



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในมะเร็งเซลล์
ในสุนัขทางเซลล์พยาธิวิทยาวิจัย

โดย

อัจฉริยา ไสละสูต
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์
ภัทรกฤษ ธีระสูตรระกุล

กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2552 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ Prof. Dr. Vilma Yuzbasiyan-Gurkan, และอาจารย์ สัตวแพทย์หญิงทัศนาว ไทยวงษ์ Department of Small Animal Clinical Sciences, Michigan State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับตัวอย่างชิ้นกလာยพันซ์ของ *c-kit* ตัวควบคุมบวก (Positive control) และตัวควบคุมปกติ (Normal control) ของมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข สำหรับการทดลอง Polymerase Chain Reaction รวมทั้ง ขอขอบคุณเจ้าของสัตว์ป่วยทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างและติดตามผล นายสัตวแพทย์และคณะทำงานเจ้าหน้าที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก นักวิทยาศาสตร์ของหน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเซลล์และเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

ชื่อโครงการวิจัย	การแสดงออกของอองโคยีน <i>c-kit</i> ในมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขทางเซลล์พยาธิวิทยา
ชื่อผู้วิจัย	รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต รศ.น.สพ.ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ น.สพ.ภัทรกฤษ ธีวสุตระกุล
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ	ธันวาคม พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

เนื้องอกหรือมะเร็งที่ผิวหนังชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขเป็นเนื้องอกที่พบได้เป็นอันดับสองในสุนัข เนื้องอกชนิดนี้มีอุบัติการณ์อยู่ระหว่าง 7-21% สุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้จะมีอายุโดยเฉลี่ยที่ 8 ปี การเกิดเนื้องอกชนิดนี้ไม่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และเพศของสุนัข และเนื้องอกชนิดนี้ต้องการการวินิจฉัย จำแนกเกรด รวมทั้งการพยากรณ์โรคที่รวดเร็ว ในปัจจุบันวิธีที่เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยจำแนกเกรดและพยากรณ์เนื้องอกชนิดนี้จะใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาโดย Patnaik และคณะ (1984) การเจาะดูดเซลล์เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพยาธิสัตวแพทย์ในการตรวจกรองก้อนเนื้องอกและมะเร็งซึ่งสะดวกและรวดเร็ว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ ในการใช้ตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่เก็บได้จากการเจาะดูด นำมาช่วยในการวินิจฉัยจากรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ด้วยวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี และการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* รวมทั้งตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon II ของ *c-kit* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีการเจาะดูด จากสุนัขป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 30 ตัว พบว่าสุนัขมีอายุเฉลี่ย 9.6 ปี (>5 - 18 ปี) เป็นเพศเมียร้อยละ 40 (12/30) และ เพศผู้ร้อยละ 60 (18/30) พันธุ์สุนัขที่พบคือ พันธุ์ผสม ร้อยละ 53.34 (16/30) และพันธุ์แท้ร้อยละ 46.66 (14/30) การติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี พบว่าการติดสีรูปแบบที่ II ร้อยละ 46.66 (14/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 33.33 (10/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมีมีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641$, $P < 0.05$) และได้เปรียบเทียบรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี จากตัวอย่างเซลล์ที่เก็บโดยวิธีเจาะดูด พบว่า รูปแบบที่ II ร้อยละ 40 (12/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 36.66 (11/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 23.33 (7/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของ

เซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโน โหไซโตเคมี มีความสัมพันธ์กับเกรดจากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615, P < 0.05$) ดังนั้นรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ของเซลล์มะเร็ง และ เนื้อเยื่อจากมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโน โหไซโตเคมี และอิมมูโนฮิสโตเคมี ตามลำดับมีความสัมพันธ์กับวิธีการจำแนกเกรดมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยาสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้ และพบว่าการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีพีซีอาร์ จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) โดยพบการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ปกติที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (9 ตัวอย่าง) เกรด II (6 ตัวอย่าง) และ เกรด III (5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ และพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ร้อยละ 28.57 (8/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์ เกรด II (5 ตัวอย่าง) และเกรด III (3 ตัวอย่าง) ดังนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด สามารถใช้ศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* พบในมะเร็งมาสต์เซลล์ทั้งเกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I และพบว่าอาการทางคลินิกและการประเมินสุขภาพทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือด ไม่พบความสัมพันธ์กับเกรดของเนื้องอกและการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* สรุปผลการประยุกต์ใช้เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูดจากมะเร็งมาสต์เซลล์ โดยใช้รูปแบบการติดสี KIT หรือ CD 117 ทางอิมมูโน โหไซโตเคมี สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการวินิจฉัยจำแนกเกรด และตรวจการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขเพื่อช่วยกำหนดแผนการรักษาในระดับข้างตัวสัตว์ต่อไป

คำสำคัญ: มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด อิมมูโน โหไซโตเคมี พีซีอาร์

Project Title	The Expression of <i>c-kit</i> oncogene on Mast cell tumor in dogs by Cytopathology Diagnosis
Name of the Investigators	Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuta Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipipat Dr. Patharakrit Teewasutrakul
Year	December 2010

Abstract

Canine mast cell tumor (MCT) is the second most cutaneous tumor found in dogs. The incidence is varied from 7-21% and average age of dogs is approximately 8 years. There are no breed or even gender predilections. In general, the dogs with MCT are required a rapid assessment for grading, diagnosis and prognosis. Recently, the gold standard protocol used for MCT grading, diagnosis and prognosis has been based on Patnaik grading system (1984). To date, fine-needle aspiration is enable for pathologist and clinician in routinely screening for MCT diagnosis. Therefore, the objectives of this study are to establish the standard protocols of the immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns and expression of *c-kit* using fine needle aspiration mast cell tumors (FNA-MCT cells) from 30 MCT dogs at the Oncology Clinic, Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The dogs were 9.6 years of age (>5-18 years). There were male at 60% (18/30) and female at 40% (12/30). The breeds were mixed breed at 53.34% (16/30) and pure breed at 46.66% (14/30). By comparing the histopathology grading and immunohistochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (IHC-MCT), the results revealed that IHC-MCT were mostly in pattern II at 46.66 % (14/30), pattern III at 33.33% (10/30) and pattern I at 20% (6/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.641$, $P < 0.05$). In case of immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (ICC-MCT) in comparison to histopathology grading demonstrated that ICC-MCT were

also mostly in pattern II at 40 % (12/30), pattern III at 36.60% (11/30) and pattern I at 23.33% (7/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.615$, $P < 0.05$). It is suggested that both KIT staining patterns of ICC-MCT and IHC-MCT could be used as the practical tool for MCT grading in comparison to standard histopathology method. The establishment using FNA-MCT cells for *c-kit* expression by PCR was successfully performed which were demonstrated as 93.33 % (28/30). There were normal *c-kit* at 71.42% (20/28), which were 9 samples in grade I, 6 samples in grade II and 5 samples in grade III respectively. While, the mutation in Exon 11 of *c-kit* was at 28.57 % (8/28), which were 5 samples in grade II and 3 samples in grade III. The mutation of *c-kit* in MCT grade I could not be detected. Regards to the clinical signs, hematological and blood chemistry analysis, there was no significant correlated to the grade and mutation of Exon 11 of *c-kit*. In conclusion, it is speculated that the methods used in this study based on FNA-MCT cells could be used as a bed-side tool for MCT grading, diagnosis, prognosis, and therapeutic planning.

Keywords: Canine mast cell tumor, *c-kit* expression, Fine needle aspiration sample, KIT, (CD117) immunocytochemistry, PCR

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	iv
สารบัญ.....	vi
สารบัญตาราง.....	viii
สารบัญภาพ.....	ix

บทที่

1. คำนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. การสำรวจแนวคิด และการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เนื้อออกและมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข.....	3
2.2 เทคนิคการเจาะคูคเซลล์.....	4
2.3 วิธีอิมมูน โนไซโตเคมี.....	5
2.4 อองโคยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์.....	5
3. วิธีการวิจัย.....	12
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	13

3.2	วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) IHC-MCT.....	15
3.3	วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ICC-MCT.....	16
	ตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	
3.4	วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> จาก FNA-MCT cells ด้วยเทคนิค PCR.....	16
4.	ผลการวิจัย และการวิเคราะห์ข้อมูล.....	18
4.1	รูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัขทางภูมิคุ้มกัน โนฮีสโตเคมี และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา.....	18
4.2	ผลของรูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ICC-MCT และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา.....	20
4.3	การแสดงออกของยีน <i>c-kit</i> และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> จากเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ด้วยวิธี PCR.....	22
4.4	ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก โลหิตวิทยา และเคมีเลือด ของสุนัขที่ได้ศึกษากับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์.....	24
4.5	การวิเคราะห์ข้อมูล.....	25
5.	การอภิปราย ข้อเสนอแนะ และข้อเสนอนแนะ.....	26
5.1	การอภิปรายผล.....	26

5.2	ข้อสรุป.....	28
5.3	ข้อเสนอแนะ.....	28
	เอกสารอ้างอิง.....	30
	ภาคผนวก.....	33

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การแบ่งระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอกและมะเร็ง (Owen, 1980).....	13
2. ผลการจำแนกเกรดมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข ทางจุลพยาธิวิทยา.....	23
รูปแบบการติดยีนทางภูมิคุ้มกัน โนฮีส โทเคมี และจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) รูปแบบการติดยีนทางภูมิคุ้มกัน โนไซ โทเคมี และ การแสดงออกของยีน โคยีน <i>c-kit</i> (n=30)	

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของ KIT receptor (ที่มา Zemke et al., 2001).....	7
2. แสดงแถบของ PCR product จากตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข.....	10
ที่พบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ <i>c-kit</i> (M) และ แถบ PCR product	
จากตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ปกติไม่พบการกลายพันธุ์ (normal MCT, N)	
(ที่มา Webster et al., 2007)	
3. ภาพสุนัขป่วยด้วยมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนัง.....	12
4. แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์.....	14
5. แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็ง โดยการเจาะดูด (FNA-MCT cells).....	14
6. วิธีการพ่นเซลล์ป้ายละเลงบนสไลด์เพื่อตรึงสภาพและย้อมสีต่อไป.....	14
7. ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์พบว่าเซลล์มะเร็งรูปร่างกลมมี granules.....	14
Giemsa's stain	
8. ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์ พบว่า เซลล์มะเร็งรูปร่างกลมติดสี.....	14
Metachromatic granules Toluidine blue	
9. ภาพจำแนกเกรดก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข.....	19
ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา H&E และรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) IHC-MCT	
10. ภาพรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) IHC-MCTและ ICC-MCT.....	21
จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	
11. แสดงแถบของผลผลิต PCR จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์.....	22
ที่ผิวหนังในสุนัขที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)	

บทที่ 1

คำนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

อุบัติการณ์ของเนื้องอกหรือมะเร็งมาสต์เซลล์ (Canine mast cell tumor; MCT) พบได้สูงในเนื้องอกผิวหนังของสุนัข เนื้องอกชนิดนี้มีความหลากหลายของพฤติกรรมทางชีวภาพและกลไกการเกิดเนื้องอกยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ระดับความรุนแรงของเนื้องอกชนิดนี้มีความสำคัญในการพยากรณ์โรคและวางแผนการรักษาด้วย ปัจจุบันวิธีที่เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยและจำแนกเกรดในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดนี้จะใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (Patnaik et al., 1984) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะเมื่อเซลล์มะเร็งอยู่ในลักษณะก้ำกึ่งระหว่างเกรด รวมทั้งการแบ่งเกรดทางจุลพยาธิวิทยานั้นมีความจำเป็นที่ต้องใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บจากก้อนเนื้องอก ซึ่งบางรายอาจเกิดอันตรายและผลข้างเคียงต่อตัวสัตว์ได้ ตัวอย่างชิ้นเนื้อสำหรับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยานั้น เป็นขบวนการที่ต้องอาศัยเวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการวินิจฉัย และประเมินผลจำเป็นต้องอาศัยพยาธิสัตวแพทย์ที่ชำนาญการด้วย ได้มีการใช้รูปแบบการติดสีทางอิมมูโน โนฮิสโตเคมีของ KIT หรือ CD117 มาใช้ร่วมกับวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในการวินิจฉัยจำแนกเกรดเนื้องอกชนิดนี้ด้วย ซึ่งรูปแบบการติดสีของ KIT พบว่าความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเนื้องอกแต่ละเกรดและนำมาช่วยในการจำแนกเกรดได้ อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังคงต้องใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกในการวินิจฉัยจำแนกเกรด จึงควรพัฒนาการวินิจฉัยข้างตัวสัตว์ที่สะดวกและรวดเร็ว เช่นการตรวจทางเซลล์วิทยานำมาประยุกต์โดยใช้วิธีการทางอิมมูโน โนไซโตเคมีของ KIT จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่เจาะดูดเปรียบเทียบกับวิธีอิมมูโน โนฮิสโตเคมี นอกจากนี้การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ซึ่งในปัจจุบันมีหลักฐานที่ค่อนข้างเด่นชัดชี้ให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* นั้นมีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของเนื้องอกชนิดนี้ด้วย จึงควรพัฒนาการศึกษาการวินิจฉัยข้างตัวสัตว์ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำจากตัวอย่างทางเซลล์วิทยา เช่นรูปแบบการติดสีทางอิมมูโน โนไซโตเคมีจากเซลล์มะเร็งที่เจาะดูด และศึกษากับการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* จากเซลล์มะเร็ง รวมทั้งการกลายพันธุ์ของอองโคยีนดังกล่าวโดยวิธี PCR เพื่อให้ทราบพฤติกรรมทางชีวภาพของเซลล์มะเร็งในการเป็นข้อมูลนำไปสู่การรักษาและการดูแลสัตว์ป่วยอย่างเหมาะสมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการติดสีของ KIT จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด เซลล์จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี และอิมมูโนฮิสโตเคมีในมะเร็งเม็ดเลือดในสุนัขเกรดต่างๆ
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ของส่วน Exon11 ของยีนดังกล่าวในตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดจากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการศึกษาคาดว่าจะได้รับสามารถนำรูปแบบการติดสีของ KIT จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดจากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ในลักษณะเป็นเครื่องมือข้างเตียง (Bed-side tool) ในการประยุกต์ใช้ในการจำแนกเกรด พยากรณ์โรค และวางแผนการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดในสุนัขทางคลินิกได้

