บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้องอกมาสต์เซลล์ (Mast cell tumor)

เนื้องอกมาสต์เซลล์ (Mast Cell Tumor: MCT) จัดอยู่ในกลุ่มเนื้องอกชนิดเซลล์รูปร่างกลมนิวเคลียสมีรูปร่างกลมถึงรี ขอบเขตไซโตพลาสมที่ชัดเจน ภายในมีแกรนูลซึ่งสามารถย้อมติดสี Toluidine blue Giemsa และ Methylene blue

มาสต์เซลล์มีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูก จากนั้นเคลื่อนย้ายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะระบบที่มีการสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม เช่น ผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร โดยปกตินั้นไม่สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือด ภายในไซโตพลาสมที่บรรจุแกรนูล เมื่อเกิดการกระตุ้นให้เกิดภาวะการหลั่งสารในแกรนูล (degranulation) จะมีการหลั่งสารประกอบต่างๆออกมา เช่น histamine heparin protease และ cytokine ต่างๆ เช่น tumor necrosis factor-α , Interleukin (IL)-3 , IL-4 , IL-5 และ IL-6 ซึ่งสารเหล่านี้ส่งผลให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว กล้ามเนื้อเรียบเกิดการหดตัว ก่ออาการทางคลินิก คือ เกิดอาการบวมน้ำ คัน โดยเฉพาะที่บริเวณก้อนเนื้องอก การแข็งตัวของเลือดผิดปกติ และเกิดการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดอิโอซิโนฟิลให้มาสะสมที่บริเวณก้อนเนื้องอก (Gieger et al., 2005; London and Seguin, 2003) และยังพบว่าการเกิดเนื้องอกมาสต์เซลล์ ส่งผลให้เกิดแผลหลุมในทางเดินอาหาร กลไกการเกิดแผลหลุมนั้น เกิดจากระดับความเข้มข้นของระดับฮีสตามีนที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือด ส่งผลกระตุ้น H2 receptor ส่งผลให้ parietal cell มีการหลั่งกรดเกลือเพิ่มขึ้นและการเคลื่อนไหวบีบตัวของระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นด้วย (Fox et al., 1990) การแข็งตัวของเลือดผิดปกตินั้นมาจากการหลั่งสาร heparin ส่วนการหลั่งฮีสตามีนและโปรตีเอสยังขัดขวางกระบวนการหายของแผลทำให้แผลหายช้า (Gieger et al., 2005)

เนื้องอกมาสต์เซลล์ เป็นเนื้องอกที่ผิวหนังที่พบบ่อยในสุนัข มักพบในสุนัขที่อายุมาก อายุเฉลี่ย 8-9 ปี พันธุ์ที่มีโอกาสเกิดโรคบ่อย คือ Boxer, Boston terrier, Bull terrier, Staffordshire, Fox terrier, Labrador retriever, Golden retriever, Bulldog, Cocker spaniel, Schnauzer, Dachshund, Beagle, Pug และ Sharpeis และยังไม่มีรายงานถึงความแตกต่างระหว่างเพศในการเกิดโรค (Morrison and Dobson, 2001) สำหรับในประเทศไทยสามารถพบในสุนัขพันธุ์ไทยและพันธุ์ผสมร่วมด้วย (อนุเทพและคณะ , 2546)

สาเหตุของการเกิดโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เนื่องจากมักพบเนื้องอกที่ผิวหนัง จึงอาจมีความเกี่ยวข้องกับการสัมผัสสิ่งที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และเป็นที่น่าสังเกตว่าสุนัขพันธุ์ Bulldog มีอุบัติการณ์สูงจึงอาจมีความเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม (London and Seguin, 2003; Morrison, 2002)

เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่พบบ่อย มักมีลักษณะกลมเป็นก้อนเดี่ยวมากกว่าหลายก้อนรวมกัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 3 ซม. มีลักษณะเนื้อแน่นและนูนขึ้น มีขอบเขตที่ชัดเจน อาจพบร่วมกับลักษณะผื่นแดง แผลหลุม และพบขนร่วงร่วมด้วย ในบางรายอาจพบเนื้องอกมีการขยายขนาดใหญ่ถึง 30 ซม. และพบการอักเสบร่วมด้วย ส่วนใหญ่มักพบเนื้องอกที่ส่วนท้ายของลำตัว โดยเฉพาะในส่วนของลำตัว และบริเวณรอบอวัยวะเพศ พบร้อยละ 50 ส่วนขาพบร้อยละ 40 และส่วนหัวและคอพบร้อยละ10 โดยส่วนใหญ่มักพบมีการรายงานการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงถึงร้อยละ 76 และมีการแพร่กระจายไปยังกระแสเลือดค่อนข้างน้อย

