเงิน ฝังตัวอยู่ในร่างแหของเส้นใยละเอียดที่สานกันไปมา ลักษณะเด่นของเนื้องอกชนิดนี้คือ การเรียงตัวของเซลล์เนื้องอกล้อมรอบหลอดเลือดที่เรียกว่า “perivascular pseudorosette” โดยนิวเคลียสของเซลล์เนื้องอกจะอยู่ห่างจากหลอดเลือดพอสมควรซึ่งเซลล์เนื้องอกจะส่งแขนงไปยึดติดกับผนังหลอดเลือด และโครงสร้างที่สำคัญอีกอย่าง

หนึ่งที่จำเพาะต่อ ependymoma คือ ependymal true rosette หรือ ependymal canal ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของเซลล์เนื้องอกล้อมรอบช่องว่าง (รูปที่ 11)

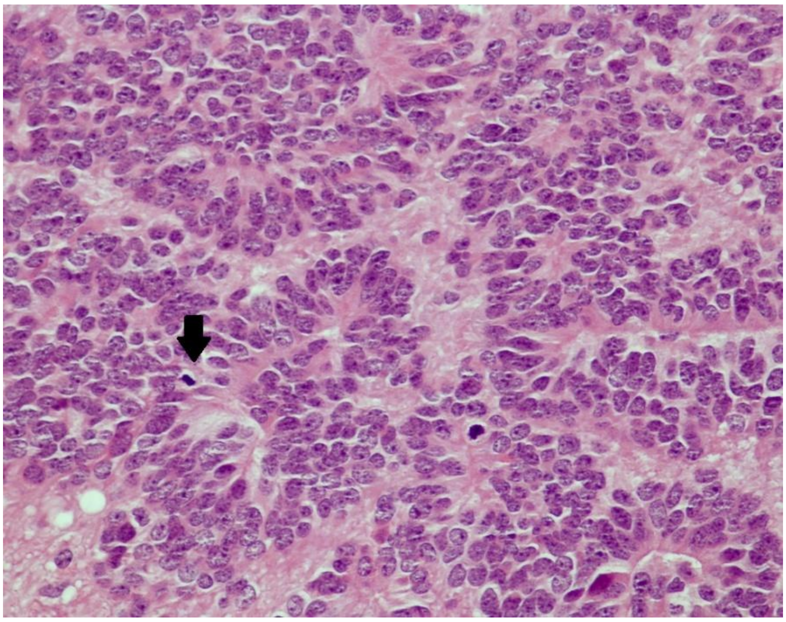


รูปที่ 11. แสดงลักษณะของ perivascular psudorosette (ลูกศรสีดำ) และ true rosette (ลูกศรสีแดง) ที่พบใน ependymoma

<u>Anaplastic ependymoma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด III ที่ก้อนเนื้องอกมักมีขอบเขตชัดเจนแต่ในบางรายก็อาจจะพบการแทรกแซงของเนื้องอกเข้าสู่บริเวณข้างเคียงได้ ก้อนเนื้องอกสามารถเกิดได้ทั้งในและนอกสมองเช่นเดียวกับเนื้องอกเกรด II การพยากรณ์โรคคของผู้ป่วย ependymoma และ anaplastic ependymoma ขึ้นอยู่กับการผ่าตัดว่าสามารถเอาก้อนเนื้อออกไปหมดหรือไม่ มากกว่าจะสัมพันธ์กับเกรดของเนื้องอก เนื้องอกที่เกิดในผู้ใหญ่มักมีการพยากรณ์โรคดีกว่าที่เกิดในเด็ก ที่เป็นเช่นนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากตำแหน่งของรอยโรค โดยในเด็กเนื้องอกมักเกิดในช่องสมองที่ 4 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ผ่าตัดได้ยากกว่ารอยโรคใน supratentorium ที่มักพบในผู้ใหญ่

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> เป็นเนื้องอกที่มีความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างมาก สามารถพบการเรียงตัวแบบ perivascular pseudorosette ได้เช่นเดียวกับ epedymoma แต่มีโอกาสที่จะเห็น ependymal true rosette ได้น้อยกว่า ลักษณะสำคัญที่สุดในการวินิจฉัยแยก anaplastic ependymoma ออกจาก ependymoma คือการพบ mitosis บ่อยๆ (รูปที่ 12)



รูปที่ 12. แสดงลักษณะ histology ของ anaplastic ependymoma ที่มีเซลล์อยู่กันอย่างหนาแน่น และมักพบ mitosis (ลูกศรชี้) ได้บ่อย

4. Choroid plexus tumors

เป็นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อบุของ choroid plexus ซึ่งพบได้น้อยมาก เนื้องอกในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยเนื้องอก 2 ชนิด ได้แก่ choroid plexus papilloma ซึ่งจัดเป็นเนื้องอกเกรด I และ choroid plexus carcinoma ซึ่งจัดเป็นเนื้องอกเกรด III

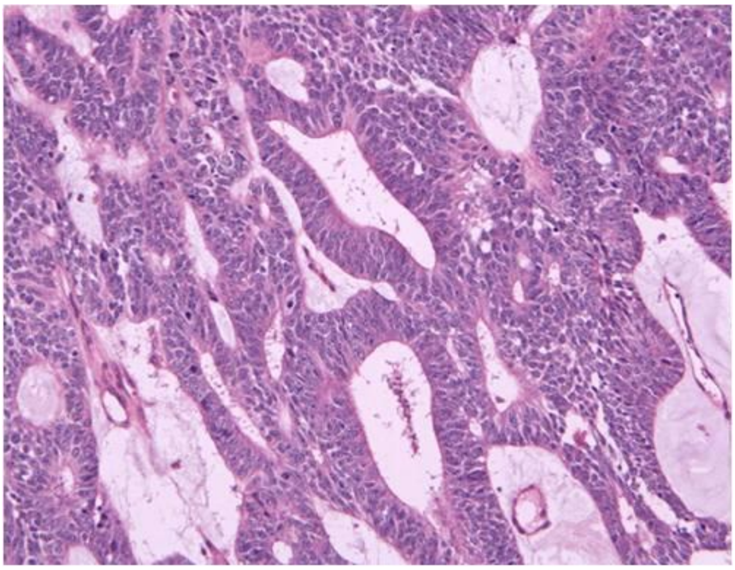
<u>Choroid plexus papilloma และ Choroid plexus carcinoma</u>

เนื้องอกของ choroid plexus พบเพียงร้อยละ 0.4-0.6 ของเนื้องอกสมองทั้งหมด ทั้ง papilloma และ carcinoma เป็นเนื้องอกที่ส่วนใหญ่เกิดในเด็กอายุ 10 ปี ตำแหน่งที่เกิดเนื้องอกชนิดนี้คือภายในช่องสมอง โดยพบบ่อยที่สุดที่ช่องข้างสมอง รองลงมาคือช่องสมองที่ 4 และ 3 ตามลำดับ ผู้ป่วยมักมี hydrocephalus เนื่องจากเนื้องอกอุดตันทางเดินของน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

Choroid plexus papiloma เมื่อตรวจดูด้วยตาเปล่าจะพบเนื้องอกที่มีผิวด้านนอกขรุขระคล้ายดอกกะหล่ำ ลักษณะทางจุลพยาธิ พบเซลล์เนื้องอกเรียงตัวล้อมรอบแกนกลางหลอดเลือดทำให้เกิดโครงสร้าง papillary เซลล์เนื้องอกมีรูปร่าง cuboidal หรือ columnar ที่เรียงตัวเป็นระเบียบ นิวเคลียสมีขนาดใกล้เคียงกันและขอบด้านบนของเซลล์ที่เรียงดูเรียบสม่ำเสมอ (รูปที่ 13)

Choroid plexus carcinoma เนื้องอกเป็นก้อนตัน ลักษณะที่คล้ายดอกกะหล่ำเห็นไม่ชัด หน้าตัดมักมีหย่อมของ necrosis และมีเลือดออก เซลล์เนื้องอกมี pleomorphism ได้มาก การเรียงตัวแบบ papillary อาจเห็นไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีการเรียงตัวเป็น sheet ตรวจพบ mitosis และ necrosis ได้บ่อย รวมทั้งอาจเห็นการแทรกแซงของเซลล์เนื้องอกเข้าไปในสมองส่วนข้างเคียง



รูปที่ 13. แสดงลักษณะ histology ของ choroid plexus papilloma ที่พบเซลล์เนื้องอกรูป columnar ที่นิวเคลียสมีขนาดใกล้เคียงกัน และขอบด้านบนของเซลล์ที่เรียงต่อกันดูเรียบสม่ำเสมอ (อ้างอิงรูปจาก www.moon.ouhsc.edu/kfung/IACP-OLP/APAC)

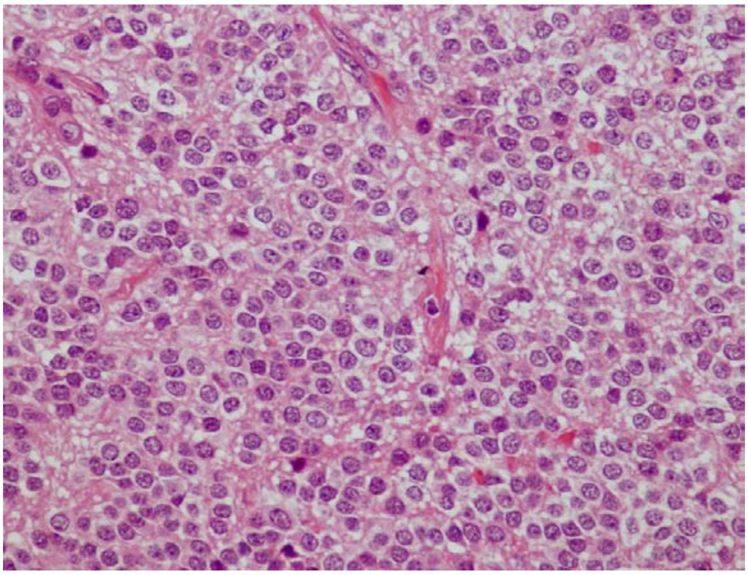
5. Neuronal **และ** Mixed neuronal – glial tumors

เป็นเนื้องอกของเซลล์ประสาทและเนื้องอกผสมที่ประกอบด้วยเนื้องอกของเซล์ประสาทและเนื้องอกของเซลล์เกลีย เนื้องอกในกลุ่มนี้มีหลายชนิดซึ่งส่วนมากจะเป็นเนื้องอกเกรด I และ II ตัวอย่างของเนื้องอกในกลุ่มนี้ได้แก่

<u>Central neurocytoma</u>

เป็นเนื้องอกเกรด II ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ประสาทซึ่งจะพบได้ไม่ค่อยบ่อย โดยจะพบได้น้อยกว่าร้อยละ 1 ของเนื้องอกในกะโหลกศีรษะ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุระหว่าง 20-40 ปี ตำแหน่งที่พบบ่อยคือ ส่วนหน้าของช่องข้างสมองโดยก้อนเนื้องอกมักอยู่ติดกับ septum pellucidum เนื้องอกทั้งที่เกิดภายในช่องสมองและในเนื้อสมองมีขอบเขตค่อนข้างชัดเจน

<u>ลักษณะทางพยาธิวิทยา</u> neurocytoma เป็นเนื้องอกที่มีเซลล์หนาแน่นค่อนข้างมาก เซลล์เนื้องอกมีนิวเคลียสกลมขนาดเท่าๆกันฝังตัวอยู่ในเส้นใยละเอียดสีชมพูแดง นิวเคลียสมีโครมาตินที่ละเอียดกระจายตัวสม่ำเสมอ มองเห็นนิวคลีโอลัสไม่ชัดเจน นิวเคลียสของเซลล์เนื้องอกบางส่วนอาจมีช่องว่างล้อมรอบทำให้ดูคล้ายกับ oligodendroglia (รูปที่ 14) พบร่างแหของหลอดเลือดฝอยและหินปูนได้บ่อย พบ mitosis ได้น้อย