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข (Canine Cutaneous Mast Cell Tumor; MCT)

เป็นเนื้องอกที่สามารถพบได้ประมาณ 7-21% ของเนื้องอกผิวหนัง (Zemke et al., 2002) นอกจากบริเวณผิวหนังแล้วยังพบเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่อวัยวะภายในของร่างกายได้อีกด้วย ได้แก่ ลำไส้ ตับ ม้าม เป็นต้น จากอุบัติการณ์สัตว์ป่วยด้วยเนื้องอกมาสต์เซลล์จากโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ พบว่าสุนัขอายุมากกว่า 8 ปีขึ้นไป มีความเสี่ยงสูงในการเกิดเนื้องอกชนิดนี้ โดยไม่ขึ้นอยู่กับเพศของสุนัข พันธุ์ของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้ได้บ่อยได้แก่ สุนัขพันธุ์ผสม รองลงมาได้แก่สุนัขพันธุ์ Boxer, Bull dog, Pug, Labrador retriever และ Golden retriever ตามลำดับ (Loplamert et al., 2010) ลักษณะทางภายนอกของเนื้องอกชนิดนี้นั้นจะมีลักษณะเป็นก้อนของเนื้องอกเดี่ยวๆ สีชมพูมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเนื้องอกของผิวหนังของสุนัขชนิดอื่นๆ อาจพบแผลหลุมเกิดขึ้นบนผิวหนังบริเวณที่เป็นเนื้องอกได้ ซึ่งเป็นลักษณะที่เป็นอันตรายสำหรับสุนัขป่วยเพราะแสดงให้เห็นว่าเนื้องอกนั้นมีความรุนแรงสูง อย่างไรก็ตามในสุนัขบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ Golden retriever สามารถพบเนื้องอกชนิดนี้เป็นลักษณะเกิดขึ้นมาหลายๆ ก้อนได้ และมีความรุนแรงกว่าเนื้องอกที่เกิดเพียงก้อนเดียว นอกจากนี้บริเวณที่เนื้องอกเกิดขึ้นมานั้นมีความสำคัญ โดยเฉพาะเนื้องอกชนิดนี้นั้นถ้าเกิดบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหนังกับเยื่อเมือก หรือบริเวณขาหนีบของสุนัข พบว่าเนื้องอกจะมีพฤติกรรมทางชีวภาพที่รุนแรงสูงและเป็นอันตรายต่อชีวิตของสุนัขสูงมาก สำหรับการแพร่กระจายของจะไม่ค่อยพบ โดยปกติอุบัติการณ์ในการแพร่กระจายอยู่ที่ประมาณ 3% ของสุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้ (Dobson and Scase, 2007)

เนื่องจากเนื้องอกชนิดนี้มีความหลากหลายของพฤติกรรมทางชีวภาพ (biological behavior) นอกจากนี้ระดับความรุนแรงของก้อนเนื้องอกมีตั้งแต่ระดับเป็นก้อนเนื้องอกที่ไม่มีความรุนแรงซึ่งเมื่อผ่าตัดเลาะออกไปจะไม่พบการกลับมางอกขยายใหม่ได้ไปจนถึงระดับเป็นก้อนมะเร็งที่ลุกลามและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังแทรกในเนื้อเยื่อโดยรอบเป็นบริเวณกว้าง การก่อความรุนแรงของเนื้องอกมาสต์เซลล์ในสุนัขมีความรุนแรงมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Zemke et al., 2002) สามารถพิจารณาระดับความรุนแรงของ mast cell tumor ได้จากทางจุลพยาธิวิทยาโดยแบ่งระดับความรุนแรงออกเป็น 3 เกรด (Grade) คือ โดย เกรด I อยู่ในระดับไม่รุนแรง (benign) เกรด II อยู่ในระดับก้ำกึ่ง ส่วน เกรด III อยู่ในระดับรุนแรง (malignancy) (Patnaik et al., 1984) นอกจากนี้การรักษาและการพยากรณ์โรคลังต้องพิจารณาถึงตำแหน่งของเนื้องอก ระยะเวลาในเจริญเติบโต อาการทางคลินิก concurrent treatment และ proliferate activity โดยใน

ส่วนของ Proliferative activity ต้องอาศัยเทคนิคการย้อมสีพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เช่น Ki67 และ Argyrophilic nucleolar organizing regions [AgNOR] เป็นต้น การใช้เซลล์วิทยาเป็นที่นิยมในการวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (อัจฉริยา ไสละสูต และ คณะ พ.ศ. 2549)

ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งมาสต์เซลล์ ให้มีความแม่นยำสูงขึ้นเพื่อใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกชนิดนี้ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ทำให้การตรวจวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ถูกต้องและสมบูรณ์ขึ้นมาก ได้แก่การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกโดยใช้การย้อมสีโปรตีนที่เป็นผลผลิตของ *c-kit* คือโปรตีน KIT (CD117) โดยการใช้แอนติบอดีสำหรับ KIT เข้าจับกับตัวโปรตีนแล้วทำการย้อมสีแอนติบอดีซึ่งวิธีดังกล่าวเรียกว่า CD117 Immunohistochemistry (CD117-IHC) จากการศึกษาพบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลรูปแบบการติดสี KIT (KIT staining pattern) ที่แตกต่างกัน 3 แบบ โดยแต่ละแบบมีความสอดคล้องกับการแบ่งเกรดของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางจุลพยาธิวิทยา ดังนี้ การติดสีแบบที่ I จะพบการติดสีของ KIT ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เนื้องอก (Perimembrane pattern) ซึ่งจะสอดคล้องกับเนื้องอกเกรด I รูปแบบการติดสีแบบที่ II พบในเนื้องอกเกรดที่ II นั้นจะมีรูปแบบการติดสีของ KIT เป็นกลุ่มก้อนใกล้นิวเคลียสของเซลล์เนื้องอก (Paranuclear pattern) และการติดสีรูปแบบที่ III จะพบการติดสีของ KIT ในลักษณะกระจายทั่วไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอก (Diffuse pattern) ซึ่งสอดคล้องกับเนื้องอกเกรด III (Gil da Costa et al., 2007, Kiupel et al., 2004) ดังนั้นการใช้ KIT หรือ CD117-IHC ร่วมกับการวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางจุลพยาธิวิทยานั้นสามารถทำให้การวินิจฉัยเนื้องอกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยานั้นยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะถ้าเซลล์ของเนื้องอกอยู่ในระยะก้ำกึ่งระหว่างเกรด (Transitional phase) ซึ่งพบบ่อยในเกรด II และ III ซึ่งเซลล์เนื้องอกอาจจะมีลักษณะของเซลล์ที่อยู่ในเกรด II แต่มีพฤติกรรมแบบเกรด III อย่างไรก็ตามการทำ CD117-IHC นั้นยังต้องอาศัยตัวอย่างที่เก็บมาจากเนื้อเยื่อ ซึ่งมีข้อจำกัดเช่นเดียวกันกับที่เกิดขึ้นในการเก็บตัวอย่างสำหรับทางจุลพยาธิวิทยา

ดังนั้นการตรวจกรองเพื่อการวินิจฉัย และพยากรณ์ที่รวดเร็ว แม่นยำ จะนำไปสู่วิธีการป้องกันและรักษาที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันการพยากรณ์โรคต้องอาศัยอาการทางคลินิก ตำแหน่งและขนาดของก้อนเนื้องอก การแพร่กระจาย จำนวนเกรดของเนื้องอกทางจุลพยาธิวิทยา และดัชนีการงอกขยายของเนื้องอกเหล่านี้ทำให้การพยากรณ์โรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Simose et al., 1994)

2.2 เทคนิคการเจาะดูดเซลล์ (Fine Needle Aspiration Technique)

การตรวจวินิจฉัยเนื้อเยื่อชนิดนี้ในทางคลินิกสัตว์แพทย์นิยมใช้วิธี การเจาะดูดเซลล์ (Fine Needle Aspiration หรือ FNA) ซึ่งสามารถใช้สำหรับให้การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นก่อนที่จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อส่งไปตรวจทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป (อัจฉริยา ไสยะสูต และ คณะ พ.ศ. 2549) ดังนั้นการทำหัตถการในการเจาะดูดเซลล์จากก้อนเนื้อเยื่อนั้น จึงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้อเยื่อที่ได้จากการเจาะดูด (Fine Needle Aspirated tumor cell) นั้นยังมีข้อจำกัดในการให้ข้อมูลแก่สัตวแพทย์ในการแบ่งเกรดรวมทั้งการพยากรณ์โรค ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไม่ชัดเจน หรือเซลล์เนื้อเยื่อมีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์เนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์เนื้อเยื่อรูปวงกลมในสุนัข (Canine Round Cell Tumor) เนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ชนิดที่ถ่ายทอดสู่สุนัขอื่นได้ (Transmissible Venereal Tumor, TVT) หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ฮิสทีโอไซต์ (Histiocyte) เป็นต้น (Prihirunkij et al., 2007) ทำให้การวินิจฉัยอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้

2.3 วิธีอิมมูโนไซโตเคมี (Immunocytochemistry)

เป็นวิธีการในการตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา ซึ่งโดยปกติแล้วการจำแนกชนิดทางเซลล์วิทยา อาศัยจากลักษณะของเซลล์ นิวเคลียส ไซโตพลาสซึม จากการทำ Fine Needle Aspiration (FNA) ที่สามารถเจาะดูดเซลล์จากอวัยวะต่างๆ และก้อนเนื้อเยื่อได้ (อัจฉริยา ไสยะสูต และ คณะ พ.ศ. 2549) โดยวินิจฉัยจากรอยโรคต่างๆ เพื่อการวางแผนการรักษาให้เหมาะสมที่สุด ในกรณีที่ลักษณะของเซลล์มีลักษณะที่เด่นชัด (typical appearance) ปัญหาในการวินิจฉัยจะมีน้อย แต่ในกรณีที่ลักษณะของเซลล์ไม่เด่นชัด (Atypical) การตรวจด้วยวิธี Immunocytochemistry จะช่วยในการวินิจฉัยทำได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น แอนติบอดีใช้ในการตรวจวินิจฉัยจะช่วยจำแนกชนิดของเซลล์ได้ เช่น จำแนก เซลล์เยื่อ (epithelium), เซลล์สร้างเม็ดน้ำเหลือง (lymphoid cell), ฮิสทีโอไซต์ (histiocytes), พลาสมาเซลล์ (plasma cell), เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue), เนื้อเยื่อเซลล์ประสาท (nervous tissue) ฯลฯ เป็นวิธีการที่สะดวกในทางปฏิบัติ โดยการเตรียมสไลด์และตรึงสภาพแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานเป็นสัปดาห์ โดยที่ คุณสมบัติทางอิมมูโน (immunoreactivity) ไม่เสื่อมสลาย อ่านผลจากการย้อมได้ทันที สะดวก รวดเร็วและแม่นยำ