เนื้องอกมาสต์เซลล์นั้นส่งผลทำให้เกิดอาการทางคลินิก คือ อาจพบเพียงอาการคันเฉพาะที่หรือรุนแรงถึงมีอาการซึม อาเจียน ท้องเสีย อุจจาระมีสีดำ ปวดท้อง และเกิดภาวะเลือดจาง ซึ่งพบว่าสัตว์ป่วยมากกว่าร้อยละ 50 มักแสดงอาการทางคลินิกร่วมด้วย ส่วนการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นนั้น พบว่ามาสต์เซลล์มีการแพร่กระจายผ่านทางหลอดน้ำเหลือง ไปสู่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงและอวัยวะภายในอื่นๆ ได้แก่ ม้าม ตับ และไขกระดูก (Morrison, 2002)

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา (cytological diagnosis)

การตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา ด้วยวิธี fine needle aspiration (FNA) เพื่อระบุว่าเป็น MCT ซึ่งมีรูปร่างกลม มีขอบเขตเซลล์ที่ชัดเจน นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์และมีรูปร่างกลมถึงรี และสามารถพบแกรนูลภายในไซโตพลาสม แต่ในบางครั้งการย้อมด้วยวิธี Diff-Quick อาจมองไม่เห็นแกรนูล จึงควรย้อมด้วยสีพิเศษ เช่น toluidine blue pH 3.5 หรือ Giemsa เพื่อการวินิจแยกแยะจากเซลล์เนื้องอกชนิดกลมชนิดอื่นๆ เช่น lymphoma, plasmacytoma, histiocytoma, amelanotic melanoma และ transmissible venereal tumor (London and Sequin, 2003) (ภาพที่ 1)

มีรายงานการนำสีย้อมชนิดต่างๆ มาใช้ในการวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์ เช่น alcian blue pH 2.5, safranin O, Unna's method, Luna's method, Torren's method, periodic acid–Schiff (PAS) และ chloroacetate esterase โดยอาศัยหลักการติดสีจากปฏิกริยาของสารเคมีต่างๆที่อยู่ภายในแกรนูล ของมาสต์เซลล์ เช่น biogenic amine และ heparin กับสีย้อมต่างๆ ซึ่งจะให้ผลต่อการวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่แตกต่างกัน (Luna, 1968; Simoes and Schoning, 1994; Bancroft and Stevens, 1996)

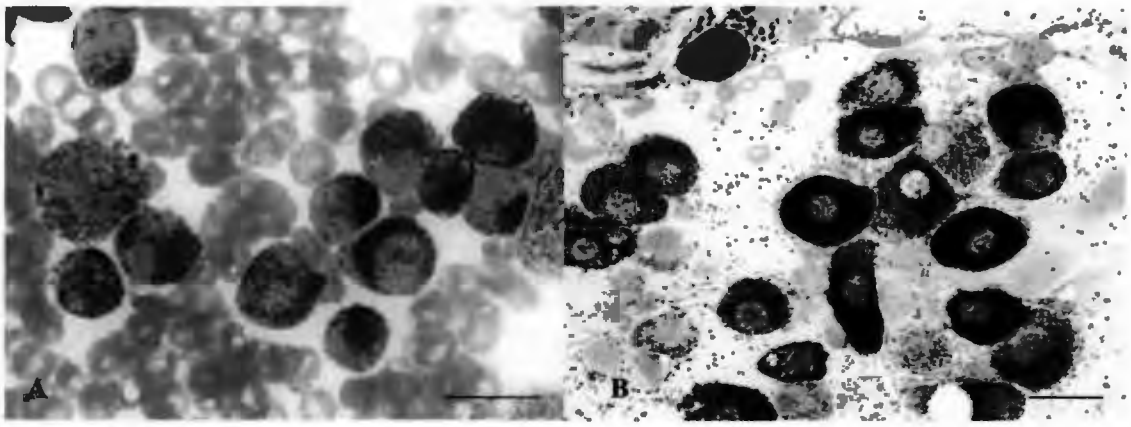
การตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological diagnosis)

โดยการทำ punch biopsy หรือ จากก้อนเนื้อที่ผ่าตัดรักษา เพื่อทราบถึงระดับความรุนแรง ซึ่งมีการจัดระบบการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา โดยมีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อให้ง่ายต่อการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคอันนำไปสู่แนวทางการรักษาที่เหมาะสมกับตัวสุนัขมากที่สุด พบว่ามะเร็งที่จำแนกในเกรดสูงจะมีความร้ายแรงมากกว่าเกรดต่ำดังนี้ (Patnaik et al., 1984) (ภาพที่ 2)

เกรด 1 (well differentiated grade) พบเป็นร้อยละ 30-35 ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทั้งหมด (London and Seguin, 2003) มาสต์เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นแถวหรือกลุ่มเล็กๆ และมีเส้นใยคอลลาเจนแทรกตัวระหว่างแถว เซลล์มีลักษณะกลมและ monomorphic ขอบเขตไซโตพลาสมชัดเจน ภายในไซโตพลาสมพบแกรนูล ไม่พบนิวคลิโอลัสและเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว (mitotic cell) นอกจากนี้ยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดอิโอซิโนฟิล ซึ่งเป็นระดับที่ไม่รุนแรง