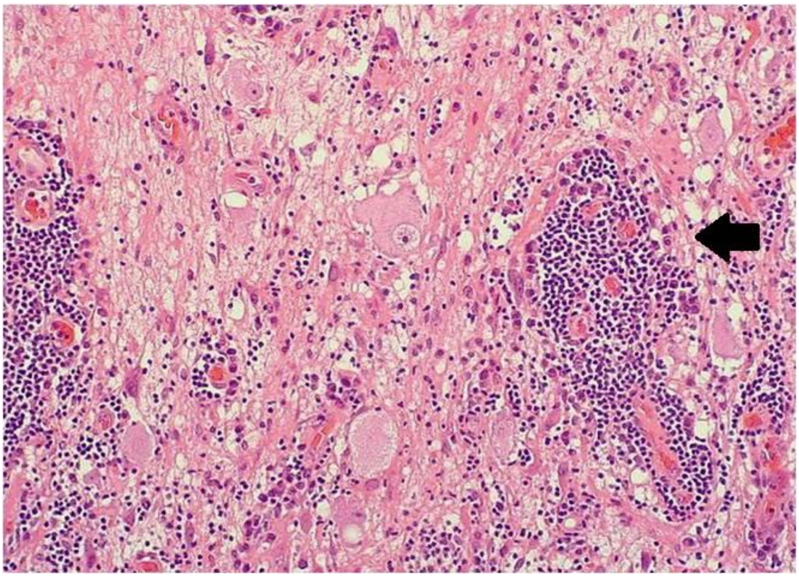


รูปที่ 14. แสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกที่มีนิวเคลียสกลมขนาดเท่าๆกันโดยนิวเคลียสของเนื้องอกบางส่วนมีช่องว่างล้อมรอบและฝังตัวอยู่ในเส้นใยละเอียดสีชมพูแดง ซึ่งเป็นลักษณะพบใน central neurocytoma

Ganglioglioma

เป็นเนื้องอกผสมที่ประกอบด้วยเนื้องอกของเซลล์ประสาทและเนื้องอกของเซลล์เกลีย พบประมาณร้อยละ 0.4-6.5 ของเนื้องอกภายในโพรงกะโหลกศีรษะ ผู้ป่วยส่วนมากมีอายุน้อยโดยอายุเฉลี่ยจะอยู่ที่ประมาณ 20 ปี ตำแหน่งที่พบบ่อยคือสมองใหญ่โดยเฉพาะที่กลีบ temporal แต่ก็สามารถเกิดได้ทั่วไปในระบบประสาท ก้อนเนื้องอกมีขอบเขตชัดเจน เป็นเนื้องอกเกรด I ที่มีการพยากรณ์โรคที่ดี การรักษาทำโดยการผ่าตัดเป็นหลัก

ลักษณะทางพยาธิวิทยา จะพบทั้งส่วนที่เป็นเนื้องอกของเซลล์ประสาทและส่วนที่เป็นเนื้องอกของเซลล์เกลีย ซึ่งโดยส่วนมากจะเป็น astrocyte ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวยเรียงตัวเป็น fascicle นอกจากนี้ยังพบเซลล์อักเสบนิวเคลียสเดี่ยวที่มักอยู่ล้อมรอบหลอดเลือด (รูปที่ 15) และอาจพบเซลล์ประสาทที่มีหลายนิวเคลียสได้ในเนื้องอกชนิดนี้



รูปที่ 15. แสดงลักษณะ histology ของ ganglioglioma ที่พบทั้งส่วนของเซลล์เนื้องอกของเซลล์ประสาทและบริเวณของเซลล์เนื้องอก astrocyte รวมถึงกลุ่มของเซลล์อักเสบนิวเคลียสเดี่ยว (ลูกศรชี้) ที่พบได้บ่อยในเนื้องอกชนิดนี้

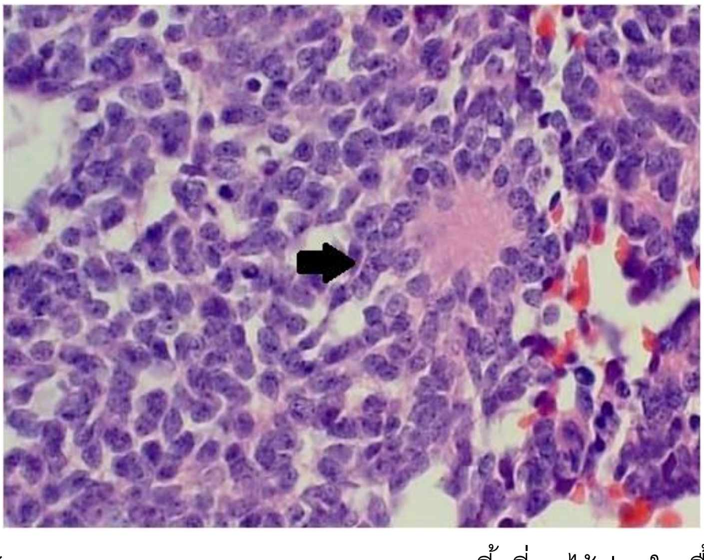
6. Embryonal tumors

เนื้องอกทุกชนิดในกลุ่มนี้เป็นเนื้องอกเกรด IV ที่มีความร้ายแรงและมักเกิดกับคนอายุน้อย ตัวอย่างของเนื้องอกในกลุ่มนี้คือ

Medulloblastoma

เนื้องอกชนิดนี้มักเกิดในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปี โดยเฉพาะในช่วงอายุ 3-8 ปี ตำแหน่งที่พบเนื้องอกคือ cerebellum นอกจากนี้ยังอาจตรวจพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าไปในน้ำหล่อสมองและไขสันหลัง ลักษณะทางคลินิกที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่เลวได้แก่ อายุของผู้ป่วยที่น้อยกว่า 3 ปี พบการแพร่กระจายของเนื้องอกไปตามน้ำหล่อสมองและไขสันหลังในขณะที่ได้รับการวินิจฉัย และการที่ไม่สามารถผ่าตัดเอาก้อนเนื้องอกออกได้หมด

ลักษณะทางพยาธิวิทยา ประกอบด้วยเซลล์เนื้องอกตัวกลมรีที่อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้มซึ่งเรียกเซลล์ลักษณะนี้ว่า “small blue round cell” ไซโตพลาสซึมของเซลล์น้อยมากจนแทบมองไม่เห็น โครมาตินเป็นจุดหยาบๆกระจายอยู่ทั่วไปมองเห็นนิวคลีโอลัสไม่ชัดเจน เซลล์เนื้องอกกระจายตัวอย่างไร้ระเบียบมักเห็นเส้นใยสีชมพูละเอียดเป็น background ในบางส่วนของเนื้องอกอาจตรวจพบ endothelial proliferation และ necrosis ที่บางครั้งอาจมีเซลล์มาเรียงตัวโดยรอบ (palisading) โดยทั่วไปพบ mitosis ได้บ่อยๆ ลักษณะสำคัญอีกหนึ่งอย่างที่พบใน medulloblastoma คือ “Homer Wright rosette” ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของนิวเคลียสเป็นวงกลมล้อมรอบแกนกลางที่มีลักษณะเป็น fibrillary (รูปที่ 16)



รูปที่ 16. แสดงลักษณะของ Homer Wright rosette (ลูกศรชี้) ที่พบได้บ่อยในเนื้องอกชนิด medulloblastoma

6. Pineal parenchymal tumors (PPT)

เป็นกลุ่มเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจาก pineocyte พบได้ไม่บ่อยและที่สำคัญเป็นเนื้องอกที่พบเป็นส่วนน้อยของต่อมไพเนียล โดยเนื้องอกที่พบบ่อยในบริเวณนี้กลับเป็นพวก germ cell tumor PPT แบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ Pineocytoma (เกรด II) เป็นเนื้องอกที่มี differentiation ใกล้เคียงกับ pineocyte มากที่สุด ในขณะที่ Pineoblastoma (เกรด IV) มี differentiation น้อยที่สุด และ Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation (PPTID) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่อยู่กึ่งกลางระหว่าง pineocytoma และ pineoblastoma

7. Other neuroepithelial tumors

เป็นกลุ่มเนื้องอกที่ไม่ทราบเซลล์ต้นกำเนิดที่แน่นอน ซึ่งเนื้องอกที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Angiocentric glioma (เกรด I), Chordoid glioma of 3rd ventricle (เกรด II) และ Astroblastoma ที่ยังไม่มีการให้เกรดเนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับเนื้องอกชนิดนี้ยังมีค่อนข้างน้อย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงพรรณา (descriptive study) ซึ่งได้ผ่านการพิจรณาจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Ethics Committee) แล้ว

ประชากรศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกรักษาสภาพด้วยการแช่ formalin และถูกเก็บในรูปแบบของ FFPE block (Formalin-fixed paraffin embedded block) โดยเป็นตัวอย่างที่ได้คัดเลือกมาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545-2553 โดยชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้งหมดต้องผ่านการวินิจฉัยว่าเป็นเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางกลุ่ม neuroepithelial tumor และผ่านการ review ซ้ำอีกครั้งเพื่อคัดเลือกเข้าสู่การศึกษาโดยพยาธิแพทย์ ซึ่งประกอบไปด้วย neuroepithelial tumor ทั้งหมด16 ชนิดดังนี้

Neuroepithelial tumor	WHO grade
1. Pilocytic astrocytoma	I
2. Pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA)	II
3. Diffuse astrocytoma	II
4. Anaplastic astrocytoma	III
5. Glioblastoma	IV
6. Myxopapillary ependymoma	I
7. Ependymoma	II
8. Anaplastic ependymoma	III
9. Oligodendroglioma	II
10. Anaplastic oligodendroglioma	III

11. Ganglioglioma	I
12. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNET)	I
13. Central neurocytoma	II
14. Choroid plexus papilloma/carcinoma	I / III
15. Medulloblastoma	IV
16. Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT)	IV

ตารางที่ 2. แสดงชื่อชนิดและ WHO grade ของ neuropithelial tumor ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ข้อบ่งชี้ในการคัดเลือกตัวอย่างเข้าในการศึกษา มีเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1. ต้องเป็นชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเนื้องอกในกลุ่ม neuroepithelial tumor ที่แสดงลักษณะ histology ของเนื้องอกชนิดนั้นๆอย่างชัดเจนโดยไม่ได้มีลักษณะที่ก้ำกึ่งกับเนื้องอกชนิดอื่นๆ
2. ชิ้นเนื้อตัวอย่างต้องมีขนาดไม่น้อยกว่า 4 x 4 x 2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
3. Paraffin block ของชิ้นเนื้อตัวอย่างต้องมีสภาพสมบูรณ์ไม่ชำรุดเสียหาย

การคำนวณขนาดประชากรศึกษา

การศึกษานี้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางกลุ่ม neuroepithlial tumors ซึ่งคำนวณประชากรตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลจากการทำการศึกษา pilot study ในเนื้องอกชนิด ependymoma จำนวน 27 ตัวอย่าง

กำหนดให้

n = ขนาดตัวอย่างของเนื้องอกแต่ละชนิด

P = อัตราการเกิดเหตุการณ์ (% detection)

Q = 1-P

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (acceptable error)

Z = ค่าปกติมาตรฐานที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากสูตร $n = Z^2_{\alpha/2} P Q / d^2$