2.4 อองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์

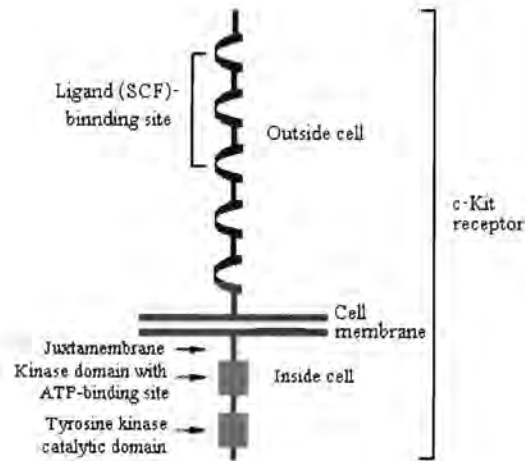
โปรโตอองโคยีน *c-kit* (Protooncogene *c-kit*) เมื่อมีการถอดรหัสจะได้โปรตีนยีนหรือโปรตีนรับจำเพาะที่มีชื่อว่าโปรตีนรับจำเพาะ *c-kit* (*c-kit* receptor) ซึ่งจะอยู่บนผนังเซลล์ หน้าที่โดยทั่วไปของยีนดังกล่าวคือควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ของเซลล์ แต่ในกรณีเนื้องอกมาสดักพบความผิดปกติ เช่นการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *c-kit* ทำให้กลไกการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่สามารถควบคุมได้ จึงมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆจนเกิดเป็นลักษณะของเนื้องอก การกลายพันธุ์ดังกล่าวที่พบมีหลายลักษณะ เช่น point mutation, internal tandem duplication และ deletion (London et al., 1999; Zemke et al., 2001; Downing et al., 2002; Reguera et al., 2002)

การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ทุกชนิด ต้องอาศัยการทำงานระหว่าง Growth factor และ Growth factor receptor (GFR) โดยพบว่า GFR ส่วนใหญ่จัดเป็น Receptor Tyrosine Kinase (RTK) เมื่อ growth factor จับกับ GFR ทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวน หรือ เปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยขึ้นอยู่กับหน้าที่ของเซลล์ชนิดนั้นๆ

c-kit proto-oncogene เมื่อถอดรหัสเป็นโปรตีนจะได้โปรตีนยีนที่เป็นตัวรับเฉพาะที่มีชื่อว่า KIT receptor (*c-kit* receptor หรือ CD117) ซึ่งมีน้ำหนักมวลโมเลกุล 145 kDa พบ *c-kit* proto-oncogene ครั้งแรกใน oncogenic compound ของไวรัส replication-deficient Hardy-Zuckerman 4-feline ที่อยู่ในระยะ acute transforming ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าไวรัสชนิดนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิด multicentric fibrosarcoma ในแมวบ้าน KIT receptor จัดเป็น type III transmembrane tyrosine kinase receptor โดย KIT จะจับกับ ligand ที่เรียกว่า stem cell factor (SCF) การทำงานของ receptor เนื้อเยื่อที่สามารถพบ KIT receptor ได้แก่ breast epithelium, germ cells, melanocytes, immature myeloid cells และ mast cell (Arber et al., 1998)

โครงสร้างของ KIT receptor จะคล้ายกับ tyrosine kinase receptor (RTK) ทั่วไปคือ ประกอบไปด้วย 3 ส่วน (ภาพที่ 1) โดยส่วนแรกเป็น extracellular domain จะประกอบไปด้วย immunoglobulin-like จำนวน 5 fold และมีส่วนของ Ligand binding site เพื่อใช้จับกับ stem cell growth factor (หรือ steel factor) ส่วนถัดมาคือ transmembrane (อยู่ภายใน cell membrane) ในส่วนนี้จะเป็นตัวคั่นกลางระหว่าง intracellular domain กับ extracellular domain ส่วนของ intracellular domain จะประกอบไปด้วย 2 domain ย่อย คือ juxtamembrane domain และ intracellular kinase domain ซึ่งในส่วน intracellular kinase domain จะมี tyrosine kinase อยู่ ซึ่งพร้อมจะทำหน้าที่ได้ทันทีที่มีการจับกันระหว่าง stem cell factor กับ KIT receptor



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ KIT receptor (ที่มา Zemke et al., 2001)

หาก *c-kit* proto-oncogene เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้การทำงานของ KIT receptor จะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยผลผลิตของยีน *c-kit* จะสูญเสียหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต และส่งผลให้เกิดการ dimerization ตลอดเวลาแม้จะไม่มี การจับกันระหว่าง stem cell growth factor กับ KIT receptor ดังนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆจนเกิดเป็นลักษณะก้อนเนื้อออก หากทำการวินิจฉัยด้วยวิธีอิมมูโน โนฮีสโตเคมี จะพบการติดสีของ KIT receptor หรือ CD117 ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นจึงนำคุณลักษณะดังกล่าวมาใช้เป็นดัชนีพยากรณ์ (prognostic marker) เนื้ออกที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่มีอนุพันธ์ของยีน *c-kit* ซึ่งควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมีหลายรูปแบบ เช่น point mutation, deletion หรือ duplication โดยการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกิดขึ้นในส่วนของ juxtamembrane domain

ในเนื้อเยื่อปกติของสุนัขและแมวจะพบ KIT protein ได้ในเนื้อเยื่อ คือ mast cell, Purkinje cells ของ cerebellum, ICCs ที่อยู่ในทางเดินอาหาร, acinar epithelium ของ mammary gland (สุนัข), oocytes (แมว) และเยื่อคลุมลูก (สุนัขและแมว) (Morini et al., 2004). ในทางสัตวแพทย์ *c-kit* ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยเนื้ออกชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเนื้ออกชนิดมาสต์เซลล์ เนื่องจาก immunostaining ค่อนข้างมีความคงตัวสูงและจำเพาะต่อเนื้ออกชนิดนี้มาก ซึ่งเมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูโน โนฮีสโตเคมี พบลักษณะการติดสีเป็นแบบกระจาย (diffuse) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจเนื้ออกชนิดอื่นได้ แต่การติดสีอาจจะจางลงบ้าง เช่น Gastrointestinal spindle cell tumor (GIST) (Bettini et al., 2003), Canine mammary gland tumor (Kubo et al., 1998) และ Canine ovarian papillary carcinoma ส่วน Benign และ Malignant mammary tumors, Melanomas, Seminomas, Interstitial cell tumor granulose cell tumor ซึ่งจะติดสีอ่อนมาก นอกจากนี้การแสดงผลของ KIT ทำให้สามารถแยกแยะระหว่าง Canine hemangiosarcoma ออกจาก Benign proliferative endothelial

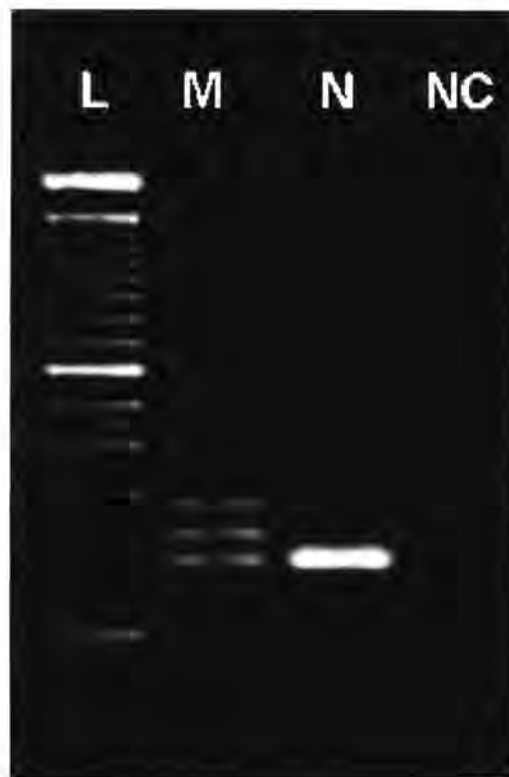
lesion (Fosmire et al., 2004) ส่วนเนื้องอกที่ไม่มีคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันต่อ KIT ได้แก่ Non-Hodgkin lymphoma (สุญัขและแมว), Pheochromocytoma (สุญัข), Adrenal cortical carcinoma (สุญัข), Thyroid gland carcinomas (สุญัขและแมว), Endometrial carcinoma (แมว), Leiomyomas (สุญัข), Leiomyosarcomas (สุญัขและแมว) และ Transmissible venereal tumor, TVT (สุญัข) (Morini et al., 2004).

พยาธิกำเนิดของมะเร็งมาสต์เซลล์ มักมีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ ของ *c-kit* proto-oncogene ทำให้การถอดรหัส KIT receptor เกิดความผิดปกติ มักพบว่าส่วนของ Juxtamembrane domain เกิด point mutation ได้บ่อยที่สุด (London et al., 1996; Zemke et al., 2002; Riva et al., 2005) ลักษณะ point mutation ที่เกิดขึ้นมีได้หลายลักษณะอาทิเช่น deletion หรือ duplication (Zemke et al., 2002; London et al., 1996) และการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสของยีน *c-KIT* ภายใน domain ดังกล่าว (Riva et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม point mutation สามารถเกิดได้ทุกส่วนของยีน *c-kit* (Zemke et al., 2002;) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า point mutation มักเกิดขึ้นใน Exon 11 และ 12 (London et al., 1996) โดยสามารถแยก internal tandem duplication (ITD) ใน Juxtamembrane domain ของ KIT receptor ซึ่งมีความยาว 3-79 bp. ได้จากส่วนของยีน *c-kit* (London et al., 1996) การทำงานของ Exon 11 และ 12 ใน mast cell ปกติ จะทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้เกิดการ dimerization ของ *c-kit* receptor ซึ่งทำให้ receptor อยู่ในสภาวะหยุดทำงาน (inactive) นอกจากนี้ยังพบว่า มะเร็งมาสต์เซลล์ที่อยู่ใน เกรด II และ III มักมีการ over-expression ของ KIT receptor (Zemke et al., 2002)

ในส่วนของ *c-kit* นั้น การกลายพันธุ์จะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีส่วนร่วมในพยาธิกำเนิดของมะเร็งมาสต์เซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว หน้าที่ของ *c-kit* คือควบคุมการสร้างโปรตีน KIT ในมาสต์เซลล์ ซึ่ง KIT เป็นโปรตีนชนิดที่ผ่านผนังเซลล์ (Transmembrane protein) ที่เป็น Tyrosine kinase receptor (RTK) ชนิดที่ 3 ซึ่งมีโครงสร้างระดับโมเลกุลประกอบด้วยส่วนของโครงสร้างที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular domain) ที่มีลักษณะคล้ายกับอิมมูโนโกลบูลินของแอนติบอดีจำนวน 5 ส่วน และส่วนโครงสร้างภายในเซลล์ (Intracellular domain) ที่ประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า Juxtamembrane domain และบริเวณของเอนไซม์ Kinase (kinase หรือ phosphotransferase domain) การทำงานของ KIT ขึ้นเมื่อบริเวณโครงสร้างภายนอกจับกับ โมเลกุลของโปรตีนเฉพาะที่เรียกว่า Stem cell factor (SCF หรือ Mast cell growth factor) ส่งผลให้เกิดการถ่ายทอดหมู่ฟอสเฟตไปยังโมเลกุลของ Tyrosine ที่อยู่บน KIT โดยอาศัยการทำงานของ Kinase domain เร่งปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในมาสต์เซลล์ขึ้นเป็นลำดับ สัญญาณดังกล่าวส่งผลให้มาสต์เซลล์เกิดการพัฒนาและมีการเปลี่ยนแปลงรวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนขึ้น (Webster et al., 2007) ซึ่ง ขบวนการส่งสัญญาณดังกล่าวจะถูกยับยั้งจากการทำงานของส่วนที่เป็น Juxtamembrane domain ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการส่งสัญญาณยับยั้ง (Negative regulator)

บริเวณของ Juxtamembrane domain ของ KIT ในสุนัขจะถูกควบคุมโดยกลุ่มของยีนที่อยู่ ใน Exon 11 ของ *c-kit* ซึ่งจากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า การกลายพันธุ์ของ *c-kit* ที่ส่งผลให้เกิด มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขนั้นจะเกิดจากการกลายพันธุ์ใน Exon 11 (Zemke et al., 2001) ในบริเวณ ดังกล่าวโดยเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะมีการแทรกลำดับเบสที่ซ้ำๆกัน ตั้งแต่ 45-70 bp ที่บริเวณ ปลาย 3' ของ Exon 11 ส่งผลให้เกิดการสร้างลำดับของกรดอะมิโนที่ซ้ำๆกันแทรกอยู่ในโครงสร้าง ของ Juxtamembrane domain ของ KIT (Internal tandem duplication หรือ ITD) (London, 1999; Zemke et al., 2002) ผลของการกลายพันธุ์ส่งผลให้ KIT สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องมีการจับกับ โมเลกุลของโปรตีนจำเพาะ รวมทั้ง Juxtamembrane domain ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ไม่สามารถ ยับยั้งขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ได้ ผลที่ได้ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของมาสต์เซลล์อย่าง รวดเร็ว และพัฒนาเป็นเนื้องอกและมะเร็งมาสต์เซลล์ในที่สุด

สำหรับการศึกษากการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ใน *c-kit* นั้นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ การศึกษาด้วย วิธี Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของ Genomic DNA และวิธี Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อศึกษาระดับของ mRNA ที่ เปลี่ยนแปลงไปจากการเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งวิธีทั้งสองให้ความไวและน่าเชื่อถือได้สำหรับการ ตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* (Turin et al., 2006) ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วย PCR นั้นพบว่าผลิตภัณฑ์ของ PCR (PCR product) ที่มีการกลายพันธุ์จะแสดง ให้เห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอ ที่ประกอบไปด้วยแถบย่อย 3 แถบคือ แถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีลปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีลของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบ ของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน เกิดจากการรวมตัวของอัลลีลของยีนปกติกับยีนอัลลีลที่มีการกลาย พันธุ์ (Zemke et al., 2002) สำหรับอุบัติการณ์ในการเกิดการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* นั้น จากการศึกษพบว่า มีประมาณ 9-33 % (Downing et al., 2002; Webster et al., 2006; and Zemke et al., 2002) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของผลผลิต PCR (PCR product) จากตัวอย่างเนื้อมะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* (M) เปรียบเทียบกับผลผลิต PCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (N) (ที่มา Webster et al., 2007)

การพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* รวมทั้งระดับของ mRNA ที่เพิ่มขึ้นรูปแบบการคิดสี่ของ KIT ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์นั้นซึ่งพบได้ในเนื้องอกเกรด II และ III นั้นมักจะสอดคล้องกับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในสุนัขที่เป็นเนื้องอกมาสต์เซลล์เมื่อเทียบกับเนื้องอกเกรด I (Zemke et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีส่วนในการตัดสินใจให้การรักษาเนื้องอกชนิดนี้โดยการใช้เคมีบำบัดสมัยใหม่ด้วย โดยพบว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จะมีการตอบสนองต่อยาที่ยับยั้งการทำงานของ Kinase (Tyrosine kinase inhibitor) โดยเฉพาะ Toseranib (Palladia®, Pfizer) ได้ดีกว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (London et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของอองโคจีน *c-kit* และกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ในปัจจุบันด้วยวิธี PCR นั้นมีการศึกษาจากตัวอย่างของเนื้อเยื่อที่เก็บมาจากก้อนเนื้องอกเท่านั้น

ด้วยเหตุผลดังกล่าว รวมทั้งการศึกษการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์โดยตรงจากเซลล์ที่เก็บได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) และการตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จากเซลล์ดังกล่าวเหล่านั้นซึ่งน่าจะเป็นวิธีที่ควรนำมาใช้ในทางปฏิบัติได้ ในปัจจุบันยังไม่ได้มีการพัฒนากระบวนการในการศึกษาดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษครั้งนี้จึงได้มีการพัฒนากระบวนการทาง

วิทยาศาสตร์ที่ยอมรับได้ เพื่อทำการศึกษการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์โดยใช้ขบวนการ CD117 immunocytochemistry (CD117-ICC) ซึ่งมีหลักการคล้ายคลึงกับ CD117-IHC โดยเทียบกับผลที่ได้จากการวินิจฉัยมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา และการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* รวมทั้งการตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จากเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) โดยเทียบผลจากวิธี PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เคยได้รับการศึกษามาแล้ว ดังกล่าวข้างต้นขึ้นมาเพื่อศึกษาในประเด็นดังกล่าว ภายใต้สมมติฐานที่ว่าตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์สามารถใช้เป็นแหล่งกำเนิดในการศึกษารูปแบบการติดสีทาง CD117-ICC สำหรับช่วยในการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกชนิดนี้ได้ รวมทั้งสามารถใช้เซลล์ดังกล่าวสำหรับศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* เช่นเดียวกับรูปแบบของชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอก โดยคาดว่าวิธีการดังกล่าวจะสามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย พยากรณ์โรค และการวางแผนในการรักษาในลักษณะเป็นเครื่องมือข้างเตียง (Bed-side tool) ในการตรวจวินิจฉัย พยากรณ์โรคและรักษาทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม ถูกต้อง สะดวก และรวดเร็วต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเซลล์และชิ้นเนื้อจากสุนัขที่ป่วยเป็นเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ผิวหนัง ที่เข้ารับการรักษาในคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2552 - สิงหาคม 2553 จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยไม่จำกัดอายุ เพศ พันธุ์ สุนัขป่วยผ่านขั้นตอนการตรวจทั่วไปของคลินิกโรคมะเร็ง สุนัขป่วยทุกตัวได้รับอนุญาตจากเจ้าของในการเก็บตัวอย่างและติดตามผล (ภาพที่ 3) คัดกรองเซลล์โดยการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาด้วยวิธี Fine Needle Aspiration (FNA) และย้อมสีพิเศษเพิ่มเติมเพื่อยืนยันในบางตัวอย่าง โดยใช้สี Giemsa's และ Toluidine blue ตามวิธีของอัจฉริยา ไสละสูต (พ.ศ. 2549) บันทึกประวัติสัตว์ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ พันธุ์ รวมไปถึงจนถึงข้อมูลของเนื้องอกตามระบบ TNM (Tumor Node Metastasis system) ของ World Health Organization (WHO) (Owen, 1980) (ได้แก่ ตำแหน่ง ขนาด รูปร่าง การกระจายของเนื้องอกไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง) เพื่อประเมินระดับอาการทางคลินิก (ตารางที่ 1) ตรวจสอบสุขภาพทางกายภาพและทางโลหิตวิทยา และเคมีเลือด ประกอบด้วย การตรวจการทำงานของตับ ได้แก่ Alanine aminotransferase (ALT) และ Alkaline phosphatase (ALP) และการทำงานของไต ได้แก่ ค่า Blood urea nitrogen (BUN) และ Creatinine (Cr) และอื่นๆตามดุลยพินิจของสัตวแพทย์ผู้ทำการตรวจรักษา (ภาคผนวก ก)



3

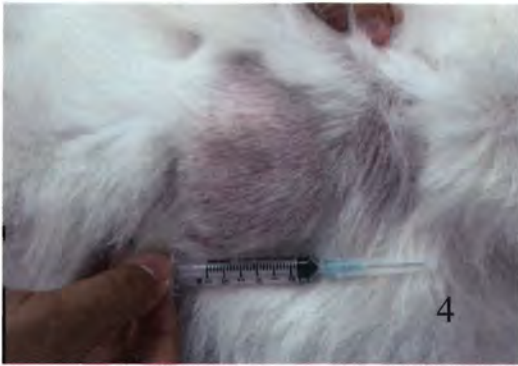
ภาพที่ 3 ภาพสุนัขป่วยด้วยมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 1 การแบ่งระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอก (Owen, 1980)

Stage	Clinical Stage
Stage I	One tumour confined to the dermis, no local or regional lymph node involvement
Stage II	One tumour confined to dermis with local or regional lymph node involvement
Stage III	Large infiltrating tumours with or without regional lymph node involvement
Stage IV	Any tumour with distant metastases

เก็บตัวอย่างเนื้องอกโดยใช้ punch biopsy (KRUUSE®, Denmark) ตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกเก็บและรักษาด้วยสารละลาย 10% Formaldehyde โดยจัดกลุ่มตัวอย่างเนื้องอกที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เกรด I (10 ตัวอย่าง) เกรด II (10 ตัวอย่าง) และเกรด III (10 ตัวอย่าง) โดยใช้วิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคทางจุลพยาธิวิทยาของ Patnaik และคณะ (Patnaik histologic grading system, 1984) ตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตามเกณฑ์ ดังนี้เนื้องอกมาสต์เซลล์ เกรด I จะเป็นเนื้องอกที่เซลล์เนื้องอกมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับมาสต์เซลล์ปกติที่พบที่บริเวณผิวหนัง (Well-differentiated) ส่วนเกรด II (Intermediately differentiated) จะพบว่าเซลล์เนื้องอกจะมีการพัฒนาตัวอยู่ระหว่างมาสต์เซลล์ปกติ กับเซลล์ต้นกำเนิดของมาสต์เซลล์ (Mast cell progenitor) และเนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด III นั้น พบว่าเซลล์เนื้องอกนั้นจะมีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด (Undifferentiated หรือ Atypical) (Patnaik et al., 1984) และเนื้อเยื่อเนื้องอกมาสต์เซลล์นำไปศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อไป

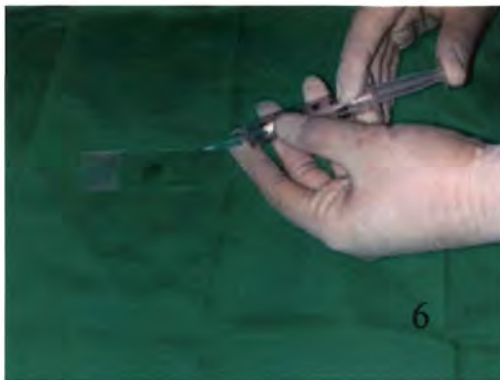
เก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยการเจาะดูดด้วยเข็มขนาด 23 gauge (อัจฉริยา ไสละสูต และคณะ พ.ศ. 2549) จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ฟันลงบนสไลด์สะอาดที่เคลือบด้วยสาร Silane ตรึงสภาพเซลล์ด้วย cold acetone ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำไปศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อไป ส่วนที่ 2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ตัวอย่างเซลล์จะถูกเก็บใน Eppendorf® collecting tube ที่มีสารละลาย PBS จำนวน 200 µL เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดต่อไป



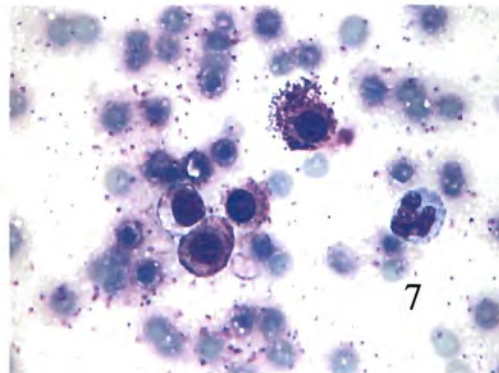
ภาพที่ 4 แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อน
มะเร็งมาสต์เซลล์



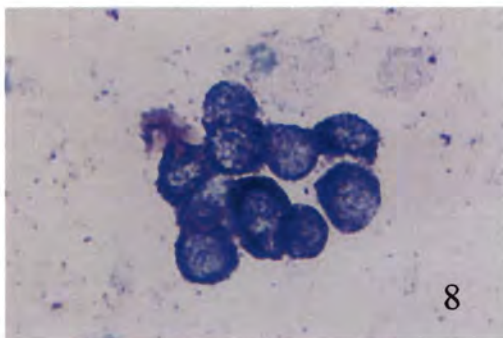
ภาพที่ 5 แสดงการเก็บตัวอย่างโดยวิธี
เจาะดูด (Fine Needle Aspiration)
(FNA-MCT cells)



ภาพที่ 6 การพ่นเซลล์มะเร็งป้ายละเลงบน
สไลด์ เพื่อตรึงสภาพและย้อมสี
ต่อไป



ภาพที่ 7 ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์
พบเซลล์มะเร็งมี granule จำนวนมาก
Giemsa's stain



ภาพที่ 8 ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์
พบการติดสี Metachromatic granule
จำนวนมาก Toluidine blue stain

3.2 วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้ EnVision™ detection system

ตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทั้งหมด ภายหลังจากผ่านขบวนการในการเตรียมเนื้อเยื่อมาตรฐานที่ใช้ใน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำเข้าสู่ขบวนการละลายพาราฟินออก (deparaffinization) โดยแช่ใน Xylene เป็นเวลา 5 นาที รวม 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ใน Xylene ผสมแอลกอฮอล์เป็นเวลา 2 นาที และแช่ใน แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที จากนั้นตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดจะถูกแช่ใน แอลกอฮอล์ 95%, 80% และ 70% เป็นเวลา 2 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างตัวอย่างโดยเปลี่ยนน้ำไหลผ่านตัวอย่าง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเตรียมสไลด์ตัวอย่างด้วยการใส่ Tris-EDTA แล้วนำไปอบด้วยไมโครเวฟใช้ความร้อนระดับ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเพิ่มการปรากฏตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง ล้างสไลด์ด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ peroxidase ภายใตเซลล์เนื้องอกด้วย 0.3% H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (หรือใช้เมทานอลบริสุทธิ์ 150 มล. ผสมกับ 30% H_2O_2 1.5 มล.) หลังจากนั้นให้นำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง ต่อมาใส่ 1% BSA (Bovine serum albumin, BSA) เป็นเวลา 45 นาที แล้วล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่แอนติบอดีตัวแรก คือ Rabbit polyclonal anti-human *c-kit* antibody (DAKO™, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:100 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตัวอย่างด้วย PBS 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นเริ่มกระบวนการทำให้เกิดสีของโปรตีน KIT โดยเริ่มจาก ใส่ Envision polymer peroxidase system (DAKO™, Denmark) เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS 5 นาที ล้างจำนวน 3 ครั้ง ต่อมาใส่ DAB chromogenic substrate (DAB 0.075 g ใน Tris buffer 150 มล. และ 30% H_2O_2 50 ไมโครลิตร) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการล้างในน้ำกลั่น แล้วทำการย้อมทับด้วย hematoxylin เป็นเวลา 2 นาที ล้างตัวอย่างโดยการเปลี่ยนน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที ทำการเอาน้ำออกจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ (dehydrate) โดยใช้ แอลกอฮอล์ 70%, 80% และ 95% เป็นเวลา 2 นาที ตามลำดับ และทำการปิดเนื้อเยื่อด้วย Cover slip แล้วนำมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ต่อไป สำหรับสไลด์ควบคุมลบ (negative control) คือ ชิ้นเนื้อที่ได้ใช้ normal rabbit IgG แทนแอนติบอดีตัวแรก ส่วนสไลด์ควบคุมบวก (positive control) คือ ชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยนับที่กำลังขยาย X40 (HPF) โดยเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวก (positive control) ชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์เกรด II การติดสีของ KIT ในเซลล์มะเร็งแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ การติดสีแบบที่ 1 คือ การติดสีที่ผนังส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) และอาจพบการติดสีที่ส่วนไซโตพลา

สซึมเล็กน้อย การติดสีแบบที่ II คือ การติดสีจะเข้มข้นและมีลักษณะเป็นจุดหรือหย่อมภายในไซโตพลาสซึม การติดสีแบบที่ III คือ การติดสีกระจายทั่วไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอกมาสเซลล์

3.3 วิธีการศึกษารูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ด้วยเทคนิคอิมมูโนไฮสโตเคมี จากตัวอย่างเซลล์เนื้องอกที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) โดยใช้วิธี EnVision™ detection system

ตัวอย่างของเซลล์เนื้องอกจะถูกป้ายลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบ Silane (Silane glass slide) แล้วตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ขบวนการตรึงสภาพด้วยสารละลาย Acetone เย็น (4°C Cold acetone) เป็นเวลา 1-2 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ peroxidase ภายในเซลล์เนื้องอกด้วย 0.3% H₂O₂ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างเนื้อเยื่อไปล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง ต่อมาใส่ 1% BSA (Bovine serum albumin) เป็นเวลา 45 นาที แล้วล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่แอนติบอดีตัวแรก คือ Rabbit polyclonal anti-human *c-kit* antibody (DAKO™, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1: 600 เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างตัวอย่างด้วย PBS 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นเริ่มกระบวนการทำให้เกิดสีของโปรตีน KIT โดยเริ่มจาก ใส่ Envision polymer peroxidase system ((DAKO™, Denmark) เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS 5 นาที ทำการล้างจำนวน 3 ครั้ง ต่อมาใส่ DAB chromogenic substrate (DAB 0.075 g ใน Tris buffer 150 มล. และ 30% H₂O₂ 50 ไมโครลิตร) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการล้างในน้ำกลั่น แล้วทำการย้อมสีทับด้วย hematoxylin เป็นเวลา 2 นาที ล้างตัวอย่างโดยการปล่อยน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที และทำการปิดเนื้อเยื่อด้วย Cover slip แล้วนำมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดยเปรียบเทียบลักษณะการติดสีกับผลที่ได้จาก รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนไฮสโตเคมี

3.4 วิธีการศึกษาการแสดงออกของ อย่งโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* จากตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสเซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ด้วยเทคนิค PCR

ตัวอย่างของเซลล์เนื้องอกสดที่เก็บไว้จะถูกนำมาสกัดเพื่อเก็บดีเอ็นเอ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Ultraclean™ Tissue & Cells DNA isolation kit, Mobio®, USA) โดยใช้วิธีการตามที่กำหนดไว้โดยผู้ผลิตดังนี้ เซลล์เนื้องอกจะถูกทำให้แตกออกโดยใส่สารละลาย TD1 จำนวน 1000 µl ทำการเขย่าสารละลายกับเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ต่อมานำสารละลายที่ได้ (lysate) ใส่ลงใน silica spin filter collecting tube แล้วปั่น (centrifugation) ที่ 10,000 x g เป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วเทน้ำที่กรองได้ทิ้ง ซึ่ง genomic DNA จะจับอยู่บน silica spin filter ต่อมามีเติมสารละลาย TD2 จำนวน 400 µl แล้วปั่นที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทน้ำกรองทิ้ง จากนั้นปั่นหลอดใส่ตัวอย่างเซลล์อีกครั้งที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3

นาที่กำจัดสารละลาย TD2 ออกให้หมด หลังจากนั้นย้าย silica spin filter ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 2 ml อันใหม่ ทำการใส่สารละลาย TD3 จำนวน 50 μ l (eluting buffer) แล้วปั่นที่ 10,000 x g ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาทีซึ่งดีเอ็นเอจะอยู่ในหลอดเก็บตัวอย่าง

ภายหลังจากได้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้ว สารละลายดีเอ็นเอจะถูกนำมาเตรียมเป็น สารละลายสำหรับทำ PCR (PCR cocktail) โดยเริ่มจากนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 2 μ l ผสมกับสารละลาย 12.5 μ l commercial PCR master mix จำนวน 12.5 μ l จากนั้นใส่ Forward primers ของ Exon 11 (5'-CCA TGT ATG AAG TAC AGT GGA AG-3') (Cameron et al., 2004) และ reverse primers ของ Intron 11 (5' GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG-3') (Cameron et al., 2004) จำนวนอย่างละ 2 μ l สุดท้ายเติม PCR distilled water จำนวน 6.5 μ l ลงใน สารละลายสำหรับทำ PCR ซึ่งปริมาตรสุดท้ายของ PCR cocktail เท่ากับ 25 μ l

ทำการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอที่จะศึกษา (DNA amplification) โดยนำ PCR cocktail ที่เตรียมได้ใส่ลงในเครื่อง Thermocycler โดยทำการตั้งโปรแกรมและลงรอบการทำงานของเครื่อง ดังนี้ เริ่มต้นโดยใช้อุณหภูมิ 94° C เป็นเวลา 4 นาทีเพื่อเริ่มขบวนการทำให้ดีเอ็นเอเสียธรรมชาติ จากนั้นทำเริ่มการทำวงรอบการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยมีวงรอบการทำงานจำนวน 40 วงรอบ ประกอบด้วย การใช้อุณหภูมิ 94° C เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อการทำให้ดีเอ็นเอเสียรูปตามธรรมชาติ หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือ 55° C เป็นเวลา 1 นาทีสำหรับให้ดีเอ็นเอคืนสภาพธรรมชาติซึ่ง primers จะสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดได้ หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนเป็น 72° C เป็น เวลา 1 นาทีเพื่อให้เกิดการสร้างสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (Webster et al., 2006 and 2007; Cameron et al., 2004)

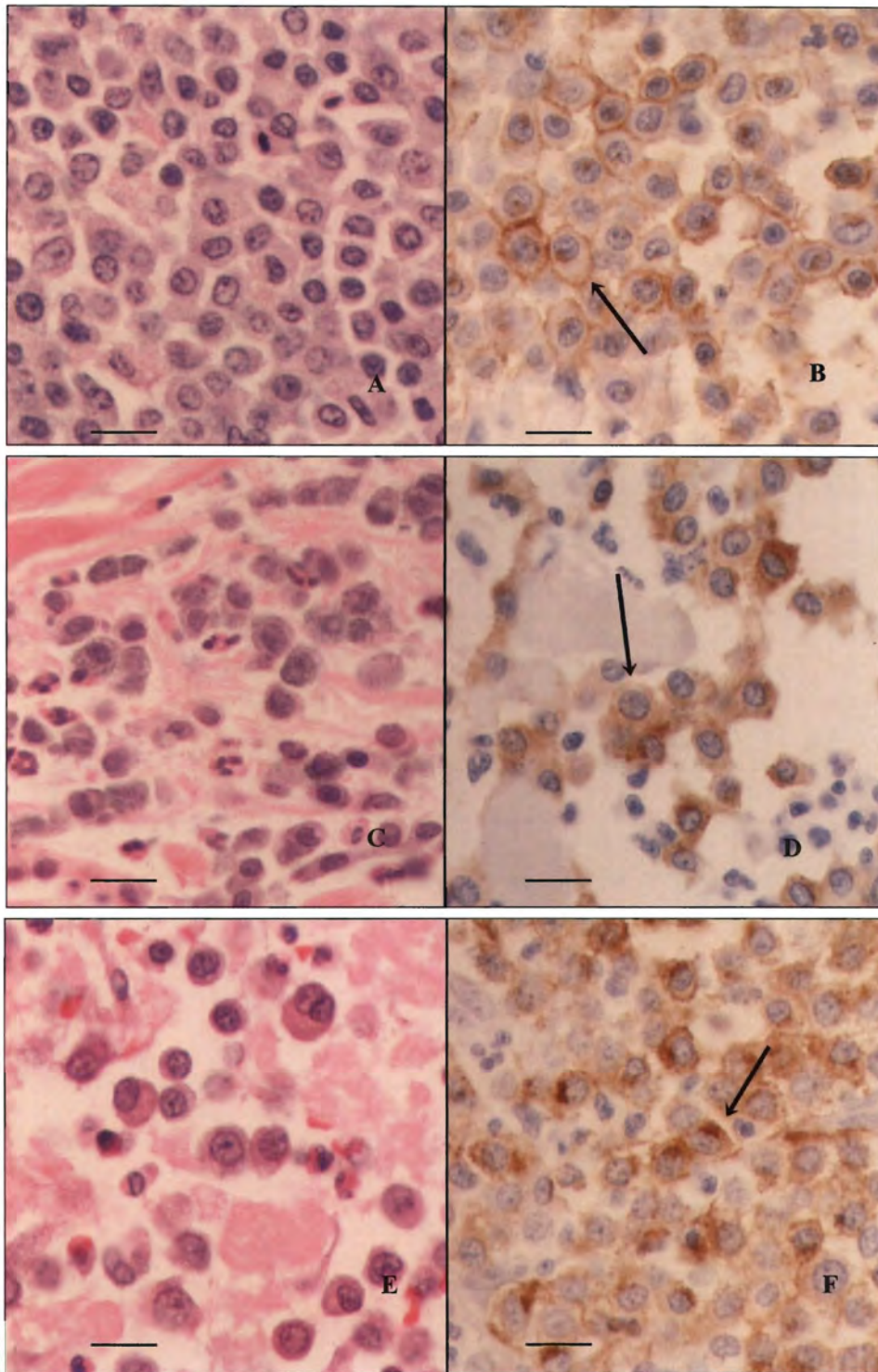
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำมาวิเคราะห์ โดยวิธี Electrophoresis โดยที่ผลผลิต PCR จะถูกย้ายลงใน 2% Agarose gel ที่แช่อยู่ในสารละลาย TBE solution แล้วจึงจ่ายกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าขนาด 100 V ลงสู่สารละลาย TBE เป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นทำการย้อมสีโดยย้าย Agarose gel ลงในภาชนะที่บรรจุ Ethidium bromide (EtBr) เป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างและหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยสารละลาย de-staining solution เป็นเวลา 5 นาทีแล้วทำการตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในผลผลิต PCR ต่อไปด้วย รังสีอัลตราไวโอเล็ต ผลที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทำ PCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้รายงานมาแล้ว (Webster et al., 2007)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 รูปแบบการคิดสีของ KIT (CD 117) ในตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัขทางภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมี และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา

รูปแบบการคิดสี KIT ทางภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมี ได้แก่ รูปแบบที่ I, II และ III เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง เกรดที่ I, II และ III อย่างละ 10 ตัวอย่าง (ภาพที่ 9) รูปแบบการคิดสีของ KIT ที่พบในมะเร็งมาสต์เซลล์เป็นรูปแบบการคิดสีแบบที่ II มากที่สุด คือ ร้อยละ 46.66 (14/30) รองลงมาเป็นมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบการคิดสีแบบที่ III ร้อยละ 33.33 (10/30) และมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบการคิดสีแบบที่ 1 ร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ ผลจากการจำแนกรูปแบบการคิดสีของ KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมีสอดคล้องกับผลการแบ่งเกรดจากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา จำนวน 21 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70 (21/30) พบว่ามะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT รูปแบบที่ II จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT แบบที่ III จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด III จำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮีสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ II จำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่สอดคล้องจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 (9/30)