เกรด 2 (intermediate differentiated grade) พบเป็นร้อยละ 25-40 ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทั้งหมด (London and Seguin, 2003) จำนวนมาสต์เซลล์เพิ่มมากขึ้น รูปร่างของเซลล์มีความหลากหลาย (pleomorphic) เพิ่มขึ้น เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรีภายใน 1 เซลล์อาจพบ 2 นิวเคลียส อาจพบ fibrovascular stroma และพบ mitotic cell 0-4 เซลล์/HPF ซึ่งเกรดนี้สามารถพบมีการระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง และมีโอกาสแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและไปทั่วร่างกายได้ และมีรายงานระยะเวลาการรอดชีวิต ภายหลังการผ่าตัดเฉลี่ย 28 สัปดาห์

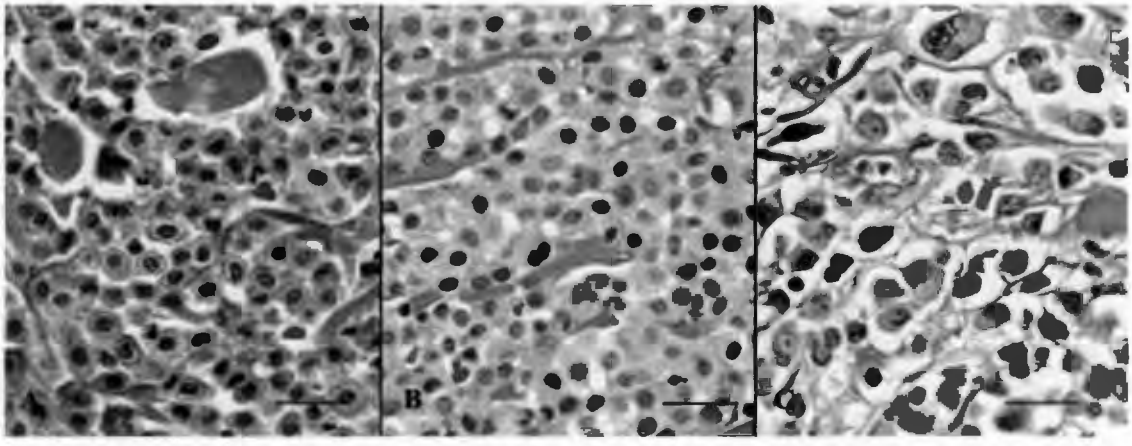
เกรด 3 (poorly differentiated grade) พบเป็นร้อยละ 20-40 ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทั้งหมด (London and Seguin, 2003) มาสต์เซลล์มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน (highly pleomorphism) ขอบเขตของไซโตพลาสมไม่ชัดเจนและมักไม่พบแกรนูลภายในไซโตพลาสม พบนิวคลิโอลัสเด่นชัดมี mitotic cell 4-8 เซลล์/HPF และมักพบเนื้อตายภายในก้อนเนื้องอก ซึ่งเกรดนี้มีความรุนแรงมาก มักพบการแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและไปทั่วร่างกายได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเกิดโรค และมีรายงานระยะเวลาการรอดชีวิต ภายหลังการผ่าตัดเฉลี่ย 18 สัปดาห์



ภาพที่ 1 ภาพทางเซลล์วิทยาของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ (bar = 10 μm)

A **ภาพทางเซลล์วิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีม่วงภายในไซโตพลาสม,** Giemsa

B **ภาพทางเซลล์วิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีม่วงภายในไซโตพลาสม,** Toluidine blue



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์, H&E (bar = 25 μm)

A **แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์** เกรด I (well differentiated grade)

B **แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์** เกรด II (intermediate differentiated grade)

C **แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์** เกรด III (poorly differentiated grade)

การประเมินระยะของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางคลินิก (Clinical staging)

เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ สามารถตรวจลักษณะทางกายภาพ เพื่อให้ทราบถึง ตำแหน่งเนื้องอก รูปร่าง ขนาด และการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองตามระบบ The tumor node metastasis (TNM) system ตามวิธีของ World Health Organization (WHO) (Withrow and McEwen, 1989) โดยการประเมินระยะของเนื้องอกทางคลินิก (clinical staging system) ดังนี้

ระยะที่ I พบก้อนเนื้องอกบริเวณผิวหนังเพียง 1 แห่งและไม่พบการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง

Ia ตรวจไม่พบอาการทางคลินิก

Ib ตรวจพบอาการทางคลินิก

ระยะที่ II พบก้อนเนื้องอกบริเวณผิวหนังเพียง 1 แห่ง และพบการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง

IIa ตรวจไม่พบอาการทางคลินิก

IIb ตรวจพบอาการทางคลินิก

ระยะที่ III พบก้อนเนื้องอกบริเวณผิวหนังหลายแห่ง หรือพบก้อนเนื้องอกขนาดใหญ่แทรกลึกถึงชั้นใต้ผิวหนังและมีหรือไม่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง

IIIa ตรวจไม่พบอาการทางคลินิก

IIIb ตรวจพบอาการทางคลินิก

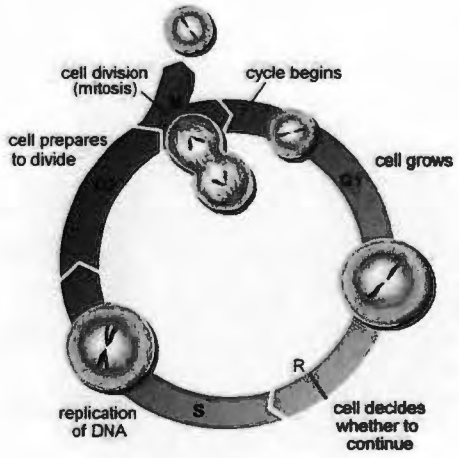
ระยะที่ IV พบก้อนเนื้องอกหลายบริเวณ พบการแพร่กระจายหรืองอกขึ้นใหม่ในบริเวณอื่นพร้อมกับการแพร่กระจาย (พบการแพร่กระจายไปยังกระแสเลือดหรือไขกระดูก)

IVa ตรวจไม่พบอาการทางคลินิก

IVb ตรวจพบอาการทางคลินิก

ดัชนีงอกขยาย (proliferative index)

ดัชนีงอกขยาย คือ ค่าเฉลี่ยของตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ และการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นของเซลล์เนื้องอก ซึ่งได้จากการตรวจด้วยวิธีย้อมสีพิเศษ เช่น วิธีฮิสโตเคมี และวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี ประกอบด้วย Argyrophilic Nucleolar organizer regions (AgNORs) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความเร็วในการแบ่งตัวแบบ mitosis (Kravis et al., 1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) เป็นโปรตีนที่พบมากในวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) เกือบทุกระยะ ยกเว้นระยะพัก (resting phase) Ki-67 เป็นโปรตีนที่พบมากในวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) เกือบทุกระยะเช่นกัน แต่เป็นโปรตีนที่มีค่าครึ่งชีวิตที่ค่อนข้างสั้น ทำให้ตรวจพบได้น้อย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงวัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs)

AgNORs คือ loop ของ DNA ในนิวคลิโอลัส ประกอบด้วย nucleolin ฟอสโฟไลปิดขนาดโมเลกุล 105 kD ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการคัดลอก (transcription) ribosomal RNA และ ฟอสโฟไลปิดขนาดโมเลกุลขนาด 38-39 kD รวมถึง sub-unit ของ RNA polymerase I กระบวนการสังเคราะห์ rRNA จะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่มีโปรตีนเหล่านี้ และจากการย้อมสีฮิสโตเคมี จะทำให้สามารถตรวจพบ AgNORs ได้เป็นจุดสีดำในนิวคลิโอลัส เกิดจากการที่ silver nitrate เข้าไปจับกับ nucleolar organizer regions (NORs) ที่อยู่บน acrocentric chromosomes จำนวนและขนาดของ AgNORs ที่อยู่ในแต่ละนิวคลีโอลัสจะแตกต่างกันไป ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดการคัดลอกสายของ rRNA ในเซลล์ที่มี ribosome biogenesis ในระดับต่ำ โดยพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของ nucleolin และ nucleoplasmin จากระยะต้น G1 phase และเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะ S phase และคงอยู่ในระดับสูงจนถึงในระยะท้าย G2 phase (Sirri et al., 2000) การนับจำนวน AgNORs โดยนับจำนวนจุดที่มีการติดสีของสารซิลเวอร์ไนเตรท ภายในนิวเคลียส จำนวน 100 เซลล์ แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยต่อหนึ่งเซลล์

มีการรายงานการนำค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs มาใช้เป็นตัวแปรในการพยากรณ์โรคของเนื้องอก lymphoma ในสุนัข โดยพบว่าค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs ที่สูงขึ้นนั้นสัมพันธ์กับระยะเวลาการมีชีวิตของสัตว์ที่สั้นลง (Kiupel et al., 1999) และมีรายงานการนำมาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกมาสต์เซลล์ด้วย โดยพบว่าปริมาณ AgNORs ที่พบนั้นสัมพันธ์กับระดับเกรดของเนื้องอกมาสต์เซลล์ ปริมาณดัชนี AgNORs ที่สูงมากขึ้น มีความสัมพันธ์กับจำนวนวันที่สัตว์มีชีวิตที่สั้นลง ค่าดัชนี