พบว่า

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $\alpha = 0.005$

$$Z^2\alpha/2 = Z\ 0.05/2 = 1.96$$

$$P = 0.92$$

$$Q = 1\text{-}0.92 = 0.08$$

$$d = 0.1$$

แทนค่าลงในสมการจะได้

$$n = Z^2{}_{\alpha/2}\ P\ Q / d^2$$

$$n = (1.96)^2\ (0.92)\ (0.08) / (0.1)^2$$

$$n = 28.274$$

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ควรเลือกใช้ขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม อย่างน้อยกลุ่มละ 28 ตัวอย่าง

แต่เนื่องจากมีเนื้องอกหลายชนิดในกลุ่ม neuroepithelial tumor ที่เป็นเนื้องอกหายากและพบได้ไม่บ่อยนัก ทำให้ในการศึกษาครั้งนี้อาจมีกลุ่มของเนื้องอกบางชนิดที่มีจำนวนชิ้นเนื้อตัวอย่างไม่ถึง 28 ตัวอย่างตามขนาดประชากรศึกษาที่ระบุเอาไว้

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

1. Glass slide (ที่ coat ด้วย amonoalkylsilane)
2. Slide superfrost plus (Thermo scientific, USA)
3. Metal rack
4. Cover slide
5. Glass bowl
6. Forceps
7. Embedding mold
8. Embedding cassette
9. microtome knife
10. Floating bath
11. Cold plate
12. Oven

13. Pipette 10, 20, 100, 200, 1000 µl (Biohit, Finland)
14. Pipette tip 10, 20, 100, 200, 1000 µl (Axygen, USA)
15. Microtome (Thermo electron corporation, USA)
16. Embedding station (Leica, Germany)
17. Automated immunostainer (Ventana, USA)
18. ชุด manual TMA (3Dhistech, Hugary)

สารเคมีและชุดทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

1. **สารเคมีที่ในขั้นตอนการทำ** tissue microarray **และการตัด** section
   1) Hard paraffin (paraplast)
   2) 30% ethyl alcohol
   3) Distilled water
2. **สารเคมีท่ใช้ขั้นตอนการย้อม** H&E
   1) Absolute ethanol
   2) 95% ethanol
   3) Xylene
   4) Distilled water
   5) Haris' hematoxylin
   6) Eosin-phloxine solution
   7) Saturated lithium carbonate
   8) Permount
3. **สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน** immunohistohemistry
   1) Monoclonal mouse anti-Annexin A1 (Cell Marque, USA)
   2) Polyclonal rabbit anti-UCH-L1 (Invitrogen, USA)
   3) Diluents (Dako, Danmark)
   4) Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA)
   5) Absoluted alcohol
   6) Xylene
   7) Permount

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

1. ค้นหาและคัดเลือกชิ้นเนื้อตัวอย่างของเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางกลุ่ม neuroepithelial tumor ที่อยู่ในรูปแบบของ formalin-fix paraffin –embedded block จากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยคัดเลือกตัวอย่างตัวอย่างที่มีรหัสปีที่รับตัวอย่างตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545-2553 รวมทั้งสิ้น 223 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาตัด section ทำเป็นสไลด์และย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) เพื่อให้พยาธิแพทย์ระบุตำแหน่งของเนื้องอกที่ต้องการศึกษา

การทำ Tissue microarray (TMA)

1. นำสไลด์ H&E ที่พยาธิแพทย์ทำการกำหนดตำแหน่งที่ต้องการศึกษาแล้วไปเทียบกับหน้าตัดของชิ้นเนื้อบน paraffin block จากนั้นทำการเจาะชิ้นเนื้อบน paraffin block ด้วยแท่งเหล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 มม. จากชุด manual TMA (3Dhistech, Hungary) ตรงตำแหน่งที่ต้องการศึกษา โดยจะทำการเจาะชิ้นเนื้อ 1 แท่งต่อ 1 paffin block
2. นำชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาไปจัดเรียงแถวบน embedding mold ที่จะใช้เป็นแบบบล็อก โดยใน 1 TMA block จะบรรจุชิ้นเนื้อจำนวน 21 แท่ง
3. ทำการฝังชิ้นเนื้อลงใน paraffin โดยการเติม paraffin เหลวจากเครื่อง embedding station (Leica, Germany) ให้เต็ม mold แล้วนำ embedding cassette มาวางกดทับบน mold
4. นำ embedding mold ที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่วางบนแท่นทำความเย็น (cold plate) ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้ paraffin แข็งตัว
5. กระเทาะ mold ออกเมื่อ paraffin แข็งตัวดีแล้ว จะได้TMA block ที่มีชิ้นเนื้อจากหลายๆ block มารวมอยู่ใน block เดียวกัน

หมายเหตุ : ในระหว่างการทำ tissue microarray block (TMA block) นั้นจะต้องทำแผนผังของเลขพยาธิ (Patho No.) ของชิ้นเนื้อที่ตรงกับตำแหน่งบน TMA block ไว้ด้วย เพื่อให้ทราบว่าชิ้นเนื้อที่อยู่ในแต่ละตำแหน่งบน TMA block นั้นเป็นชิ้นเนื้อที่มาจาก paraffin block ไหน

การตัด section

ทำการตัด section ของ paraffin block สำหรับการย้อม H&E เพื่อให้พยาธิแพทย์กำหนดตำแหน่งที่ต้องการศึกษาบนชิ้นเนื้อ และตัด section ของ TMA block สำหรับการย้อม H&E เพื่อตรวจสอบว่าตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาว่าตรงกับตำแหน่งที่พยาธิแพทย์กำหนดไว้หรือไม่ รวมถึงสำหรับการย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำ paraffin block มาวางบน cold plate เพื่อทำให้ block เย็นก่อนตัด
2. ตัด section ให้ได้เป็นแถบที่ยาวติดต่อกัน (ribbon) ด้วยเครื่อง microtome (Thermo electron corporation, USA) โดยตัดให้ section มีความหนา 3 ไมครอน
3. ค่อยๆวาง ribbon ที่ตัดลงบน 30% alcohol จากนั้นใช้สไลด์ช้อน section ออก แล้วนำไปวางบน floating bath ที่บรรจุน้ำกลั่นอุณหภูมิ 60 ^{o}c เพื่อทำให้ section ยืดออกไม่เกิดการยับย่นและเกิดฟองอากาศ
4. ใช้สไลด์ช้อน section ออกจาก floating bath โดยกะให้ section อยู่ตรงส่วนกลางของสไลด์
5. นำสไลด์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 60^{o}c ใช้เวลาอบประมาณ 30 นาทีขึ้นไปสำหรับสไลด์ H&Eและ 4 ชั่วโมงขึ้นไปสำหรับสไลด์ immunohistochemistry หรืออบทิ้งไว้ทั้งคืน

หมายเหตุ : ใช้สไลด์ที่ coat ด้วย amonoalkylsilane สำหรับย้อม H&E และใช้สไลด์ superfrost plus (Thermo scientific, USA) สำหรับย้อม immnohistochemistry

การย้อม Hematoxylin-Eosin (H&E)

1. นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไป deparaffinize สไลด์โดยการแช่ใน xylene 3 โถ โถละ 3นาที แล้วนำไปจุ่ม (dip) ใน 95% alcohol อีก 3 โถ โถละ 10 ครั้ง จากนั้นทำการ hydrate สไลด์ในน้ำประปาไหลผ่าน (running tap water) ประมาณ 3-5 นาที
2. ย้อมสไลด์ในสี Harris ‘ hematoxylin โดยแช่ทิ้งไว้ 3 นาที
3. ล้างสีส่วนเกินออกในน้ำประปาไหลผ่านปรมาณ 3-5 นาที
4. ปรับสีให้เป็นสีน้ำเงิน (bluing) โดย dip สไลด์ใน saturated lithium carbonate ประมาณ 1-2 ครั้ง
5. ล้างสไลด์ในน้ำประปาไหลผ่านประมาณ 3-5 นาที
6. Dip สไลด์ใน 95% alcohol ประมาณ 10 ครั้ง

7. ย้อมสไลด์ด้วยสี Eosin-phloxine working solution โดยแช่ทิ้งไว้ 3 นาที
8. Dehydrate สไลด์โดยนำไป dip ใน 95% alcohol 2 โถ, absolute alcohol 2 โถ และ xylene 2โถ โถละ 10 ครั้ง
9. Mount สไลด์ด้วย permount แล้วปิดทับด้วย cover slide

การย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมี (immuohistochemistry)

1. นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไปย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมีด้วยในเครื่องย้อมอัตโนมัติ Ventana automated immunostainer จากบริษัท Ventana ประเทศสหรัฐอเมริกา (ปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน) โดยใช้ antibody 2 ชนิด ได้แก่ monoclonal mouse anti-Annexin A1 (Cell Marque, USA) ซึ่ง dilute กับ diluents (Dako, Denmark) ในอัตราส่วน 1:100 และ polyclonal rabbit anti-UCH-L1 (Invitrogen, USA) ซึ่ง dilute ในอัตราส่วน 1:1000 และใช้ชุด Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, USA) ในการตรวจสอบ antigen
2. นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จแล้วไป dip ใน absolute alcohol 2 โถ และ xylene 2 โถ โถละ 10 ครั้ง จากนั้น mount สไลด์ด้วย permount แล้วปิดทับด้วย cover slide

** สำหรับการย้อม immunohistochemistry นั้น จะใช้เนื้อเยื่อไตปกติ (human kidney tissue) เป็น positive control และใช้เนื้อเยื่อไตปกติที่ไม่ได้หยด primary antibody ในขั้นตอนการย้อมเป็น negative control

การบันทึกข้อมูล

1. แปลผลระดับการแสดงออกของโปรตีนซึ่งมีระดับการแสดงออกตั้งแต่ 0 ถึง 3+ ตาม immunoreactive score ซึ่งได้แก่

   0 = ไม่พบ positive tumor cell

   1+ = พบ positive cell น้อยกว่า 10% ของ tumor cell ทั้งหมด

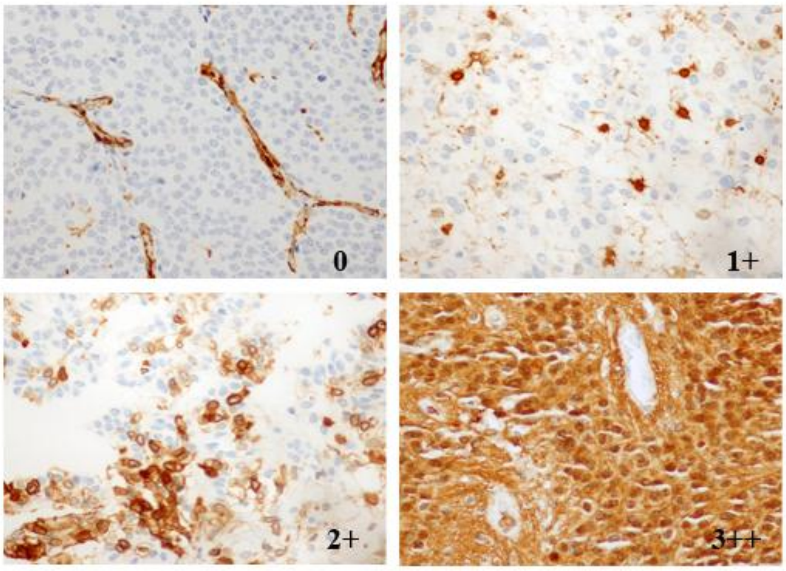
   2+ = พบ positive cell ตั้งแต่ 10-50% ของ tumor cell ทั้งหมด