ภาพที่ 9 การจำแนกเกรดก่อนมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (Patnaik et al., 1984) H&E มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (A) เกรด II (C) และ เกรด III (E) และรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโนโนฮิสโตเคมีของมะเร็งมาสต์เซลล์ มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ I แสดงการติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(perimembrane) (B) ; รูปแบบที่ II แสดงการติดสีเข้ามาภายในไซโต

พลาสมาซึมมากขึ้น บางส่วนติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic staining) และเป็นหย่อมบริเวณข้างๆนิวเคลียส (paranuclear staining) (D); รูปแบบที่ III แสดงการติดสีกระจายทั่วในไซโตพลาซึมและเซลล์มีขนาดแตกต่างกัน (diffuse cytoplasmic staining) ถูกสรแสดงการติดสีรูปแบบต่าง ๆ Envision™, Hematoxylin counterstained, DAB, Bar= 50 μ m

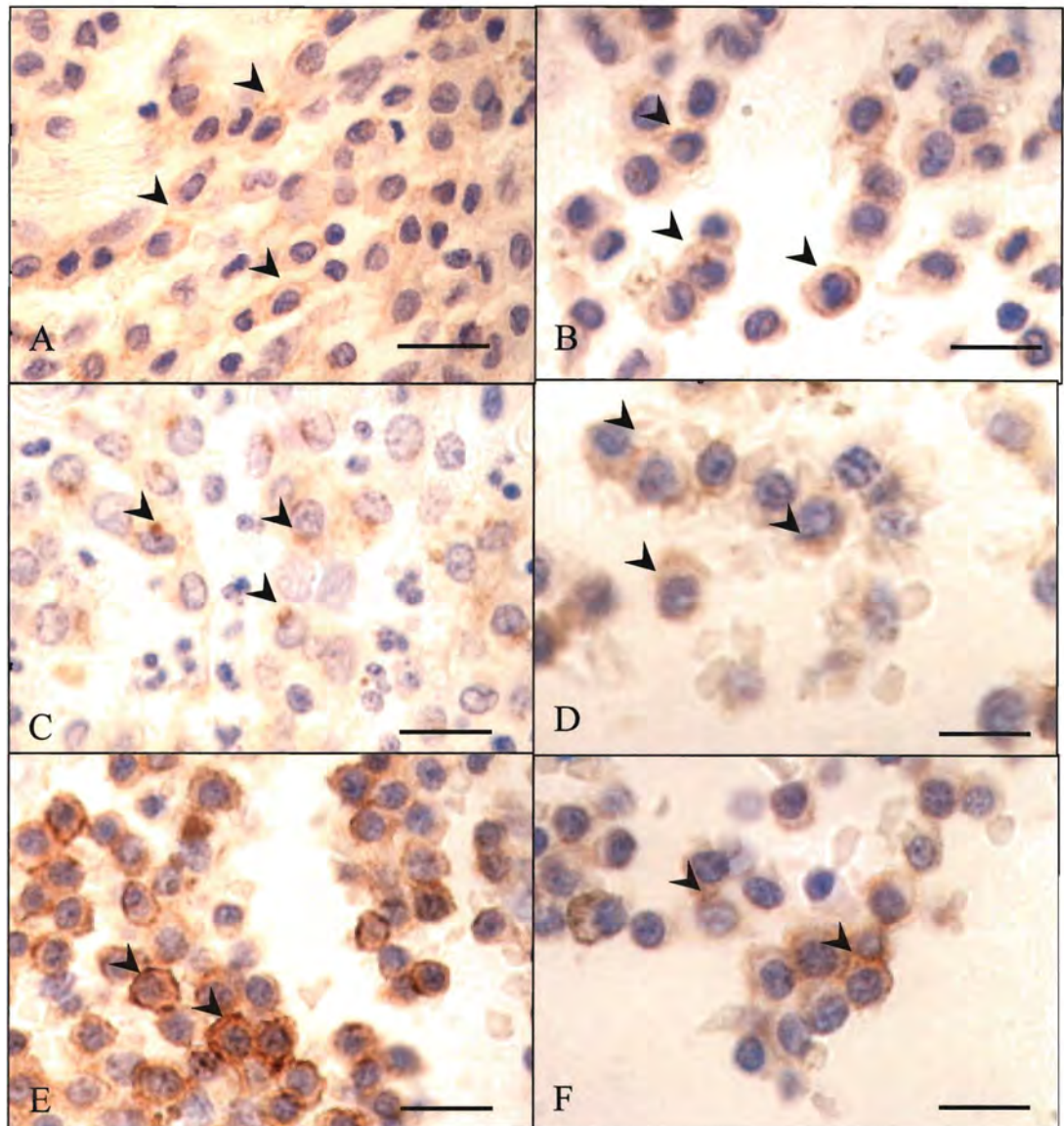
4.2 รูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ในสุนัขด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีและวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

จากผลการศึกษาพบว่ารูปแบบการติดสีของ KIT ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี ดังนี้ การติดสีของ KIT รูปแบบที่ I คือ ติดสีที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์อย่างชัดเจน รูปแบบที่ II คือ ติดสีจะเข้มขึ้นและมีลักษณะเป็นจุด ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ รูปแบบที่ III คือ ติดสีการติดสีกระจายทั่วไซโตพลาซึม (cytoplasmic staining) ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์

จากการเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่า ลักษณะการติดสีในตัวอย่างของทั้งสองวิธีมีรูปแบบการติดสีของ KIT สอดคล้องกันร้อยละ 93.33 (28/30) (ภาพที่ 10) โดยแตกต่างกันจำนวน 2 ตัวอย่าง ผลการติดสีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นรูปแบบที่ II จำแนกจากการติดสีของ KIT ทางอิมมูโนไซโตเคมีเป็น รูปแบบที่ I จำนวน 1 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง

รูปแบบการติดสี KIT ทางอิมมูโนไซโตเคมี ทั้ง 3 รูปแบบ (I, II และ III) เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง (เกรดที่ I, II และ III อย่างละ 10 ตัวอย่าง) จากรูปแบบการติดสีของ KIT ทางอิมมูโนไซโตเคมี ที่พบในมะเร็งมาสต์เซลล์มีการติดสีรูปแบบที่ II มากที่สุด คือ ร้อยละ 40 (12/30) รองลงมาเป็นมะเร็งมาสต์เซลล์ที่มีการติดสีรูปแบบที่ III ร้อยละ 36.66 (11/30) และ มะเร็งมาสต์เซลล์ที่มีการติดสีรูปแบบที่ I ร้อยละ 23.33 (7/30) ผลที่ได้จากการจำแนกรูปแบบการติดสีของ KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี สอดคล้องกับการแบ่งเกรดของตัวอย่างที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาทั้งหมด 21 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70 (21/30) พบว่ามะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีได้การติดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ II จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีการติดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ III 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด III จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุล

พยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไฮสโตเคมีการติดสี KIT เป็นรูปแบบที่ I และ รูปแบบที่ II จำนวน 1 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สอดคล้องจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 (9/30)



ภาพที่ 10 รูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโน ไฮสโตเคมีของมะเร็งมาสต์เซลล์ (A,C,E) และ อิมมูโน ไฮสโตเคมีจากตัวอย่างเซลล์จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) (B,D,F) มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ I แสดงการติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(perimembrane) (A และ B) ; รูปแบบที่ II แสดงการติดสีเข้ามาภายในไซโตพลาสซึมมากขึ้นและยังมีบางส่วนติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(cytoplasmic staining) (C และ D) ; รูปแบบที่ III แสดงการติดสีกระจายทั่วใน

ไซโตพลาสซึมและเซลล์มีขนาดแตกต่างกัน (diffuse cytoplasmic staining) (E และ F) หัวลูกศร แสดงการติดสีรูปแบบต่างๆ Envision™, Hematoxylin counterstain, DAB, BAR = 50 μ m

4.3 การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จากเซลล์มะเร็ง มาตรฐานเซลล์ (FNA-MCT cells) ด้วยวิธี PCR

จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งมาตรฐานเซลล์ ที่เก็บได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) จำนวน 30 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR นั้น พบว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งกำเนิดในการวิเคราะห์การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ได้ โดยปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งโดยเฉลี่ยประมาณ $> 1 \mu$ g จากจำนวนเซลล์ที่เจาะดูดได้ครั้งละประมาณ $3.0 - 4.5 \times 10^5$ cells/ μ l พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) ไม่พบการแสดงออกร้อยละ 6.67 (2/30) ซึ่ง 2 ตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างมะเร็งมาตรฐานเซลล์ เกรด III และ I ตามลำดับ การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ปกติ (normal MCT) พบแถบที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) ใน 20 ตัวอย่างนี้เป็นเซลล์มะเร็งมาตรฐานเซลล์เกรด I จำนวน 9 ตัวอย่าง เกรด II จำนวน 6 ตัวอย่าง และ เกรด III จำนวน 5 ตัวอย่าง และพบการกลายพันธุ์ของ exon 11 ของ *c-kit* ร้อยละ 28.57 (8/28) ซึ่งพบแถบแรกเป็นแถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีลปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีลของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน ซึ่งลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับที่เกิดขึ้นในตัวอย่างควบคุมบวก และเหมือนกับที่มีรายงานในการศึกษาก่อนหน้าที่ทำในเนื้อเยื่อ (Webster et al., 2007) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงแถบของผลผลิต PCR จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ตัวอย่างเซลล์ในช่อง 5,7 และ 8 แสดงแถบ DNA ของ normal MCT ที่ 191 bp เปรียบเทียบตัวควบคุมบวก ช่องที่ 3 ส่วนช่องที่ 6 พบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกช่องที่ 2 (Webster et al., 2007)

ดังนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) สามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* พบในมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกเกรดมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัขทางจุลพยาธิวิทยา รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนไซโตเคมี และ การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* (n=30)

ตัวอย่าง	จำแนกเกรดทาง จุลพยาธิวิทยา	รูปแบบการ ติดสี KIT IHC-MCT	รูปแบบการ ติดสี KIT ICC-MCT	<i>c-kit</i> Expression
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	1	1	1	1
6	1	1	1	1
7	1	2	2	1
8	1	2	2	2
9	1	2	2	1
10	1	3	3	1
11	2	2	2	2
12	2	2	2	2
13	2	2	2	1
14	2	2	2	1
15	2	2	2	1

16	2	2	2	1
17	2	2	2	2
18	2	3	3	1
19	2	3	3	-
20	2	3	3	1
21	3	3	3	2
22	3	3	3	2
23	3	3	3	1
24	3	3	3	1
25	3	3	3	1
26	3	3	3	-
27	3	3	3	1
28	3	3	2	1
29	3	2	3	2
30	3	2	1	1

หมายเหตุ

การจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา เกรด I = 1 เกรด II = 2 เกรด III = 3

รูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และ อิมมูโนไซโตเคมี

รูปแบบที่ I = 1 รูปแบบที่ II = 2 รูปแบบที่ III = 3

การแสดงผลของ *c-kit* ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)

Normal MCT = 1, Mutation in Exon 11 of *c-kit* = 2

4.4 ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก โลหิตวิทยา และเคมีเลือด ของสุนัขที่ได้ศึกษา กับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์

ไม่พบความสัมพันธ์ เนื่องจากอาการทางคลินิก ผลทางโลหิตวิทยา และเคมีเลือดของสัตว์ป่วยแต่ละรายมีความจำเพาะในแต่ละราย (ภาคผนวก ก)

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ II พบร้อยละ 46.66 (14/30) รองลงมาเป็นรูปแบบที่ III พบร้อยละ 33.33 (10/30) และรูปแบบ I พบร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ พบว่าจากการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี มีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641, P < 0.05$)

ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ (FNA-MCT cells) ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี จากเซลล์มะเร็งที่เก็บโดยวิธีเจาะดูด เทียบกับการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา พบว่ารูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ II ร้อยละ 40 (12/30) รองลงมาเป็นรูปแบบที่ III คือ ร้อยละ 36.66 (11/30) และรูปแบบที่ I พบร้อยละ 23.33 (7/30) ตามลำดับ พบว่าการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีมีความสัมพันธ์กับการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615, P < 0.05$)

ผลการแสดงออกของยีน *c-kit* ในเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ (FNA-MCT cells) โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเซลล์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่เก็บด้วยวิธีการเจาะดูด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) โดยพบแถบของ DNA ปกติที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (9 ตัวอย่าง) เกรด II (6 ตัวอย่าง) และ เกรด III (5 ตัวอย่าง) และพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* พบแถบแรกเป็นแถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีลปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีลของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน ร้อยละ 28.57 (8/28) ในตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด II (5 ตัวอย่าง) และ เกรด III (3 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังนั้นตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูดสามารถศึกษาการแสดงออกของยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* พบในก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I