AgNORs ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตามระดับทางลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histological grade) โดยค่าดัชนี AgNORs สูงขึ้นเมื่อระดับทางลักษณะทางจุลพยาธิวิทยามีความรุนแรงมากขึ้น (สาโรชและคณะ, 2001; Gieger et al., 2005; Kravis et al., 1996)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

PCNA เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น auxillary protein ของ DNA polymerase-δ ช่วยในการสังเคราะห์และซ่อมแซม DNA โดยจะมีการสังเคราะห์ PCNA เพิ่มมากขึ้นในระยะ S phase ซึ่งเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (proliferative stage) PCNA นี้ตรวจพบได้โดยอาศัยการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PCNA สาโรชและคณะ (2001) รายงานค่าดัชนี AgNORs และ PCNA มีแนวโน้มแปรผันตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ โดยจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเนื้องอกมีความร้ายแรง (malignancy) เพิ่มขึ้น จึงสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ได้ (Abadie et al., 1999) และมีการศึกษาตัวแปรในการพยากรณ์โรค ทั้ง 3 ชนิด คือ การจำแนกเกรดตามลักษณะทางจุลพยาธิ ดัชนี PCNA และ AgNORs พบว่าการใช้ตัวแปรทั้ง 3 ชนิดร่วมกันนั้นให้ประโยชน์ในการพยากรณ์ ได้มากถึงร้อยละ 80 ของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข และมากกว่าการใช้ตัวแปรชนิดเดียวในการพยากรณ์โรค (Simoes et al., 1994)

Ki-67

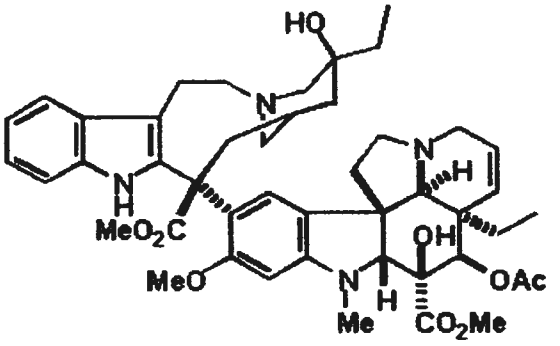
Ki-67 เป็นโปรตีนในนิวเคลียส ที่มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 2 protein subunit คือ 345 kD และ 395 kD ซึ่งสามารถพบได้ในเกือบทุกระยะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์ คือระยะ G1 S G2 และระยะ mitosis แต่จะไม่พบในระยะพัก (resting phase: G0) สำหรับหน้าที่ของ Ki-67 นั้นยังไม่มีการรายงานเป็นที่แน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะมีส่วนร่วมในการคัดลอก RNA ที่อยู่ภายในนิวเคลียส มีรายงานในเนื้องอกเต้านมในคนพบว่า ค่าดัชนี Ki-67 ที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะการแบ่งตัวของเซลล์ mitotic index และระดับเกรดของมะเร็งที่สูงขึ้นด้วย สำหรับในสัตว์ได้มีการนำค่าดัชนี Ki-67 มาใช้เป็น proliferative marker ในการพยากรณ์เนื้องอกหลายชนิด (Zacchetti et al., 2003) รายงานในเนื้องอกชนิดเมลาโนมาในสุนัขและแมว พบว่าค่าดัชนี Ki-67 ใช้เป็นตัวแปรในการพยากรณ์โรคที่แม่นยำกว่า PCNA (Roels et al.,1999) และในมะเร็งเต้านมของสุนัข พบว่าค่าดัชนี Ki-67 จากการตรวจทางเซลล์วิทยาให้ผลในการประเมินที่ใกล้เคียงกับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (Zuccari et al., 2004) สำหรับการศึกษาในเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัขนั้น ค่าดัชนี Ki-67 สามารถนำมาใช้ใน

เป็นตัวแปรร่วมในการพยากรณ์โรคได้เช่นเดียวกับดัชนี PCNA และ AgNORs (Abadie et al.,1999; Sakai et al., 2002)

การรักษาเนื้องอกมาสต์เซลล์

การรักษาเนื้องอกมาสต์เซลล์สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการศัลยกรรม (wide surgical excision) ศัลยกรรมเยือกแข็ง (cryosurgery) ศัลยกรรมโดยการใช้ไฟฟ้า การใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) การฉายรังสี (radiation therapy) การรักษาทางภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) (Fan and Lorimier, 2005; Goivier, 2003; Scott et al., 1995) แต่จะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับผลการพยากรณ์โรคซึ่งจะพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัย โดยเฉพาะระดับความรุนแรงของมะเร็งตามลักษณะที่พบและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา สำหรับปัจจัยสำคัญที่สุดที่ต้องพิจารณาคือ สภาพของสัตว์ ซึ่งมักใช้ในการตัดสินใจเลือกวิธีการรักษา โดยในบางครั้งอาจไม่มีวิธีการใด ๆ ที่เหมาะสมในการรักษา (Baker and Thomsett, 1990)