   3+ = พบ positive cell มากกว่า 50% ของ tumor cell ทั้งหมด

โดยกำหนดให้ score 0 และ 1+ ถือว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีน (ผลเป็น negative)

score 2+ และ 3+ ถือว่ามีการแสดงออกของโปรตีน (ผลเป็น positive) [37]

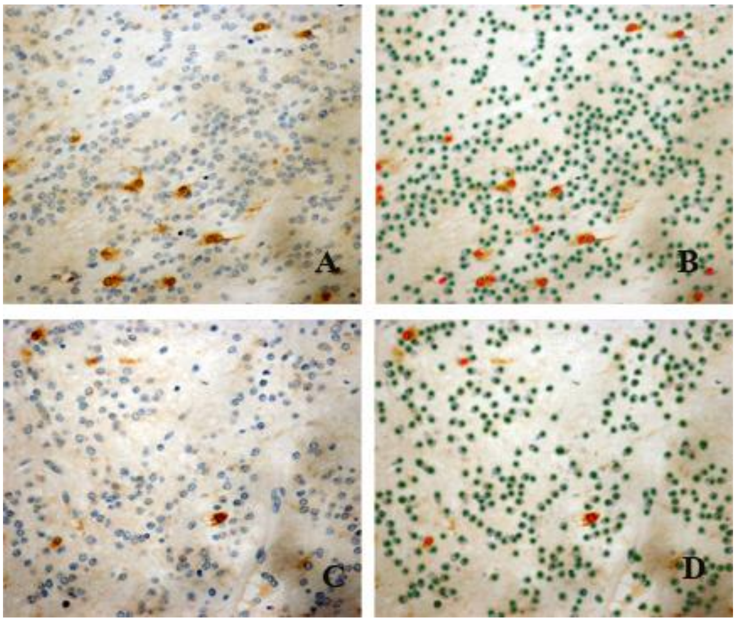
ในการศึกษาครั้งนี้จะมีผู้แปลผลระดับการแสดงออกของโปรตีน 2 คน (ผู้วิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์) โดยแต่ละคนจะแยกกันแปลผลก่อน จากนั้นจะนำผลที่ได้มาพิจารณาร่วมกัน ซึ่งผล score สุดท้ายที่ได้จะเป็นผลที่ผู้แปลผลทั้ง 2 คนมีความเห็นที่ตรงกันอย่างน้อย 90%



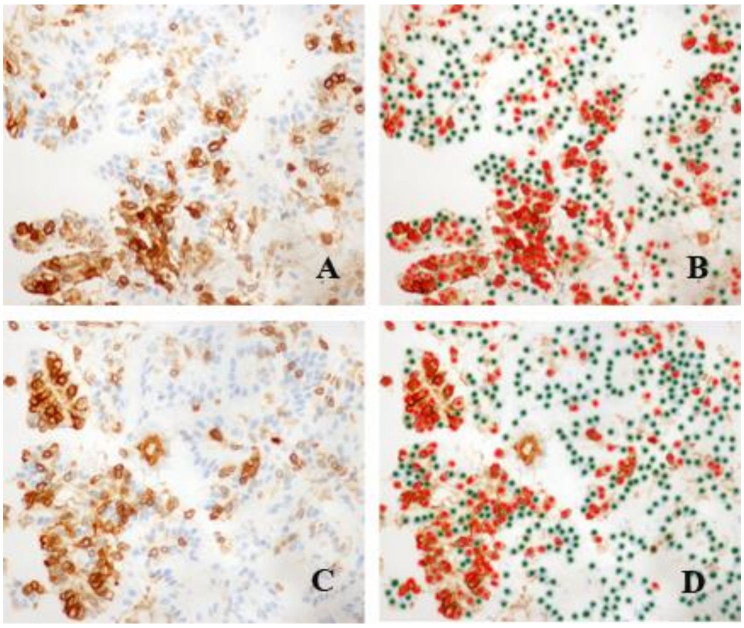
รูปที่ 17. แสดงรูปตัวอย่างระดับการแสดงออกของโปรตีน (immunoreactive score)

2. ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการ random ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 1+ จำนวน 10 ตัวอย่าง และ score 2+ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยนำสไลด์ที่ได้จากการย้อม immunohistochemistry ของตัวอย่างที่ถูก random มาถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x ซึ่งจะ random ถ่าย 2 field ต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อนับจำนวน positive cell และหาเปอร์เซ็นต์ของ positive cell เพื่อที่จะนำเปอร์เซ็นของ positive cell ที่นับได้ไปเปรียบเทียบกับผลของการให้ score (grading) ว่าได้ผลตรงกันหรือไม่

   และเนื่องจากตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกที่ score 0 และ 3+ นั้นแสดงผล negative และ positive ที่ค่อนข้างชัดเจน ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการ random และนับจำนวน positive cell ในตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score ดังกล่าว



รูปที่ 18. แสดงรูปตัวอย่างของ sample ที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 1+ ซึ่ง A และ C แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศ์, B และ D แสดงภาพจากการนับเซลล์ โดยจุดสีแดงแทน positive cell และจุดสีเขียวแทน negative cell



รูปที่ 19. แสดงรูปตัวอย่างของ sample ที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 2+

Score 1 +				Score 2+			
Case	Positive Cell	Total tumor cell	% positive	case	Positive cell	Total tumor cell	% positive
1	101	1538	6.56	1	191	670	28.50
2	70	1172	5.97	2	415	1024	40.52
3	57	1070	5.32	3	265	691	38.35
4	25	412	6.06	4	338	637	53.06
5	17	837	2.03	5	360	995	36.18
6	14	594	2.35	6	406	949	42.78
7	47	932	4.83	7	159	421	37.77
8	18	1021	1.76	8	222	592	37.50
9	17	496	3.42	9	196	507	38.65
10	47	1304	3.61	10	211	521	40.49

ตารางที่ 3. แสดงผลการนับเซลล์จากการ random ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออของโปรตีนที่ score 1+ และ 2+

จากตารางพบว่า ตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 1+ ที่ถูก random มาทั้ง 10 ตัวอย่าง มีจำนวน positive cell ไม่ถึง 10% ของ tumor cell ทั้งหมด และตัวอย่างที่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ score 2+ ที่ถูก random มา มี 9 ตัวอย่างที่มีจำนวน positive cell อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10-50% และมี 1 ตัวอย่างที่มีจำนวน positive cell มากกว่า 50% ของ tumor cell ทั้งหมด ซึ่งจากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่ามี 19 ตัวอย่าง (95%) ที่ผลของการนับเซลล์ตรงกับผลของการให้ score และมีเพียง 1 ตัวอย่างที่ผลไม่ตรงกัน กล่าวคือมี 1 ตัวอย่างที่ระดับการแสดงออกของโปรตีนอยู่ที่ score 2+ แต่ผลจากการนับเซลล์พบว่ามี score อยู่ที่ 3+ แต่เนื่องจาก score 2+ และ 3+ ก็ให้ผลเป็น positive เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงถือว่าผลจากการนับเซลล์และการให้ score มีผลตรงกันทั้ง 20 ตัวอย่าง ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า การให้ score (grading) และการแปลผลของ immunohistochemistry ในการศึกษาครั้งนี้มีความถูกต้องและสามารถเชื่อถือได้

คำนวณค่าการแสดงออกของโปรตีน

คำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงออกของโปตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor แต่ละชนิด

ตรวจสอบข้อมูลและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปรียบเทียบร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกโรค รวมทั้งคำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Chi-Square test ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 (SPSS Inc., USA) โดยค่าที่ยอมรับได้กำหนดให้มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 **ใน** neuroepithelial tumor **ชนิดต่าง ๆ**

Neuroepithelial tumor	Total No. (cases)	Immunopositive (cases)	% Positive
Myxopapillary Ependymoma	5	5	100
Ependymoma	27	25	92.59
Anaplastic Ependymoma	4	3	75.00
Pilocytic Astrocytoma	18	10	55.56
Pleomorphic Xanthoastrocytoma (PXA)	6	5	83.33
Low-grade diffuse Astrocytoma	36	7	19.44
Anaplastic Astrocytoma	9	2	22.22
Glioblastoma	25	16	64.00
Oligodendroglioma	16	3	18.75
Anaplastic Oligodendroglioma	14	2	14.29
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	7	0	0
Central neurocytoma	14	0	0
Ganglioglioma	7	5	71.43
Choroid plexus papilloma/carcinoma	6	2	33.33
Medulloblastoma	22	0	0
Atypical teratoid /rhabdoid tumor	4	3	75.00
total	220	98	44.54

ตารางที่ 4. แสดงผลการแสดงออกของ Annexin A1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆจำนวน 16ชนิด

จากข้อมูลในตารางพบว่า โปรตีน Annexin A1 มีการแสดงออกในระดับสูง (high expression level) ในเนื้องอกชนิด myxopapillary ependymoma และ ependymoma (100% และ 92% ตามลำดับ) แต่ในเนื้องอกชนิด central neurocytoma และ medulloblastoma นั้นกลับพบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้

สำหรับเนื้องอกในกลุ่ม diffuse astrocytoma นั้น พบว่า Annexin A1 จะมีการแสดงออกที่แปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่สูงขึ้น กล่าวคือ จะพบการแสดงออกที่น้อยที่สุดในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astrocytoma (19%) ใน anaplastic astrocytoma จะพบการแสดงออกที่สูงขึ้น (22%) และพบการแสดงออกที่สูงที่สุดใน glioblastoma (64%) ซึ่งเป็นการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกใน low-grade diffuse asrocytoma (p=0.001) และ anaplastic astrocytoma (p=0.038)

<u>ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 ในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกโรค</u>

ในส่วนของข้อมูลการแสดงออกของ Annexin A1 ที่น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคนั้น การศึกษาครั้งนี้พบว่า Annexin A1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma ในระดับที่สูงมากแต่ในเนื้องอกชนิด central neurocytoma นั้นกลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้เลย และเนื่องจากการวินิจฉัยแยกของของเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้ค่อนข้างจะยากและสับสนได้ในบางครั้ง โดยเฉพาะในกรณีของ subtype clear cell ependymoma ซึ่งมีลักษณะ histology ที่คล้ายคลึงกับ central neurocytoma มากและมักจะพบรอยโรคที่ช่องสมองเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ Annexin A1 ในเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0000002) และหากใช้ Annexin A1 เป็น marker ที่ใช้ในการแยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้ พบว่าจะมีค่า sensitivity อยู่ที่ 92%, specificity ที่ 100%, positive และ negative predictive value อยู่ที่ 100% และ 86% ตามลำดับ

นอกจากนี้การแสดงออกของ Annexin A1ยังสามารถใช้แยกเนื้องอกชนิด ependymoma ออกจาก medulloblastoma ได้เช่นกัน ($p<10^{-8}$) ซึ่งจะมีค่า sensitivity อยู่ที่ 92%, specificity ที่ 100%, positive และ negative predictive value ที่ 100% และ 91% ตามลำดับ ซึ่งจากค่าเหล่านี้เป็นไปได้ว่า Annexin A1 น่าจะเป็น protein marker ที่ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคระหว่าง ependymoma กับ central neurocytoma และ medulloblastoma ได้