อาการทางคลินิก ผลทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือดของสัตว์ป่วยแต่ละราย มีความจำเพาะในแต่ละราย ไม่พบความสัมพันธ์กับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ศึกษา

บทที่ 5

การอภิปราย ข้อสรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 การอภิปรายผล

การศึกษาการแสดงออกของ *c-kit* ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่เจาะดูดออกมา (Fine Needle Aspiration, FNA-MCT cells) ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ในจำนวนสัตว์ป่วยด้วยโรคมะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ราย พบว่าสุนัขป่วยมีอายุเฉลี่ย 9.6 ปี และเพศไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับอุบัติการณ์ในการเกิดมะเร็งมาสต์เซลล์ มักจะพบในสุนัขที่มีอายุมากหรือสุนัขสูงวัย (Govier et al., 2003) และไม่มีความแตกต่างของเพศในการเกิดมะเร็ง (Thamm et al., 2007) จากผลการศึกษาครั้งนี้ สุนัขพันธุ์ผสมเป็นพันธุ์ที่พบมะเร็งมาสต์เซลล์ได้มาก เนื่องจากสุนัขที่รักษาในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยนั้น มักจะเป็นสุนัขพันธุ์ผสมและสุนัขที่พบมะเร็งมาสต์เซลล์ในเขตกรุงเทพมหานครเป็นพันธุ์ผสมมากกว่าพันธุ์แท้ ส่วนสุนัขสายพันธุ์ Boxer, Golden retriever, Pug ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่โน้มนำให้เกิดมะเร็งมาสต์เซลล์ (Baker-Gabb et al., 2003, Rothwell et al., 1987) สามารถพบการเกิดมะเร็งได้เช่นกัน และตำแหน่งการเกิดของมะเร็งมาสต์เซลล์ส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณลำตัวและขาหลังเป็นบริเวณที่พบบ่อย (Rothwell et al. 1987) การพบมะเร็งมาสต์เซลล์เกรดต่างๆกับอายุ เพศ พันธุ์ และบริเวณตำแหน่งของร่างกายจากตัวอย่างที่ศึกษานั้น พบว่าไม่สามารถสรุปและหาความสัมพันธ์ของตำแหน่งของการเกิดเนื้องอก อาการทางคลินิก และผลทางพยาธิวิทยาคลินิก ได้แก่ โลหิตวิทยา และเคมีเลือด กับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์ได้ เนื่องจากสุนัขที่มารับการรักษา มีความแตกต่างในการอาการทางคลินิก ระยะการพบบ่อนมะเร็ง สัตว์ป่วยเคยได้รับการรักษามาก่อน ก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์กลับมาเกิดขึ้นใหม่ สภาพการเลี้ยงดู สุขภาพของสุนัขป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนด้วยโรคในระบบต่างๆด้วย ทำให้ข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยาคลินิกมีความจำเพาะแต่ละราย ดังนั้นสุนัขที่เป็นมะเร็งหรือเนื้องอกมาสต์เซลล์ควรได้รับการวินิจฉัยโดยวิธีการจุลพยาธิวิทยา หรืออิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อจำแนกเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์เพื่อใช้เป็นแนวทางปฏิบัติในการวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรคในแต่ละราย

รูปแบบการติดสี KIT (CD117-IHC) โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อจำแนกรูปแบบของมะเร็งมาสต์เซลล์เปรียบเทียบกับกรจำแนกเกรดโดยวิธีจุลพยาธิวิทยา พบว่ามีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641, P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kiupel และคณะ (2004) การใช้รูปแบบการแสดงออกของ KIT นั้นสามารถนำไปใช้เพื่อวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรคได้ เนื่องจากการแสดงออกของ KIT จะสัมพันธ์กับความรุนแรงของมะเร็ง (malignant transformation) (Kiupel et

al., 2004) จากผลการศึกษาที่มีจำนวน 9 ตัวอย่างผลทางอิมมูโนฮิสโตเคมี แตกต่างจากจุลพยาธิวิทยา โดยในเกรด I แต่ผลทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นรูปแบบที่ II และ III ซึ่งพบการติดสีรูปแบบที่ II ร้อยละ 46.66 (14/30) อาจเนื่องจากพฤติกรรมทางชีวภาพของเนื้องอกอยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงในระยะก้ำกึ่ง (transitional stage) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นหลังอุบัติการณ์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่พบเกรด II มากที่สุดเช่นกัน (Loplamler et al., 2010) นอกจากนี้ การแสดงออกของ KIT ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีช่วยในการวินิจฉัยแยกแยะมะเร็งมาสต์เซลล์ออกจากมะเร็งผิวหนังชนิดอื่นๆ ในเนื้องอก/มะเร็งกลุ่ม round cell ได้ เช่น Histiocytoma, Lymphoma, Transmissible venereal tumor, TVT จากความจำเพาะของ CD117 ของ Mast cell (Kiupel et al., 2004) สามารถช่วยในการจำแนกเกรดที่มีลักษณะก้ำกึ่งจากการจำแนกทางจุลพยาธิวิทยาได้ และการติดสี KIT รูปแบบต่างๆสามารถช่วยในการจำแนกเกรดเนื้องอกมาสต์เซลล์ได้

การประยุกต์ใช้วิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี (Immunocytochemistry) ในการวินิจฉัยเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (Fine Needle Aspiration, FNA) โดยใช้รูปแบบการติดสีช่วยในการจำแนกเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์ได้ พบว่ามีความสอดคล้องเช่นเดียวกับกับรูปแบบการแสดงออกของ KIT ของอิมมูโนโนไซโตเคมี จากการประเมินรูปแบบการติดสีของ KIT ทางอิมมูโนโนไซโตเคมีสอดคล้องกันถึงร้อยละ 93.33% ซึ่งสามารถนำมาใช้ควบคู่กันได้ รวมทั้งความสัมพันธ์กับการจำแนกเกรดด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยามาตรฐานในเชิงบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615$, $P < 0.05$) เช่นเดียวกับวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีซึ่งเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นรูปแบบการติดสีของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีการอิมมูโนโนไซโตเคมี สามารถนำมาใช้เพื่อการจำแนกเกรดทางคลินิกได้อย่างรวดเร็ว สะดวกรวดเร็วเหมาะสมในทางปฏิบัติข้างตัวสัตว์เช่นเดียวกับเซลล์วิทยาคลินิก

จากผลการศึกษาการแสดงออกของอองโคจีน *c-kit* ในเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเซลล์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่เก็บด้วยวิธีการเจาะดูด พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) อาจเนื่องจากคุณภาพของตัวอย่างและจำนวนของเซลล์ที่เก็บได้ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการเก็บตัวอย่างทางคลินิก ตามปกติการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ทางเซลล์วิทยาคลินิก ด้วยวิธีเจาะดูดได้เซลล์จำนวนมากอยู่แล้ว จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสกัด DNA ได้มากกว่า 90 % นับว่าเป็นการพัฒนาครั้งแรกที่น่าพอใจ โดยพบแถบของ DNA ของ มาสต์เซลล์ปกติ และพบการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* จำนวน 3 แถบในลักษณะ ITD ของ *c-kit* นั้นตรงกับการศึกษาที่ได้รายงานมาก่อน (Zemke et al., 2002) ตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) สามารถศึกษาการแสดงออกของอองโคจีน *c-kit* โดยพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จำนวนร้อยละ 28.57 (8/28) สอดคล้องกับการศึกษาที่ได้รายงานการพบประมาณ 9-33% ของตัวอย่าง ซึ่งศึกษาในเนื้อเยื่อก้อนมะเร็ง (Dowing et al., 2002, Zemke et al., 2002, Webster et al., 2006) รวมทั้งการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (Ma, et al., 1999, Dowing et al., 2002) การกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ของอองโคจีน *c-kit* พบในก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์

ทั้งเกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I นั้น โดยเกรดของเนื้องอกไม่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของ *c-kit* แต่อาจสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของ *c-kit* จะพบเฉพาะในเกรด II และ III ซึ่งสอดคล้องกับความรุนแรงของก้อนเนื้องอก ข้อมูลการกลายพันธุ์จะช่วยให้สัตวแพทย์วางแผนการรักษาได้อย่างเหมาะสม เช่นการใช้ยาในกลุ่ม Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) ซึ่งมีข้อแนะนำให้ใช้ในสัตว์ป่วยด้วยมะเร็งมาสต์เซลล์พบที่การกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* โดยให้ผลที่น่าพอใจต่อการรักษา (Pryer et al., 2003, London, 2009, Yancey et al., 2009)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยข้างตัวสัตว์ได้ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) นั้นสามารถนำมาใช้ประกอบการอธิบายพยาธิสภาพเซลล์เนื้องอกชนิดนี้ได้ ร่วมกับอาการทางคลินิก การตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิกของสุนัขป่วยแต่ละราย ซึ่งมีประโยชน์ในการพยากรณ์โรคทางเซลล์พยาธิวิทยา และการวางแผนการรักษาสุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมในระดับข้างตัวสัตว์ได้ต่อไป

5.2 ข้อสรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยพบว่า สามารถใช้ตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและจำแนกเกรดก้อนเนื้อมะเร็งมาสต์เซลล์ จากรูปแบบการติดสีของ KIT (CD 117) ในเซลล์มะเร็งโดยวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี (ICC-MCT) ตรวจการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ได้ โดยผลการศึกษาทางวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษาจากเนื้อเยื่อมะเร็งมาสต์เซลล์การติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งพบว่า รูปแบบการติดสีมี 3 แบบคือ แบบที่ I เป็นแบบ Perimembrane pattern แบบที่ II เป็นรูปแบบ Paranuclear pattern และแบบที่ III เป็นรูปแบบ Diffuse pattern ซึ่งรูปแบบการติดสีดังกล่าวจะมีลักษณะสอดคล้องกับรูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) จากวิธีอิมมูโนโนไซโตเคมี ผลการศึกษากการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วยวิธี PCR จากเซลล์มะเร็ง พบว่าลักษณะของแถบดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ นั้นจะมีลักษณะตรงกับที่พบในรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อของมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้รายงานมาก่อน และพบว่าการกลายพันธุ์พบเฉพาะมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II และ เกรด III ไม่พบในเกรด I อาการทางคลินิก ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิกทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือด ไม่สัมพันธ์กับกับเกรดของก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อประโยชน์ทางคลินิกควรให้ติดตามผลการศึกษาในสัตว์ป่วยอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยทางคลินิก จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาควรเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น ความร่วมมือจากเจ้าของสำคัญมาก โดยเฉพาะในรายที่พบการกลายพันธุ์ การตอบสนองต่อการรักษา และการเกิดเนื้องอกขึ้นอีก การวางแผนในการรักษา รวมทั้งการอยู่รอดของสัตว์
2. เทคนิคและจำนวนเซลล์สำคัญมาก ควรใช้เซลล์สดเท่านั้น คุณภาพของเซลล์ที่เก็บมีผลต่อการสกัด และวิธี PCR
3. การพัฒนาวิธีคัดกรองเซลล์มะเร็งที่เก็บได้ให้มีความบริสุทธิ์ จะทำให้ผลการศึกษากการแสดงออกของอองโคจีนชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- อัจฉริยา ไสละสูต 2006 (2549) เซลล์วิทยาวินิจฉัย ใน พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์ ห้าง
หุ้นส่วนจำกัดปอຍท์กราฟฟิค จำนวน 230 หน้า
- Arber, P.A., Tamayo, R. and Weiss, L.M. 1998. Parafin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum. Pathol.* 29(5): 498-504.
- Baker-Gabb, M., Hunt, G.B., France, M.P., 2003. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. *Aus. Vet. Journal.* 81: 732-8.
- Bettini, G., Morini, M. and Marcato, P.S. 2003. Gastrointestinal Spindle Cell Tumor of the Dog: Histological and Immunohistochem Study. *Journal of Comparative Pathology.* 129 (4): 283-293.
- Cameron L, et al. 2004. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis. *J Vet Diagn Invest.* Vol. 16: 95-100.
- Dobson J.M. and Scase T. J. 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice.* Vol. 48: 424-431.
- Downing, S., Chien, M.B., Kaas, P.H., Moore, P.E., London, C.A. 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1718-1723.
- Fosmire, S.P., Dickerson, F.B., Scott, A.M., Bianco, S.R., Pettengil, M.J., Meylemans, H., Padilla, M., Frazer-Abel, A.A., Helfland, S.C. and Modiano, J.F. 2004. Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Lab. Invest.* 84(5): 562-572.
- Gil da Costa, R.M., Matos E., Rema. A., Lopes. C., Pires, M.A., Gartner F. 2007. CD117 immunoexpression in canine mast cell tumor: correlation with pathological variables and proliferation markers. *B.M.C. Vet. Res.* 3:19.
- Govier, S.M., 2003. Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* 18: 103-6.
- Kuipel, M., Webster, J.D., Kaneene, B., Miller, R., Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The Use of *KIT* and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet. Pathol.* 41:371-377.