Vinblastine sulfate เป็นยาต้านมะเร็งที่สกัดจากพืช Periwinkle (*Vinca rosea L.*) จัดอยู่ในกลุ่ม antimicrotubule agent (spindle poison) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วย Vincristine sulfate และ Vinblastine sulfate กลไกการทำงานของยาจะมีความจำเพาะต่อเซลล์ ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวแบบ mitosis ของเซลล์ (M-phase specific) Vinca alkaloid ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวนำที่ใช้พลังงาน จากนั้นจะจับกับ tubulin อย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้ tubulin dimer ไม่สามารถรวมตัวกันเป็น microtubule ได้ ทำให้มีการสร้าง microtubule ลดลง จากนั้น tubulin dimer ที่ถูกจับด้วย Vinca alkaloid จะรวมตัวกันเป็น paracrystalline จนถึงระดับสมดุล เป็นผลทำให้ microtubule เกิดการหดตัว ซึ่ง microtubule มีความสำคัญในการรักษาโครงสร้างของเซลล์ โดยทำหน้าที่คล้ายท่อลำเลียงสารละลายต่าง ๆ และสารสื่อประสาท รวมทั้งการหลั่งฮอร์โมนบางชนิด เช่น อินซูลินและธัยรอยด์ฮอร์โมน และยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นใยโปรตีน mitotic spindle การที่โครโมโซมไม่สามารถแยกตัวออกจากกันเป็นผลทำให้เซลล์เสียหาย นอกจากนี้ยายังขัดขวางการทำงานของ amino acid metabolism โดยไปยับยั้งการสร้าง glutamic acid, purine, citric acid cycle และ urea formation ยามีการดูดซึมโดยสามารถจับกับโปรตีนในกระแสเลือดสูงถึงร้อยละ 75 และส่วนใหญ่มักให้ยาทางหลอดเลือดดำ ตัวยาจะกระจายไปสู่เนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่จะถูกขับออกทางน้ำดี โดยขบวนการเมตาบอลิสมของตับและน้ำดีร่วมกัน (Rosenthal,1981)



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ Vinblastine sulfate

พบรายงานการนำ Vinblastine sulfate มาใช้ในการรักษามะเร็งในระบบเลือดและน้ำเหลืองในคน ได้แก่ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma หรือ Hodgkin's disease) Kaposi's sarcoma มะเร็งเต้านม มะเร็งอัณฑะและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Rowinsky and Donehower., 1997; Golden and Langston, 1988; Theilen and Madewell, 1987) สำหรับเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข ได้มีรายงานการรักษาโดยใช้ Vincristine ขนาด 0.75 มก./ตร.ม. ทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ ให้ผลในระดับ partial response ร้อยละ 7 (2/27) และเกิดความเป็นพิษจากยาร้อยละ 32 (9/27) (McCaw et al., 1997) มีรายงานการรักษาเนื้องอกมาสต์เซลล์ด้วย Lomustine โดยให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาโดยรวมคิดเป็นร้อยละ 42 ให้ผลในระดับ partial response (7/23) และระดับ complete response (1/23) (Northrup et al., 2004) และมีรายงานการรักษาด้วย Lomustine ร่วมกับ Prednisolone ในการรักษาเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่มีการแพร่กระจายไปในระบบทางเดินอาหาร พบว่ามีการตอบสนองระดับ partial response และสุนัขมีระยะเวลาการมีชีวิต คือ 7 เดือน แต่พบว่ามีการเกิดภาวะความเป็นพิษจากยา คือ เกิดภาวะเลือดจางในระดับปานกลาง (Baldi et al., 2006) มีรายงานการใช้ Cyclophosphamide ร่วมกับ Vincristine, Prednisolone และ Hydroxyurea ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาโดยรวมคิดเป็นร้อยละ 60 แบ่งเป็นระดับ partial response (5/15) และ ระดับ complete response (4/15) (Geristen et al., 1998) มีการรายงานการใช้ Vinblastine ร่วมกับ Prednisolone และ Lomustine ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาโดยรวมคิดเป็นร้อยละ 63 แบ่งเป็นระดับ partial response (4/11) และ ระดับ complete response (3/11) (Hershey et al., 2003) และมีการรายงานการใช้ Vinblastine sulfate ในขนาด 2 มก./ตร.ม.ร่วมกับ Prednisolone พบว่าสุนัขตอบสนองดีต่อการรักษาร้อยละ 47 แต่พบอาการข้างเคียงของยาร้อยละ 20 มีค่าเฉลี่ยที่สัตว์มีชีวิต 331 วัน และร้อยละ 45 ของสุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ มีชีวิตรอดนานถึง 1-2 ปี และค่ากลางของระยะในการตอบสนองต่อการรักษาคือ 154 วัน (Thamm et al.,1999) ซึ่งมีการรายงานเพิ่มเติม คือการรักษาด้วย Vinblastine sulfate ในขนาด 2 มก./ตร.ม.ร่วมกับ Prednisolone ภายหลังการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดและ/หรือ การฉายรังสี พบว่าการรักษาด้วยเคมีบำบัดวิธีนี้ให้ผลดีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในราย

ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการแพร่กระจาย (high-risk for metastasis) และพบว่ามีระยะการมีชีวิตนานถึง 3 ปี คิดเป็นร้อยละ 65 (Thamm et al., 2006)

ยา Prednisolone จัดในกลุ่ม glucocorticosteroid สังเคราะห์ ถูกนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งอย่างกว้างขวาง โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอก จากการจับกับโปรตีนตัวรับที่ไซโตพลาสม จับกับโครมาตินในนิวเคลียสและควบคุมการแปลรหัสของจีนที่จำเพาะ (transcription of specific gene) มักได้ผลดีกับมะเร็งเม็ดน้ำเหลืองกลุ่ม leukemia นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ยับยั้งการตอบสนองของเซลล์ในการหลั่งสารไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น platelet activating factor (PAF), tumor necrosis factor (TNF) และ IL-1 มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยลด T-lymphocyte ด้วยการยับยั้ง lymphokinase ยับยั้งการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิล มาโครฟาจ และ โมโนไซต์ ลดการสร้างอินเตอร์เฟียรอน ขบวนการเก็บกิน chemotaxis และส่งผลต่อมาสต์เซลล์ให้มีจำนวนลดลง เนื่องจากกดการสร้างของฮิสตามีน โดยต้องใช้ขนาดยาในระดับสูง จึงควรระวังผลข้างเคียงของยาได้แก่ กล้ามเนื้ออ่อนแรง (steroid induced myopathy) โรคกระดูกพรุน(osteoporosis) การเกิดแผลหลุมในทางเดินอาหาร (gastrointestinal ulceration) ตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) การหายของบาดแผลช้า การเกิด secondary adrenocortical hyperplasia การเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) ภาวะเลือดจางเนื่องจากการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic anemia) และ ภาวะแคลเซียมในกระแสเลือดสูง (hypercalcemia) นอกจากนี้ในระยะสั้น อาจทำให้เกิดอาการกระหายน้ำและปัสสาวะบ่อยได้ (Plumb, 1999)

มีการรายงานการให้ Prednisolone เพียงอย่างเดียว ให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาโดยรวมคิดเป็นร้อยละ 20 แบ่งเป็นระดับ partial response (4/25) และ ระดับ complete response (1/25) (McCaw et al., 1994) และมีการนำมาใช้เป็นยารักษาร่วมกับเคมีบำบัดชนิดอื่น เช่น การให้ Prednisolone ร่วมกับ Vinblastine (Thamm et al., 1999; Thamm et al., 2006) ให้ Prednisolone ร่วมกับ Cyclophosphamide และ Vincristine (Geristen et al., 1998) ให้ Prednisolone ร่วมกับ Vinblastine และ Lomustine (Hershey et al., 2003)

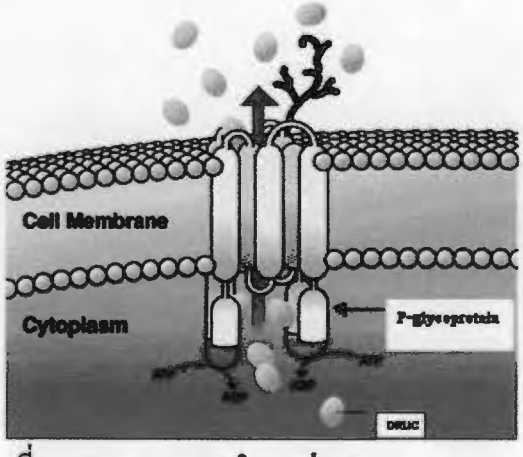
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับฏิกิริยาการต่อต้านยา (multidrug resistant protein)

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการรักษาเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ นั้นทำได้หลายวิธี และถึงแม้วิธีการให้เคมีบำบัดเป็นวิธีที่นิยม แต่พบว่ามีสุนัขจำนวนมากที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งมีปัจจัยสำคัญที่จะช่วยอธิบาย คือ การเกิดปฏิกิริยาการต่อต้านยา (multidrug resistance: MDR) ซึ่งกลไกการเกิดมีหลายแบบ ได้แก่ กลไกที่ทำให้เกิดการลดการสะสมยาภายในเซลล์ (decrease drug accumulation) การเปลี่ยนแปลงกลไกการเมตาบอลิสมของยา(altered drug metabolism) การเปลี่ยนแปลงตัวรับ