2. **ผลการแสดงออกของโปรตีน** UCH-L1 **ใน** neuroepithelail tumor **ชนิดต่าง ๆ**

Neuroepithelial tumor	Total No. (cases)	Immunopositive (cases)	% Positive
Myxopapillary Ependymoma	5	0	0
Ependymoma	28	16	57.14
Anaplastic Ependymoma	4	2	50.00
Pilocytic Astrocytoma	18	1	5.56
Pleomorphic Xanthoastrocytoma (PXA)	6	4	66.67
Low-grade diffuse Astrocytoma	36	6	16.67
Anaplastic Astrocytoma	10	5	50.00
Glioblastoma	25	14	56.00
Oligodendroglioma	17	8	47.06
Anaplastic Oligodendroglioma	15	7	46.67
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	7	7	100
Central neurocytoma	13	1	7.69
Ganglioglioma	7	7	100
Choroid plexus papilloma/carcinoma	6	1	16.67
Medulloblastoma	22	1	4.55
Atypical teratoid /rhabdoid tumor	4	2	50.00
total	223	82	36.77

ตารางที่ 5. แสดงผลการแสดงอกของ UCH-L1 ใน neuroepithelial ชนิดต่างๆ จำนวน 16 ชนิด

*** หมายเหตุ : เนื่องจากชิ้นเนื้อตัวอย่างในการศึกษามีความหนาบางไม่เท่ากัน ซึ่งบางตัวอย่างอาจตัดหมดก่อนตัวอย่างอื่นๆทำให้ไม่สามารถย้อมแอนติบอดี้ได้ครบทั้ง 2 ชนิด จึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ย้อม Annexin A1 และ UCH-L1 มีจำนวนไม่เท่ากัน

จากข้อมูลในตารางพบว่า โปรตีน UCH-L1 มีการแสดงออกในระดับสูงในเนื้องอกชนิด dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNET) และ ganglioglioma (100%) ส่วนในเนื้องอกชนิด myxopapillary ependymoma นั้นไม่พบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้

เช่นเดียวกันกับผลของ Annexin A1 ในเนื้องอกกลุ่ม diffuse astrocytoma นั้นพบการแสดงออกของ UCH-L1 แปรผันตรงกับเกรดของ astrocytoma ที่สูงขึ้น โดยใน glioblastoma จะพบการแสดงออกในระดับสูงสุด (56%) รองลงมาคือ anaplastic astroytoma (50%) และน้อยที่สุดใน low-grade diffuse astrocytoma (16%) และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ UCH-L1 ใน high- grade และ low-grade astrocytoma แล้วก็พบว่า มีการแสดงออกในเนื้องอกกลุ่ม high-grade สูงกว่าใน low-grade อย่างมีนัยสำคัญ (grade III > grade II, P = 0.043 และ grade IV > grade II, P = 0.003)

<u>ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน UCH-L1 ในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกโรค</u>

สำหรับข้อมูลการแสดงออกของ UCH-L1 ที่น่าจะมีประโยชน์ในการการช่วยวินิจฉัยโรคนั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า UCH-L1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด pilocytic astrocytoma ในระดับที่ค่อนข้างน้อย (5%) ส่วนในเนื้องอกชนิด gliolastoma นั้นมีการแสดงออกในระดับที่สูงกว่าค่อนข้างมาก (56%) โดยการแสดงออกของ UCH-L1 ในเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.001) ในการวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้ค่อนข้างยากและอาจจะสับสนได้ในบางครั้ง เนื่องจากเป็นเนื้องอกที่อยู่ในกลุ่ม astrocytic tumor เหมือนกัน มีลักษณะ histology ที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะการพบลักษณะของ endothelial proliferation ที่สามารถพบได้ในเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งหากใช้ UCH-L1 เป็น marker ที่ใช้ในการแยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้พบว่ามีค่า sensitivity อยู่ที่ 56%, specificity และ positive predictive value สูงถึง 94% และ 93% ตามลำดับ ส่วนค่า negative prevalue นั้นอยู่ที่ 60% ซึ่งจากเหตุผลเหล่านี้เป็นไปได้ว่า UCH-L1 น่าจะเป็น protein marker ที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกระหว่าง glioblastoma และ piloccytic astrocytoma ได้

3. **ผลการแสดงออกของโปรตีน** Annexin A1 **ร่วมกับ** UCH-L1 **ใน** neuroepithelial tumor (combination of Annexin A1 and UCH-L1 results)

Neuroepithelial tumor	Annexin A1 / UCH-L1				total
	+/+	+/-	-/+	-/-	
Pleomorphic xanthoastrocytoma	3	2	1	0	6
Pilocytic astrocytoma	1	10	0	7	18
Low-grade diffuse astrocytoma	2	5	4	25	36
Anaplastic astrocytoma	0	2	4	3	9
Glioblastoma	9	7	5	4	25
Myxopapillary ependymoma	0	5	0	0	5
Ependymoma	14	10	1	1	26
Anaplastic ependymoma	2	1	0	1	4
Oligodendroglioma	1	2	5	6	14
Anaplastic oligodendroglioma	1	1	6	6	14
Ganglioglioma	5	0	2	0	7
Desymbryoplastic neuroepithelial tumor	0	0	7	0	7
Central neurocytoma	0	0	1	12	13
Choroid plexus papilloma/carcinoma	0	2	1	3	6
Medulloblastoma	0	0	1	21	22
Atypical teratoid/rhabdoid tumor	2	1	0	1	4

ตารางที่ 6. แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 ร่วมกับ UCH-L1 ใน Neuroeithelial tumor 16 ชนิด

*** หมายเหตุ : ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ทำการพิจารณาการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ร่วมกันนั้น เป็นชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ย้อมแอนติบอดี้ครบทั้ง 2 ชนิด

จากข้อมูลในตารางพบว่า ในเนื้องอกชนิด ganglioglioma (71%) ส่วนใหญ่จะพบการแสดงออกของ Annexin A1 ควบคู่กับการแสดงออกของ UCH-L1 กล่าวคือโปรตีนทั้งสองชนิดให้ผลเป็น positive ทั้งคู่ และยังพบว่าในทุกตัวอย่างของเนื้องอกชนิด myxopappillary ependymoma นั้นจะพบการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 เพียงอย่างเดียว ซึ่งตรงกันข้ามกับเนื้องอกชนิด dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNET) ที่ในทุกตัวอย่างจะพบการแสดงออกของโปรตีน UCH-L1 เพียงอย่างเดียว ส่วนเนื้องอกที่ส่วนใหญ่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนั้นได้แก่ เนื้องอกชนิด medulloblastoma และ central neurocytoma (95% และ 92% ตามลำดับ)

<u>ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 ร่วมกับ UCH-L1ในเนื้องอกชนิดที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่คล้ายคลึงกันและมักจะมีปัญหาในการวินิจฉัย</u>

สำหรับข้อมูลการแสดงออกของ Annexin A1 ร่วมกับ UCH-L1ที่น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคนั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า 14 ใน 26 ตัวอย่าง (53%) ของเนื้องอกชนิด ependymoma มีผลการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดเป็น positive และมีเพียงแค่ 1 ตัวอย่าง (3%) เท่านั้นที่โปรตีนทั้งสองชนิดให้ผลเป็น negative ซึ่งในทางกลับกัน ในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astrocytoma นั้นกลับพบว่า 25 ใน 36 ตัวอย่าง (69%) ของเนื้องอกชนิดนี้มีผลการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดเป็น negative และมีเพียงแค่ 2 ตัวอย่าง (5%) เท่านั้นที่พบผล positive ของโปรตีนทั้งสองชนิด ในการพิจารณาการแสดงออกของโปนตีนทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันเป็น combined marker เพื่อช่วยในการวินิจฉัยแยกระหว่างเนื้องอกชนิด ependymoma และเนื้องอกชนิด astrocytoma ซึ่งมักจะพบปัญหาในการวินิจฉัยได้ในบางครั้งโดยเฉพาะในกรณีที่รอยโรคเกิดที่ไขสันหลังที่มักจะได้ชิ้นเนื้อส่งตรวจในปริมาณที่น้อยซึ่งทำให้ยากต่อการวินิจฉัยนั้นจะสามารถใช้ได้ภายใต้ 2 เงื่อนไขซึ่งได้แก่

เงื่อนไขแรกเป็นการพิจรณาการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 (Annexin A1 and UCH-L1) หมายความว่าโปรตีนทั้งสองชนิดต้องให้ผลเป็น positive ทั้งคู่จึงจะถือว่าตัวอย่าง

นั้นมีผลเป็น positive ซึ่งภายใต้เงื่อนไขนี้จะพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้จะมีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma สูงกว่าใน astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.000065) และหากใช้ combined marker ภายใต้เงื่อนไขนี้แยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้พบว่าจะมีค่า sensitivity อยู่ที่ 54%, specificity ที่ 94%, positive และ negative predictive value ที่ 88% และ 73% ตามลำดับ

สำหรับเงื่อนไขที่สองนั้นจะเป็นการพิจรณาการแสดงออกของ Annexin A1 และ/หรือ UCH-L1 (Annexin A1 and/or UCH-L1) ซึ่งหมายความว่าต้องมีโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งที่ให้ผลเป็น positive หรือให้ผล positive ทั้งสองชนิดจึงจะถือว่าตัวอย่างนั้นมีผล positive และเมื่อพิจารณาภายใต้เงื่อนไขนี้ก็จะพบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma สูงกว่าใน astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน (P=0.0000009) ซึ่งหากใช้เป็น marker เพื่อแยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้พบว่าจะมีค่า sensitivity และ negative predictive value สูงถึง 96%, ส่วน specificity และ positive predictive value นั้นจะอยู่ที่ 69% ซึ่งจากผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า combined marker ระหว่าง Annexin A1 และ UCH-L1 น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคระหว่าง ependymoma และ diffuse astrocytoma ได้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

Annexin A1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ calcium binding anti-inflammatory protein มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในมะเร็งหลายชนิด โดยในบางชนิดอาจมีการแสดงออกที่มากขึ้นแต่ในบางชนิดอาจจะมีการแสดงออกที่ลดลงหรือไม่พบแสดงออกเลย [16-24] สำหรับการแสดงออกของ Annexin A1 ใน neuroepithelial tumor นั้น ในงานวิจัยของ de Bont Judith M. และคณะ ซึ่งได้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในเนื้องอกชนิด ependymoma และ PNET โดยวิธี proteomics analysis และ immunohistochemistry นั้นพบว่า โปรตีน Annexin A1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด ependymoma แต่ไม่แสดงออกในเนื้องอกชนิด PNET [7] ซึ่งจากผลดังกล่าว มีความสอดคล้องกับผลของงานวิจัยชิ้นนี้ที่พบการแสดงออกของ Annexin A1 ใน ependymoma ในระดับที่สูงมากแต่ใน medulloblastoma (ซึ่งเป็นเนื้องอกที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ PNET) กลับไม่พบการแสดงออกโปรตีนชนิดนี้ นอกจากนี้ งานวิจัยชิ้นนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ Annexin A1 สามารถใช้แยกเนื้องอกชนิด ependymoma ออกจาก medulloblastoma และ central neurocytoma ได้ โดยพบว่าจะมีค่า sensitivity อยู่ที่ 92% และ specificity ที่ 100% สำหรับในงานวิจัยของ Jens Schittenhelm และคณะ ซึ่งทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ใน neuroepithelial tumor โดยใช้เทคนิค western blot analysis, RT-PCR และ immunohistochemistry [28] นั้นพบว่า Annexin A1 มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้องอกกลุ่ม ependymoma และการแสดงออกจะแปรผกผันกับเกรดของเนื้องอกที่สูงขึ้น กล่าวคือพบการแสดงออกสูงสุดในเนื้องอกชนิด myxopapillary ependymoma (WHO grade I) รองลงมาคือชนิด ependymoma (WHO grade II) และน้อยที่สุดในชนิด anaplastic ependymoma (WHO grade III) โดยจะพบการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเนื้องอก grade III เมื่อเทียบกับเนื้องอก grade I นอกจากนี้ยังพบว่าในเนื้องอกกลุ่ม diffuse astrocytoma จะมีการแสดงออกของ Annexin A1 ที่แปรผันตรงตามเกรดของเนื้องอกที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยจะพบการแสดงออกที่สูงสุดในเนื้องอกชนิด glioblastoma (WHO grade IV) รองลงมาคือชนิด anaplastic astrocytoma (WHO grade III) และ low-grade diffuse astrocytoma (WHO grade II)