- Kubo, K., Katayama, K., Yonezama, K., Kotani, T., Ohashi, F., Matsuyama, S., Tsutsumi, C., Shimada, T., Sakuma, S. and Takamori, Y. 1998. Frequent expression of the *c-kit* proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *Journal of Veterinary Science*. 60 (12): 1335-1340.
- London, C.A., Kissenberth, W.C., Galli, S.J., Geissler, E.N., Helfand, S.C. 1996. Expression of stem cell factor receptor (*c-kit*) by malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *J. Comp .Pathol*. 113: 399-414.
- London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z.Q., Helfand, S.C., Geissler, E.N. 1999. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. *Exp. Hematol*. 27: 689–697.
- London, C.A., Hannah, A.L., Zadovskaya, R., Chien, M.B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D.B., McMahon, G. and Cherrington, J.M. 2003. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin. Cancer. Res*. 9: 2755–2768.
- London, C.A., Malpas, P.B., Wood-Follis, S.L., Boucher, J.F., Rusk, A.W., Rosenberg, M.P., Henry, C.J., Mitchener, K.L., Klein, M.K., Hintermeister, J.G., Bergman, P.J., Couto, G.C., Mauldin, G.N. and Michels, G.M. 2009. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin. Cancer. Res*. 15 (11): 3856-3865.
- London, C.A. 2009. Tyrosine kinase inhibitors in veterinary medicine. *Top. Companion. Anim. Med*. 24 (3): 106-112.
- Loplamlert, N, Kanjanachinto, C, Kultrailak, S., Wagnaitam, S., Ketpun, D., and Sailasuta, A. 2010. A comparative study on *c-kit* expression and standard histopathology on grading of canine cutaneous mast cell tumor, *Proceedings the 36th International Conference on Veterinary Science 2010*, Impact Challenger Hall, Kuang thong thani, Nonthaburi, Thailand 2-5 November 2010, p. 140
- Ma Y, et al. 1999. Clustering of activating mutations in *c-kit*'s juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *The journal of investigative dermatology*. Vol. 112(2): 165-170.

- Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R. and Mandrioli, L. 2004. c-kit Gene product (CD 117) immunoreactivity I Canine and Feline Paraffin Sections (Brief report). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 52(5): 705-708.
- Owen, S.D. 1980. TNM classification of Tumor in Domestic Animals. World Health Organisation, Geneva.
- Patnaik A.K, Ehler W.J, MacEwen E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. Vol. 21(5): 469-74.
- Prihirunkij K, Srisampan, S., and Bunnuang, U. 2007. Diagnosis of mast cell leukemia in a dog using MAPSS™ flow cytometry combined with toluidine blue. *Journal of the Thai Veterinary Medical Association Under the Royal Patronage*. Vol. 57(3): 64-72.
- Pryer K.N, Lee, L.B., Zadovaskaya, R., Yu, X., Sukbuntherng, J., Cherrington, J.M., and London, C.A. 2003. Proof of Target for SU11654: Inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clini Cancer Res*. Vol. 9: 5729–5734.
- Reguera, M.J., Ferrer, L., and Rabanal, R.M., 2002. Evaluation of intron deletion in the *c-KIT* gene of canine mast cell tumors. *Am. J. Vet. Res*. 63:1257-1261.
- Riva, F., Brizzola, S., Stefanello, D., Crema, S and Turin, L. 2005. A study of mutation in the *c-kit* gene of 32 dogs with mastocytoma. *J. Vet. Diagn. Invest*. 17(4): 385-388.
- Rothwell, T.L., Howlett, C.R., Middleton, D.J., Griffiths, D.A., Duff, B.C. 1987. Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Aus. Vet. Journal*. 64: 161–4.
- Simose, J.P. Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of three methods. *Vet. Pathol*. 31: 637-647.
- Thamm D. H. and Vail D.M. 2007. Mast cell tumors. In: *Withrow and MacEwen's Small animal clinical oncology*. Stephen Withrow and David M. Vail (ed.) St Louis, Missouri, US: Elsevier. 402-424.
- Turin, L., Acocella, F., Stefanello, D., Oseliero, A., Fondrini, D., Brizzola, S. and Riva, F. 2006. Expression of *c-kit* proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest*. 18: 343–349.
- Webster, J.D., Kiupel, M., Kaneene, J.B., Miller, R. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol*. 41: 371–377.

- Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J.B., Miller, R., Resau, J.H. and Kiupel, M. 2006. The role of *c-kit* in tumorigenesis: Evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 8 (2): 104-111.
- Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R.A., Kaneene, J.B. and Kiupel, M. 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with *c-kit* and its role in prognostication. *Vet. Pathol.* 44: 298-308.
- Yancey, M.F, Merritt, D.A., Lesman, S.P., Boucher, J.f., and Micheals, G.M. 2009. Pharmacokinetic properties of toceranib phosphate (PalladiaTM, SU11654), a novel tyrosine kinase inhibitor, in laboratory dogs and dogs with mast cell tumors. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* Vol. 33: 162-171.
- Zemke, D., Yamini, B., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2001. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. *J Vet Diagn Invest* 13: 341-345.
- Zemke, D., Yamini, B., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2002. Mutations in the Juxtamembrane Domain of *c-kit* are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol.* Vol. 39: 529-535.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงประวัติสุนัขป่วยด้วยเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา (n=30)

สุนัข	อายุ (ปี)	เพศ	พันธุ์	ตำแหน่ง	จำแนกเกรดทาง จุดพยาธิวิทยา	ระดับอาการทางคลินิก ของเนื้องอก	RBC($\times 10^6$)	Hct(%)	Platelet($\times 10^6$)	WBC	Neu.	Band	Eosinophil	Lymphocyte	Monocyte	SGPT	ALP	BUN	CREATININE	Blood parasite
1	10	ผู้	Pug	Skin	I	I	3.1	20	232	21900				6	9	24	77	11	0.7	Microfilaria
2	14	ผู้	Thai	Abdomen	I	I	3.7	42	79	11400	80	2	3	13	2	28	51	12	0.9	ไม่พบ
3	ไม่ทราบ	เมีย	GR	Back	I	III	4.2	45	160	13800	84	2	4	7	3	25	40	38	1	ไม่พบ
4	12	ผู้	mixed	Lt.scrotum	I	I	6.7	49	278	20300	83	3	3	7	4	34	32	20	1.1	ไม่พบ
5	6	ผู้	unk	Ventral abdomen	I	I	7	50	87	7800	80	1		15	4	15	70	18	1.3	ไม่พบ
6	ไม่ทราบ	ผู้	mixed	Mass at right leg.	I	II	5	40	367	2900	96		1	2	1	23	391	12	1.1	ไม่พบ
7	18	เมีย	mixed	Mammary gl.	I	II	4.3	49	274	16300	80		1	15	4	48	175	24	1.2	ไม่พบ
8	9	ผู้	mixed	Skin	I	I	7	34	145	12500	83	2	3	8	4	55	455	20	1.6	ไม่พบ
9	ไม่ทราบ	ผู้	Thai	Scrotal sac	I	I	4.8	41	339	8200	77		1	21	1	75	175	18	1.3	ไม่พบ

	ทราบ																			
10	>5	เม็ช	mixed	Lt. arm	I	I	5.6	40	298	19800	82	2	2	5	9	29	263	19	1.4	ไม่พบ
11	10	เม็ช	GR	Skin	II	I	6.3	39	165	24200	64	1	5	22	8	72	393	12	1.1	ไม่พบ
12	10	เม็ช	mixed	Abdomen, lt. hind limb	II	II	5.6	50	191	8500	76			19	5	49	250	22	0.7	ไม่พบ
13	ไม่ ทราบ	เม็ช	unk	Lt. flank	II	III	6.8	39	187	10100	80	2	9	5	4	20	94	6	1.1	ไม่พบ
14	10	ผู้	mixed	Skin	II	I	5.5	38	130	14800	80			16	4	30	106	11	1.3	ไม่พบ
15	11	ผู้	Basset hound	Skin	II	I	6.3	39	360	16100	70	1	1	25	3	28	274	15	0.8	ไม่พบ
16	16	ผู้	Shih tzu	Prescapula r	II	I	6	34	412	18400	81	11	4	2	2	26	154	7	0.6	ไม่พบ
17	12	ผู้	Chihuah ua	3 rd digit	II	II	4.4	59	340	27100	71	9		14	6	211	110 1	49	1.4	ไม่พบ
18	10	ผู้	mixed	Skin at dorsal part of rt. Flank	II	I	8	46	362	16400	85	3	5	4	3	59	78	8	0.9	ไม่พบ
19	ไม่ ทราบ	เม็ช	Bang Kaew	Rt. Hock jt.	II	I	6.9	41	217	8200	82		4	9	5	124	688	8	0.9	ไม่พบ

20	12	เมืง	Shih tzu	Skin	II	I	6.4	26	88	18500	84	4	3	7	2	31	64	18	0.7	ไมพบ
21	12	ผู	mixed	Mass at Rt. upper lip.	III	I	6	43	162	25700				11	9	56	106	15	1.4	ไมพบ
22	ไมทราบ	เมืง	Thai	Median side of Rt.hindlimb	III	I	4.1	34	61	31100	88	4	1	3	4	250	1430	10	0.8	ไมพบ
23	ไมทราบ	เมืง	ไมทราบ	Rt.abdominal	III	I	7.2	27	245	12200	76	3	5	13	3	*	*	*	*	ไมพบ
24	10	เมืง	mixed	Lt.axillary	III	III	6.5	37	278	7800	81		7	10	2	41	60	14	1	ไมพบ
25	4	ผู	ไมทราบ	Skin	III	I	5.3	45	404	11500	75	2	13	7	3	19	85	19	1.2	ไมพบ
26	ไมทราบ	ผู	Thai	Rt.cervical	III	I	6.7	41	366	10000						35	87	8	1	*
27	7	ผู	Cocker	Rt.elbow	III	I	6.3	35	446	78900	60	23	3	5	9	68	393	18	1	ไมพบ
28	10	ผู	Mixed	Popliteal ln.	III	II	4.5	27	435	58300	50	20	3	22	5	51	560	22	1	ไมพบ
29	8	ผู	Shih tzu	Rt.hock jt.	III	I	6.9	50	216	10500	77		5	16	2	57	263	39	2	ไมพบ
30	10	ผู	Shih tzu	Lt.hock jt.	III	I	5	34	176	19300	75		2	20	3	48	283	10	1.3	ไมพบ

I = มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I II = มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II III = มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด III

I = ระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอกระดับที่ 1 II = ระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอกระดับ 2 III = ระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอกระดับ 3

ภาคผนวก ข

ผลงานวิจัยที่ได้นำเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ จำนวน 4 เรื่อง

1. Theerawatanasirikul, S., Teewasutrakul, P., Rangsipipat, A., Wangnaithum, S., and **Sailasuta, A.** 2009. The prognostic value of kit expression on canine mast cell tumors by immunocytochemistry. In the Proceedings of the 2nd Federation of Asian Small Animal Veterianary Association Congress 2009 and Veterinary Medicine & Livestock Development Animal Conference 2009, Bangkok, Thailand, 3-5 Nov. 2009.
2. Sirin Theerawatanasirikul, **Achariya Sailasuta**, Supradit Wangnaitham, Anudep Rangsipipat tharakrit Teewasutrakul. 2010 C-KIT Immunocytochemistry on canine cutaneous mast cell tumor: A case report In the Proceedings of VPAT Regional Veterinary Congress 2010, Bangkok, Thailand, 25-28 April, 2010. P. 44
3. Ketpun, D., Lacharoje, S., Theewasutrakul, A., Rungsipipat, A., Piyawiriyakul, P., **Sailasuta, A.** 2010. Development of *c-kit* Expression from Canune Cutaneous Mast Cell tumors FNA –Cells by PCR. In the Proceedings the 36th International Conference on Veterinary Science 2010, Impact Challenger Hall, Muang thong thani, Nonthaburi, Thailand 2-5 November 2010, p. 139
4. Loplamlert, N, Kanjanachinto, C, Kultrailak, S., Wagnaitham, S., Ketpun, D., and **Sailasuta, A.** 2010. A comparative study on c-kit expression and standard histopathology on grading of canine cutaneous mast cell tumor. In the Proceedings the 36th International Conference on Veterinary Science 2010, Impact Challenger Hall, Kuang thong thani, Nonthaburi, Thailand 2-5 November 2010, p. 140