ของยา (altered drug targets) การเพิ่มระดับการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลาย (increase DNA damage repair) ซึ่งการเกิดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการต่อต้านยาจัดอยู่ในกลุ่มที่มีกลไกที่ทำให้เกิดการลดการสะสมยาภายในเซลล์ โดยปกติแล้วเป็นโปรตีนที่มีอยู่แล้วภายในเซลล์ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของเซลล์ (self defense mechanism) เพื่อลดการสะสมของสารต่างๆที่อาจเกิดอันตรายต่อเซลล์ แต่ในกรณีที่พบในเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง มักพบในลักษณะที่มีการแสดงออกที่มากเกินไป (over expression) ซึ่งส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดที่ให้ไป ซึ่งมีการรายงานโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Permeability-glycoprotein (PGP) และ multidrug-resistance associated protein (MRP) (Morrison, 2002 ; Bergman, 2003)

P-glycoprotein (PGP)

เป็นผลผลิตที่มาจากจีน MDR1 เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากที่สุด เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาการต่อต้านยา มีขนาดโมเลกุล 170 kD สามารถพบจีนชนิดนี้ได้ทั้งในเซลล์ของสัตว์ แบคทีเรีย ไวรัส แมลง หรือแม้กระทั่งพืช ซึ่ง PGP จัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) transmembrane transporter superfamily ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด ในบางรายงานมีการใช้ชื่อ MDR1 หรือ ABCB1 แทน ชื่อ PGP (Webster and Carstedt-Duke, 2002) โดยมีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านสารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกเซลล์ โดยอาศัยพลังงาน สารต่าง ๆ เหล่านั้นได้แก่ phospholipids, ions, bile acid, polysaccharides, amino acid, organic anions, peptides, steroids รวมถึงยาและเชื้อต่าง ๆ โดย ABC transporter ทำการเกาะจับและ hydrolysis ATP ที่บริเวณ nucleotide binding domains ทำให้ได้พลังงานออกมาเพื่อทำการเคลื่อนย้ายสารต่าง ๆ ผ่านผนังเซลล์ ในเนื้อเยื่อปกตินั้นสามารถพบ PGP ได้ เช่น ต่อมหมวกไต ไต ตับ ลำไส้ รก ปอด ตำแหน่งที่ในเซลล์เยื่อบุ คือ บริเวณ basolateral cellular surface มีรูปร่าง two homologous halve แต่จะพบในระดับที่สูงกว่าปกติในเนื้องอกหรือมะเร็งหลายชนิดและพบที่ตำแหน่งผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็น efflux pump ATP-dependent (Leslie et al., 2005 ; Bergman , 2003) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงแผนภาพตำแหน่งของ P-glycoprotein

Multidrug resistant associated protein (MRP)

Multidrug resistant associated protein (MRP) หรือ ABCC1 เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 190 kD และเป็นผลผลิตของจีน MDR2 จัดอยู่ในกลุ่มโครงสร้างเดียวกับ PGP คือ ATP-binding cassette (ABC) transmembrane transporter superfamily ในเนื้อเยื่อปกติที่สามารถพบ MRP ได้ใน ไซโตพลาสม แต่ MRP ที่พบในเนื้องอกหรือมะเร็งจะพบมากที่บริเวณผิวเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายเป็นตัวที่ขับสารต่างๆออกภายนอกเซลล์ และเนื้อเยื่อปกติที่สามารถพบ MRP คือ เซลล์เยื่อบุต่างๆ หัวใจ ตับ ไต ต่อมหมวกไต ปอด และอัณฑะ (Bergman, 2003)

มีการศึกษาพบว่าการที่มีการแสดงออกของ PGP และ MRP ที่มากเกินไปนั้นมีผลทำให้ลดการสะสมยาภายในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการต่อต้านยา และมีผลทำให้การรักษามะเร็งโดยใช้ยารักษามะเร็งไม่ได้ผลเท่าที่ควร และยังพบว่า PGP และ MRP สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งเชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของเซลล์จากเชื้อต่าง ๆ ที่อยู่นอกเซลล์ ที่จะเข้ามาสะสมภายในเซลล์แล้วเกิดเป็นพิษกับเซลล์ (Leslie et al., 2005) ในทางสัตวแพทย์มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณของ PGP ที่พบในเนื้องอก lymphoma ในสุนัข ซึ่งมีการตรวจโดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี (Moore et al., 1995) พบว่าภายหลังที่ให้การรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด เซลล์ที่ให้ผลบวกมีจำนวนมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อของเนื้องอกต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองปกติ และมีรายงานการตรวจหา PGP โดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ เนื้องอกเต้านม และมะเร็งเต้าในสุนัข เพื่อหาจุด cut-off ซึ่งพบว่าสามารถนำมาช่วยพิจารณาคัดเลือกสัตว์ป่วยในรายที่จะทำการรักษาด้วยเคมีบำบัด (Petterino et al., 2006) และมีการรายงานถึงการพบการแสดงออกของ PGP และ/หรือ MRP จำนวนร้อยละ 26 ในเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ก้อนเนื้องอกไม่ตอบสนองต่อยาที่ให้ (Miyoshi et al., 2002)