ตามลำดับ ซึ่งจากผลเหล่านี้ก็มีความสอดคล้องกับผลจากการศึกษาในครั้งนี้เช่นกัน ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ Annexin A1 จะแปรผกผันกับเกรดของ ependymoma ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยในเนื้องอกชนิด myxopapillary ependymoma จะพบ Annexin A1 positive ที่ระดับสูงที่สุด (100%) รองลงมาคือ ependymoma (92%) และน้อยที่สุดใน anaplastic ependymoma (75%) แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การแสดงออกดังกล่าวก็ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด สำหรับในส่วนของเนื้องอกกลุ่ม diffuse astrocytoma นั้น ในการศึกษาครั้งนี้ก็พบว่า Annexin A1จะมีการแสดงออกที่แปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยจะพบการแสดงออกที่น้อยที่สุดในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astrocytoma (19%) ใน anaplastic astrocytoma จะพบ Annexin A1 positive ในระดับที่สูงขึ้น (22%) และใน glioblastoma นั้นพบการแสดงออกของ Annexin A1 ในระดับสูงที่สุด (64%) ซึ่งเป็นการแสดงออกในระดับที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับใน low-grade diffuse astrocytoma และ anaplastic astrocytoma แสดงให้เห็นว่า Annexin A1 เป็นโปรตีนที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงหรือการพัฒนา (progression) ของเซลล์มะเร็งจาก low-grade astrocytoma ไปเป็น high-grade astrocytoma และนอกจากข้อมูลเหล่านี้ที่สอดคล้องกันแล้วยังพบข้อมูลที่ขัดแย้งกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วย

เช่นกัน ซึ่งในงานวิจัยของ Jens Schitten helm และคณะนั้น [28] พบว่า ค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของ Annexin A1 ในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astocytoma นั้นสูงกว่าในเนื้องอกชนิด oligodendroglioma อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในการศึกษาครั้งนี้กลับพบว่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Annexin A1 ในเนื้องอกชนิด low-grade diffuse astrocytoma นั้นสูงกว่าใน oligodendroglioma เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (19% และ 18% ตามลำดับ) และไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับผลจากงานวิจัยของ Mahlon D. Johnson และคณะที่พบว่า การแสดงออกของ Annexin A1 ใน oligodendroglioma ไม่ได้แตกต่างกับใน astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด [29] ซึ่งผลที่ขัดแย้งกับผลของงานวิจัยของ Jen Schittenhelm และคณะนั้น ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากวิธีการวัดและแปลผลที่แตกต่างกัน เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวจะแปลผลการแสดงออกของโปรตีนเป็น 6 ระดับคือ 0-5 และหาค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของโปรตีนจากระดับการแสดงออกของโปรตีนที่แปลผลได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้จะแปลผลการแสดงออกของโปรตีนเป็น 4 ระดับคือ 0 - 3+, กำหนดผลการ

แสดงออกของโปรตีนเป็น negative และ positive (0 และ 1+ เป็น negative, 2+ และ 3+ เป็น positive) และคิดเปอร์เซ็นการแสดงออกของโปรตีนจากจำนวน case ที่มีผลเป็น positive ซึ่งจากวิธีการวัดและแปลผลที่แตกต่างกันดังกล่าวน่าจะทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน

โปรตีนอีกหนึ่งชนิดที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้คือ UCH-L1 เป็นโปรตีนที่บทบาทสำคัญใน ubiquitin proteasome pathway ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ligase และ hydrolase โปรตีนชนิดนี้มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้องอกหลากหลายชนิดโดยมีทั้งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและลดลงเช่นเดียวกันกับ Annexin A1 [30-35] และในส่วนของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ neuroepithelial tumor นั้น ในงานวิจัยของ Chul-Kee Park และคณะ ซึ่งได้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในบริเวณเซลล์มะเร็งเกรดต่ำ (grade II) และบริเวณเซลล์มะเร็งเกรดสูง (grade III, IV) ที่อยู่ในก้อน glioblastoma โดยวิธี proteomics analysis และ immunohistochemistry นั้น พบว่าโปตีน UCH-L1 มีการแสดงออกในระดับสูงที่บริเวณของเซลล์มะเร็งเกรดต่ำและมีการแสดงออกที่ลดลงหรือไม่แสดงออกเลยในบริเวณของเซลล์มะเร็งเกรดสูง [8] ซึ่งจากผลดังกล่าวมีความขัดแย้งกับผลจากการศึกษาในครั้งนี้ กล่าวคือในการศึกษาครั้งนี้พบว่า UCH-L1 มีการแสดงออกใน high-grade astrocytoma สูงกว่าใน low-grade astrocytoma โดยในเนื้องอกชนิด glioblastoma จะพบ UCH-L1 positive ในระดับที่สูงที่สุด (56 %) รองลงมาคือ anaplastic astrocytoma (50%) ส่วนใน low-grade diffuse astrocytoma นั้น พบ UCH-L1 positive ในระดับที่น้อยที่สุด (16%) ซึ่งถือว่ามีการแสดงออกที่แปรผันตรงตามเกรดของ astrocytoma ที่เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ UCH-L1 ใน high-grade และ low-grade diffuse astrocytoma แล้วก็พบว่า มีการแสดงออกในเนื้องอกกลุ่ม high-grade สูงกว่าใน low-grade อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า UCH-L1 อาจจะเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือการพัฒนาจาก low-grade astrocytoma ไปเป็น high-grade astocytoma เช่นเดียวกันกับ Annexin A1 ส่วนผลที่ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Chul-Kee Park และคณะนั้น [8] ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากการใช้ sample ที่แตกต่างกัน เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเนื้องอก low-grade และ high-grade astrocytoma จริงๆ แต่ในการศึกษาดังกล่าวใช้บริวณของเซลล์มะเร็งเกรดต่ำ (grade II) และเกรดสูง (grade III, IV) ในก้อน glioblastoma มาศึกษาและจำนวน sample size ก็มีเพียง 3

sample เท่านั้น ซึ่งผลการแสดงออกของ UCH-L1 ในบริเวณเซลล์มะเร็งเกรดต่ำและเกรดสูงในงานวิจัยดังกล่าวอาจจะไม่ได้ representative การแสดงออกของ UCH-L1 ในเนื้องอก low-grade และ high-grade astrocytoma จึงทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน

สำหรับข้อมูลการแสดงออกของ UCH-L1 ที่น่าจะมีประโยชน์ในการการช่วยวินิจฉัยโรคนั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า UCH-L1 มีการแสดงออกในเนื้องอกชนิด glioblastoma สูงกว่าใน pilocytic astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหากใช้ UCH-L1 เป็น marker ที่ใช้แยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้พบว่าจะมีค่า specificity ที่ 94% และ positive predictive value ที่ 93%

ในส่วนของเนื้องอกที่ประกอบด้วยเซลล์หลายๆชนิดรวมกันอย่าง atypical teratoid/rhabdoid tumor ที่ประกอบไปด้วย rhabdoid cell, epithelial cell, mesenchymal cell และบริเวณของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของเนื้องอกชนิด PNET (small blue round cell) นั้น ในเนื้องอกชนิดนี้ จะพบการแสดงออกของ UCH-L1 และ Annexin A1 ในเฉพาะบริเวณของ rhabdoid cell เป็นส่วนมาก ส่วนในบริเวณของเซลล์ชนิดอื่นๆแทบจะไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า UCH-L1 มีการแสดงออกในระดับที่สูงมาก (100%) ในเนื้องอกที่หายากบางชนิดอย่างเช่น ganglioglioma และ dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNET) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

สำหรับการพิจรณาการแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และ UCH-L1 ร่วมกันเป็น combined marker นั้นพบว่า โปรตีนทั้งสองชนิดจะมีการแสดงออกใน ependymoma สูงกว่าใน low-grade diffuse astrocytoma อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ที่ต้องให้ผลโปรตีนเป็น positive อย่างน้อยหนึ่งชนิด (Annexin A1 and/or UCH-L1) นั้นสามารถแยกเนื้องอกทั้งสองชนิดนี้ได้โดยมีค่า sensitivity และ negative predictive value อยู่ที่ 96%

และถึงแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะมีข้อจำกัดอย่างเช่นจำนวนของชิ้นเนื้อตัวอย่างที่น้อยมากในเนื้องอกหายากบางชนิด ซึ่งทำให้ผลการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มของเนื้องอกเหล่านี้อาจบ่งบอกอะไรไม่ได้มากนัก แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้ก็ทำให้ได้ทราบถึงข้อมูลการแสดงออกของ

Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกหลายๆชนิดในกลุ่ม neuroepithelial tumor และข้อมูลดังกล่าวก็น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกกลุ่มนี้ได้ต่อไปในอนาคต ซึ่งก็ตรงตามจุดประสงค์ของงานวิจัยที่ได้ตั้งไว้

โดยสรุปแล้วจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า โปรตีน Annexin A1, UCH-L1 และ combined marker ระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ น่าจะเป็น marker ที่มีประประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคของเนื้องอกระบบประสาทส่วนกลางกลุ่ม neuroepithelial tumor ได้ โดยการแสดงออกของ Annexin A1 สามารถใช้แยกเนื้องอกชนิด ependymoma ออกจาก central neurocytoma และ medulloblastoma ได้ การแสดงออกของ UCH-L1 ใช้แยกเนื้องอกชนิด glioblastoma ออกจาก pilocytic astrocytoma ได้ และ combined marker ของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ก็สามารถแยกเนื้องอกชนิด ependymoma ออกจาก low-grade diffuse astrocytoma ได้ ส่วนการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1ที่แปรผันตรงตามเกรดของ diffuse astrocytoma ที่สูงขึ้นนั้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้น่าจะมีความเกียวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาของเซลล์จาก low-grade astrocytoma ไปเป็น high-grade astrocytoma

รายการอ้างอิง

(1) ชนพ ช่วงโชติ. พยาธิวิทยาของเนื้องอกระบบประสาท. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ :เท็กซ์ แอนด์ จอร์นัล, 2549.

(2) Kumar, V., Abbas, A.K., and Fauston, N. Pathology Basis of Disease 7 th ed. Pennsylvania :Elsevier Inc. (2005): 1401-1414.

(3) Louis, D.N., Ohgaki, H., and Wiestler, O.D. The 2007 WHO classification of tumors of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. 114 (2007): 97-109.

(4) Timothy, J., and O' Leary. Advanced diagnostic method in pathology: principles, practice and protocols. Pensnsylvania: Saunders. (2003): 95-110.

(5) Wang, J., et al. Expression of EphA1 in gastric carcinoma is associated with metastasis and survival. Oncol Rep. 24 (2010): 1577-1584.

(6) Chen, D., et al. Identification of prohibition as a potential biomarker for colorectal carcinoma base on proteomics technology. Int J onco.l 37 (2010): 355-365.

(7) De Bont, J.M., et al. Identification of novel biomarkers in pediatric primitive neuroectodermal tumor and ependymas by proteomewide analysis. J Neuropatho EXP Neurol. 66 (2007): 505-516.

(8) Park, C.K., Jung, J.H., Park, S.H., Jung, H.W., and Cho, B.K. Multifarious proteomics signatures and regional heterogeneity in glioblastomas. J Neurooncol. 94 (2009): 31-39.

(9) Lim, L.H., and Perraiz, S. Annexin 1: The new face of an old molecule. FASEB J. 21 (2007): 968-975.

(10) Allderidge, L.C., and Bryant, C.E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of ERK1 / 2 MAPK signal. Exp Cell Res. 290 (2003): 93-107.

(11) D' Acquisto, F., et al. Annexin -1 modulates T-cell activation and differentiation. Blood. 109 (2007): 1090-1102.

(12) Solito, E., de Coupade, C., Canaider, S., Goulding, N.J., and Perretti, M. Transfection of Annexin 1 in monocytic cell produces a high degree of spontaneous and stimulate apoptosis associated with caspase- 3 activation. Br J Pharmacol. 133 (2001): 217-228.

(13) Liu, Y., Fallow, L., Lashuel, H.A., Lui, Z., and Lansbury, P.T. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzimatic activites that affct α-Synuclein degradation and Pakinson 's disease susceptibility. Cell. 111 (2002): 209 -218.

(14) Rolen, U., Freda, E., Xie, J., Pfirrmann, T., Frisan, T., and Masucci, M.G. The ubiquitin c-terminal hydrolase UCH-L1 regulates B-cell proliferation and intergrin activation. J cell Mol Med. 13 (2009) : 666-1678.

(15) Gavioli, R., Frisan, T., Vertuani, S., Bornkanm, G.W., and Masucci, M.G. c-myc overexpression activation alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. Nat Cell Biol. 3 (2001): 283-288.

(16) Ahn, S.H., Sawada, H., and RO, J.Y. Differential expression of annexin I in human mammary ductal epithelial cells in normal and benign and malignant breast tissue. Clin Exp Metastasis. 2 (1997): 151-156.

(17) Falini, B., et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukemia by immunonistochemical detection of Annexin A1 (ANXA1). Lancet. 369 (2004):1869-1870

(18) Masaki, T., et al. Enhance expression of protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 24 (1996): 72-81.

(19) Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. Increased expression of annexin I and thioredoxin detect by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. J Biochem Biophys Methods. 3 (1998): 105-116.

(20) Bai, X.F., et al. Overexpression of Annexin1 in pancreatic cancer and its clinical significance. World J Gastroenterol. 10 (2004): 1466-1470.

(21) Xia, S.H., et al. Three isoform of Anexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelial but down regulate in esophageal squamous cell carcinomas. Oncogene. 21 (2002): 6641-6648.

(22) Kang, J.S., Calvo, B.F., Maygarden, S.J., Caskey, L.S., Mohler, J.L., and Ornstein, D.K. Dysregulation of annexin 1 protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. Clin cancer Res. 8 (2002): 117-123.

(23) Garcia Pedrero, J.M., et al. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. Am J Pahtol. 164 (2004): 73-79.

(24) Vishwanatha, J.K., Salazer, E., and Gopalakrishnan, V.K. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkins lymphomas and cell lines. BMC cancer. 4 (2004): 8-16.

(25) Solito, E., Mcarther , S., Christian, H., Gavins, F., Buckingham, J.C., and Gillies, G.E. Annexin A1 in the brain – undiscovered roles ? Trends Phamacol Sci. 29 (2008): 135-142.

(26) Johnson, M.D., et al. Lipocortin -1 immunoreactivity in human pituitary gland. J Histochem Cytochem. 38 (1990): 1814-1845.

(27) Probst-Cousin, S., Kowolik, D., Kuchelmeister, K., Kayser, C., Neundorfer, B., and Heuss, D. Expression of Annexin-1 in multiple sclerosis plaques. Neuropathol Appl Neurobiol. 28 (2002): 292-300.

(28) Schittenhelm, J., Trautmann, K., Tabatabai, G., Hermann, C., Meyermann, R., and Beschorner, R. Comparative analysis of annexi-1 in neuroepithelial tumors show altered expression with the grade of malignancy but is not associated with survival. Mod Pathol. 22 (2009): 1600-1611.

(29) Johnson, M.D., Kamso-Pratt, J., and Pepsinsky, R.B. Lipocortin in central and peripheral nervous system glial tumor. Hum Pathol. 20 (1989): 772-776.

(30) Tezel, E., Hibi, k., and Nakasha, T. PGP 9.5 as a prognostic factor in pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 6 (2006): 4764 -4767.

(31) Takase, T., et al. PGP 9.5 Overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. Hepatogastroenterology. 50 (2003): 1278-1280.

(32) Chen, G., et al. Proteomics analysis of lung adenocarcinoma: identification of highly expressed set of protein in tumors. Clin Cancer Res. 8 (2002): 2298-2305.

(33) Okochi –Takada, E., et al. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. Int J cancer. 119 (2006): 1338-1344.

(34) Takumaru, Y., et al. Inverse correlation between cyclin A1 Hypermethylation and P53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. Cancer Res. 64 (2004): 5982-5987.

(35) Yu, J., et al. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumor. Hepatology. 48 (2008): 508-518.

(36) Daylan, N.M., and Thomson, R.J. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. Neurobiology. 90 (2010): 327-362.

(37) Zhang, Y., et al. Subcellular localization of APMCF I and its biological significance of expression pattern in normal and malignant human tissue. J Exp Clin Cancer Res. 21 (2009): 111-116.

(38) DeLellis, R.A., and Dayal, Y. The role of immunohistochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasm. Semin Oncol. 2 (1987) 173-192.

(39) Alldrige, L.C., Harris, H.J., Plevin, R., Hannon, R., and Bryant, C.E. The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. J Biol Chem. 274 (1999): 37620-37628.

(40) De, B.K., Misono, K.S., Lukas, T.J., Mroczkowski, B., and Cohen, S. A calcium-dependent 35- klodalton substrate foe epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. J Biol Chem. 261 (1986): 13784-13792.

(41) Solito, E., Kamal, A., Russo-Marie, F., Buckingham, J.C., Marullo, S., and Perretti, M. A novel calcium- dependent proapoptotic effect of annexin a1 in human neotrophils. FASEB J. 17 (2003): 1544-1546.

(42) Mani, A., and Gelmann, E.P. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. J Clin Oncol. 23 (2005): 4776-4789.

(43) Nakopoulou, L., Kerezoudi, E., Thomaides, T., and Litsios, B. An immunohisto-chemical comparison of glial fibrillary acidic protein, s-100p and vimentin in human glial tumors. J neurooncal. 8 (1990): 33-40.

(44) Miller, D.C., Koslow, M., Budzilovich, G.N., and Burstein, D.E. Synaptophysin: a sensitive and specific marker for ganglion cell in central nervous system neoplasm. Hum Pathol. 21 (1990): 271-276.

(45) Kumar, G.L., and Rudbeck, L. Immunohistochemical staining methods education guide 5th ed. California :Dako North America Inc. (2009): 57-60.

(46) Hsu, S.M., and Raine, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem. 29 (1981): 1349-1353.

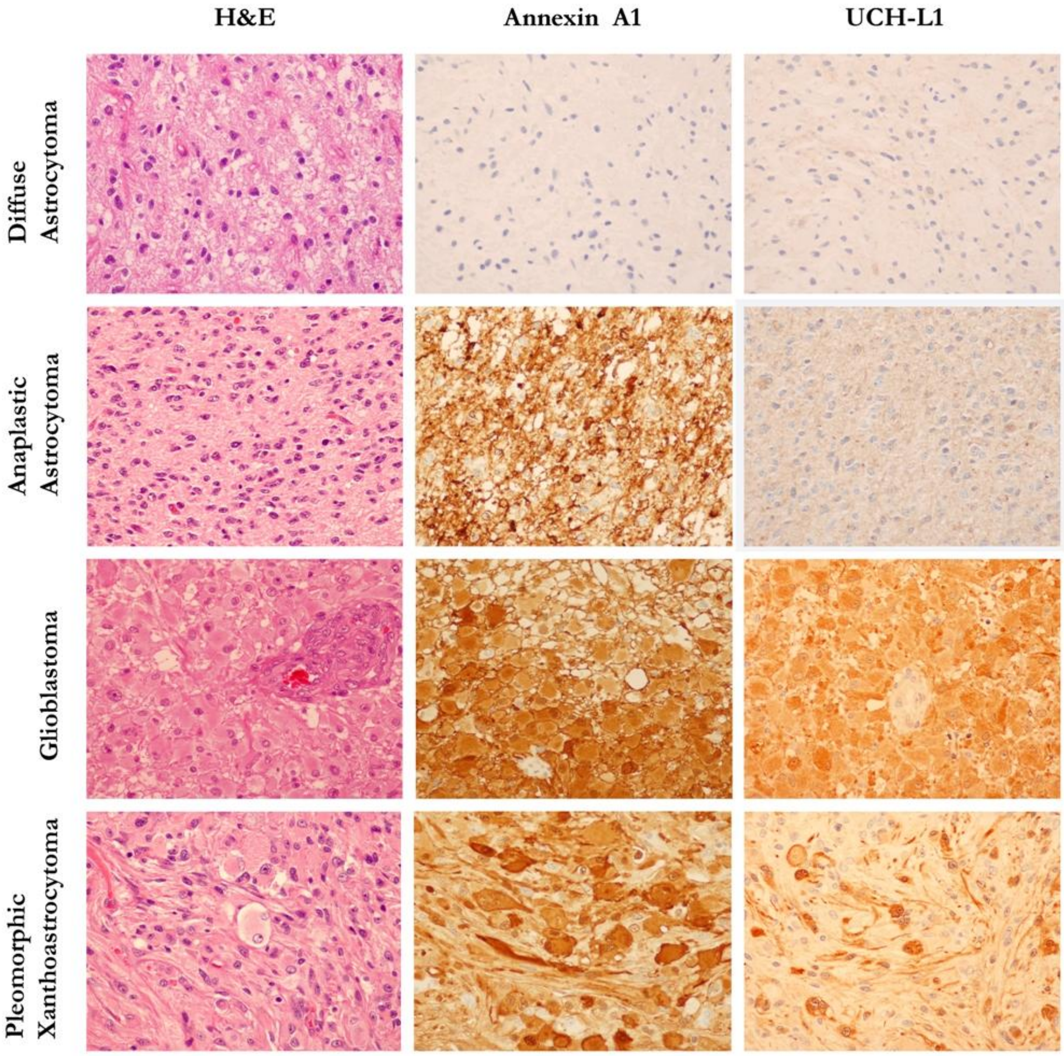
(47) Ohgaki, H., and Kleihues, P. Genetic pathway to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol. 170 (2007): 1445-1453.

(48) Caincross, J.G., et al. Specific predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oigdendroglioma. JNCI Natl Cancer Inst. 90 (1998): 1473-1479.

ภาคผนวก

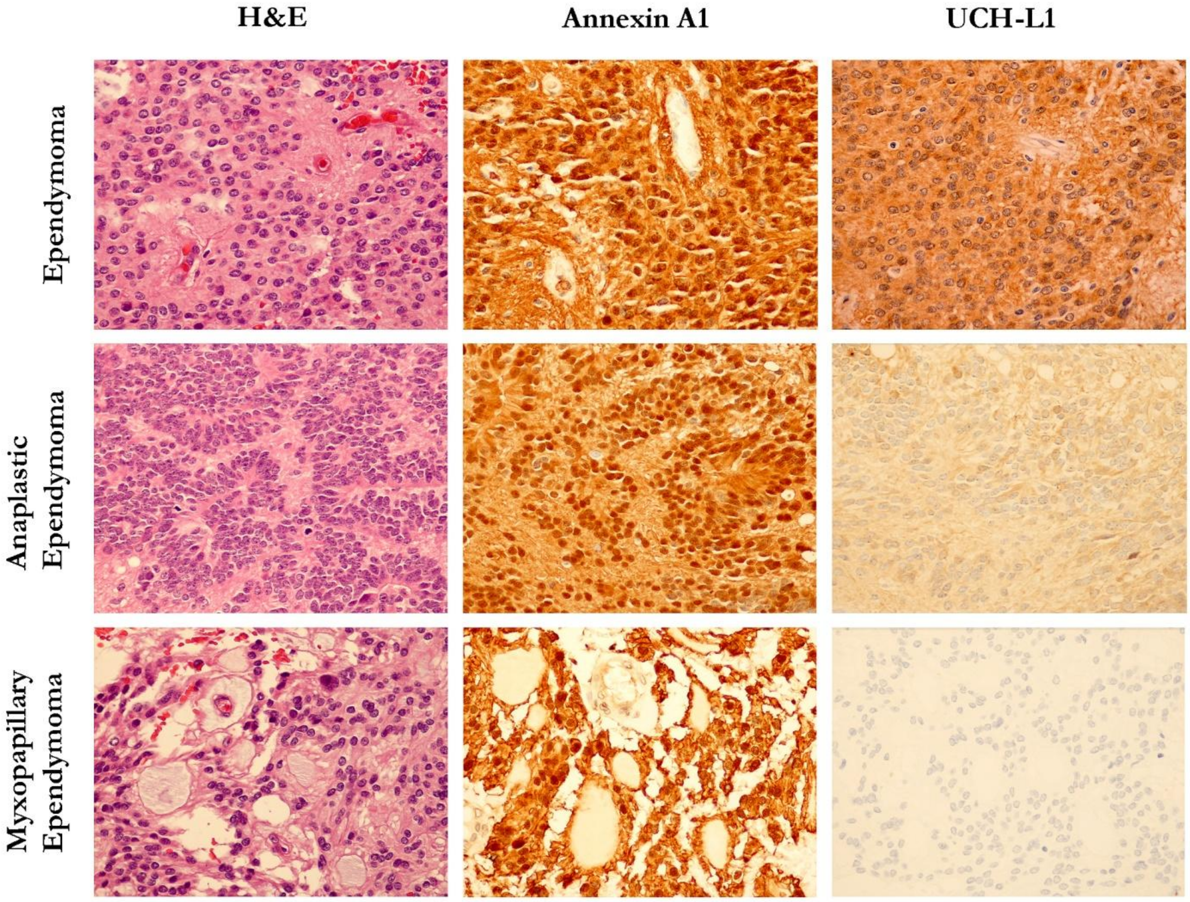
รูปตัวอย่างลักษณะจุลพยาธิจากการย้อม H&E, การแสดงออกของโปรตีน Annexin A1 และการแสดงออกของโปรตีน UCH-L1 ใน neuroepithelial tumor ชนิดต่างๆ

1. <u>Astrocytic tumors</u>



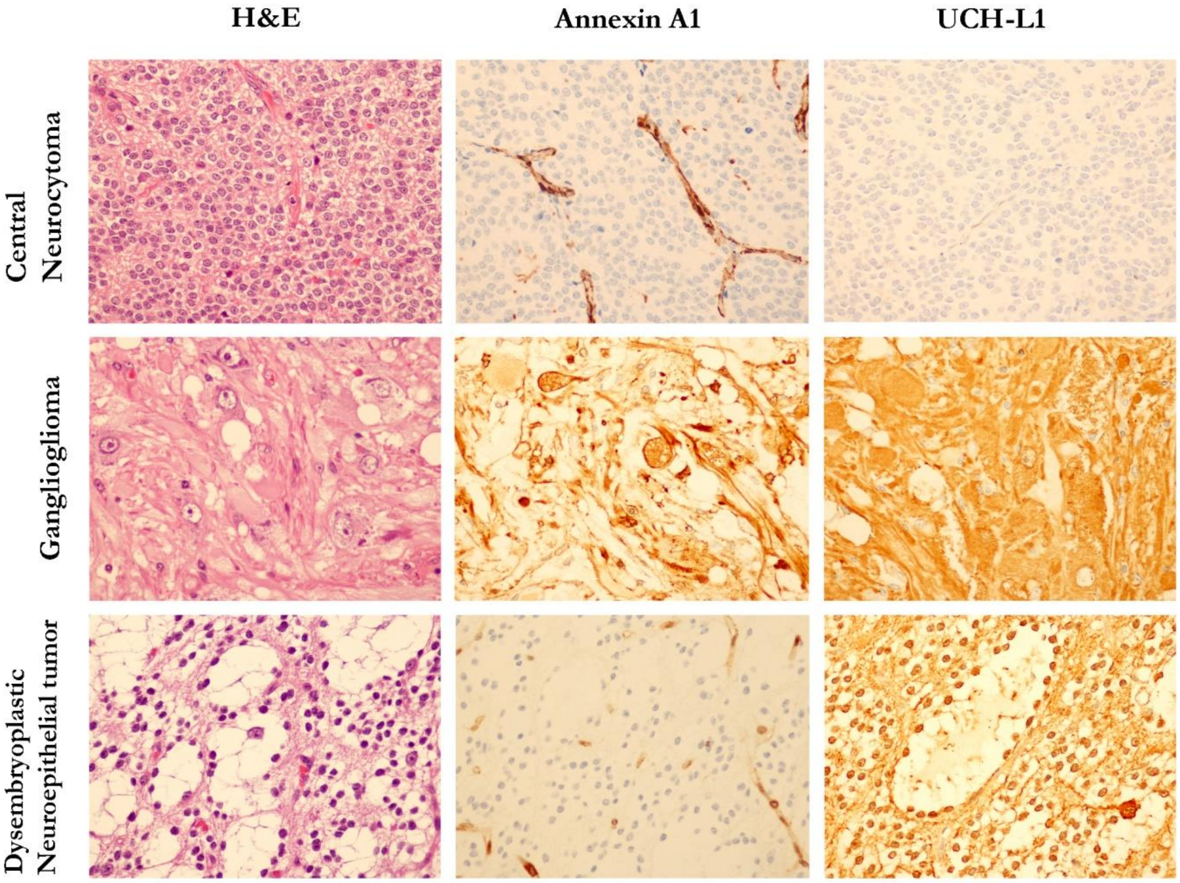
รูปแสดงตัวอย่างการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกกลุ่ม astrocytic tumors (กำลังขยาย 400X) จากรูปจะเห็นว่า ในเนื้องอกชนิด PXA และ glioblastoma พบการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1, ใน anaplastic astrocytoma พบการแสดงออกของ Annexin A1 แต่ไม่พบการแสดงออกของ UCH-L1 และ ใน low-grade diffuse astrocytoma ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิด

2. Ependymal tumors



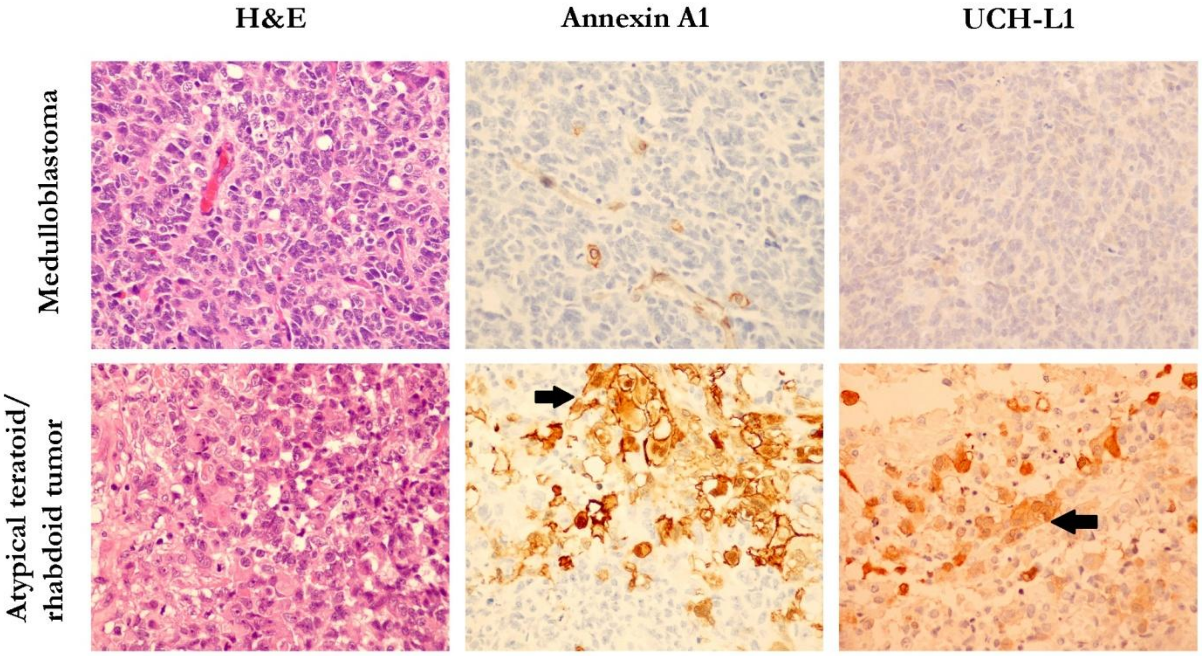
รูปแสดงตัวอย่างการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกกลุ่ม ependymal tumors (กำลังขยาย 400X) จากรูปจะเห็นว่า ในเนื้องอกชนิด ependymoma พบการแสดงออกของทั้ง Annexin A1 และ UCH-L1 ส่วนใน anaplastic ependymoma และ myxopapillary ependymoma นั้นพบการแสดงออกของ Annexin A1 แต่ไม่พบการแสดงออกของ UCH-L1

3. Neuronal/mixed neuronal - glial tumors



รูปแสดงตัวอย่างการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกกลุ่ม neuronal/mixed neuornal-glial tumors (กำลังขยาย 400X) จากรูปจะเห็นว่า ในเนื้องอกชนิด ganglioglioma พบการแสดงออกของทั้ง Annexin A1 และ UCH-L1, ใน DNET พบการแสดงออกของ UCH-L1 แต่ไม่พบการแสดงออกของ Annexin A1 และใน central neurocytoma ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิด

<u>4. Embryonal tumors</u>



รูปแสดงตัวอย่างการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในเนื้องอกกลุ่ม embryonal tumors (กำลังขยาย 400X) จากรูปจะเห็นว่า ในเนื้องอกชนิด meulloblastoma ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิด ส่วนใน atypical teratoid/rhabdoid tumor จะพบการแสดงออกของ Annexin A1 และ UCH-L1 ในกลุ่มของ rhabdoid cells (ลูกศรชี้) ส่วนในบริเวณของเซลล์ชนิดอื่นๆไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิด

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกกาญจน์ ทาแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2527 มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดสกลนคร ประเทศไทย เป็นบุตรคนที่สองของนายวัชรินทร์ และนางสุดสวาท ทาแก้ว

<u>ประวัติการศึกษา</u>

- ปีพ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล

- ปีพ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

- ปีพ.ศ. 2551 สำเร็จการฝึกอบรมหลักสูตร "Basic Ultrasound Principle and Techniques" ซึ่งจัดขึ้นโดยโรงพยาบาลพญาไทร่วมกับบริษัทฟิลิปส์ประเทศไทย และ Advanced Imaging Management Corporation (AIMC)

- ปีพ.ศ. 2552 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต แขนงพยาธิวิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย