

การแสดงออกของดัชนีงอกขยายและ โปรตีนต่อต้านยาในเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัข
ที่ให้การรักษาด้วย Vinblastine sulfate ร่วมกับยา Prednisolone

นางสาว วิยะดา ศรีชาติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ISBN 974-14-2974-6
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF PROLIFERATIVE MARKERS AND MULTIDRUG RESISTANT PROTEINS IN CANINE
MAST CELL TUMOR TREATED WITH VINBLASTINE SULFATE AND PREDNISOLONE

Miss Wiyada Srichart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-2974-6

Copyright of Chulalongkorn University

490076

นางสาววิยะดา ศรีชาติ : การแสดงออกของดัชนีงอกขยายและโปรตีนต่อต้านยาในเนื้องอกมาสต์เซลล์ของสุนัขที่ให้การรักษาด้วย Vinblastine sulfate ร่วมกับยา Prednisolone. (EXPRESSION OF PROLIFERATIVE MARKERS AND MULTIDRUG RESISTANT PROTEINS IN CANINE MAST CELL TUMOR TREATED WITH VINBLASTINE SULFATE AND PREDNISOLONE) อ. ที่ปรึกษา: รศ. น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. น.สพ. ดร. ประสาน ตั้งควัฒนา , 83 หน้า. ISBN 974-14-2974-6.

สุนัขจำนวน 23 ตัว ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเนื้องอกมาสต์เซลล์ และทำการรักษาด้วยเคมีบำบัดชนิด Vinblastine sulfate ร่วมกับการกิน Prednisolone และทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนการรักษา จำนวน 23 ตัวอย่าง และหลังรักษา จำนวน 11 ตัวอย่าง เพื่อประเมินและติดตามผลการรักษา โดยใช้ระยะทางคลินิก ลักษณะจุลพยาธิวิทยา ตัวบ่งชี้การงอกขยาย ได้แก่ ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA และค่าดัชนี Ki-67 และการแสดงออกของโปรตีนต่อต้านยา ได้แก่ โปรตีน PGP และ MRP ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า เนื้องอกทั้งหมด 23 ตัวอย่าง จัดอยู่ในระดับทางจุลพยาธิวิทยาเกรด 2 และพบว่าภายหลังการรักษาไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับเกรดทางจุลพยาธิวิทยา แต่มีรายละเอียดทางจุลพยาธิวิทยาที่เปลี่ยนแปลง คือ พบการเพิ่มขึ้นนิวเคลียสที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และ stroma และมีการลดลงของปริมาณไซโตพลาสซึม จำนวนนิวคลีโอไลต์ที่มองเห็นได้ เส้นเลือดและจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil ภายในก้อนเนื้องอก และค่าเฉลี่ย mitotic index (ก่อนรักษา คือ 1.6 เซลล์/HPF, หลังการรักษา คือ 1.1 เซลล์/HPF) ผลการประเมินการตอบสนองต่อการรักษาทางคลินิกพบว่า มีการตอบสนองระดับ partial response (PR) จำนวนร้อยละ 78.2 (18/23) และระดับ stable disease (SD) จำนวนร้อยละ 21.8 (5/23) และมีค่ามัชฌิมระยะเวลาการมีชีวิต (survival time) คือ 101 วัน ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs ดัชนี PCNA และดัชนี Ki-67 ก่อนการรักษา คือ 1.83 ± 0.4 , 18.67 ± 9.25 , 6.86 ± 7.23 ตามลำดับ และหลังการรักษา คือ 1.59 ± 0.3 , 12.4 ± 7.15 , 1.9 ± 1.35 ตามลำดับ และพบว่าภายหลังการรักษาค่าดัชนีงอกขยายทั้งสามชนิด มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน PGP และ MRP คือ จำนวนร้อยละ 31.1 (9/23) และ 43.4 (10/23) ตามลำดับและให้ผลบวกต่อโปรตีน PGP และ/หรือ MRP คือ จำนวนร้อยละ 60.8 (14/23) ค่าเฉลี่ยโปรตีน PGP และ MRP ก่อนการรักษา คือ 8.55 ± 6.4 และ 16.66 ± 20.84 ตามลำดับ หลังการรักษา คือ 9.4 ± 5.6 และ 17.45 ± 22.96 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าภายหลังการรักษา ค่าเฉลี่ยโปรตีน PGP และ MRP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กล่าวโดยสรุปว่า ภายหลังการรักษามีแนวโน้มว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์มีความรุนแรงลดลง โดยการประเมินจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ตัวบ่งชี้การงอกขยายของเซลล์ ได้แก่ ดัชนี AgNORs ดัชนี PCNA และ ดัชนี Ki-67 และพบว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนต่อต้านยา ซึ่งผลต่อการรักษาควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ภาควิชา: พยาธิวิทยา

สาขาวิชา: พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

ปีการศึกษา: 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... วิษวณ ๗/๒๕๔๙
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4775576331 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEY WORD: MAST CELL TUMOR / CANINE / PROLIFERATIVE MARKERS / MULTIDRUG RESISTANT PROTEINS / CHEMOTHERAPY

WIYADA SRICHART: EXPRESSION OF PROLIFERATIVE MARKERS AND MULTIDRUG RESISTANT PROTEINS IN CANINE MAST CELL TUMOR TREATED WITH VINBLASTINE SULFATE AND PREDNISOLONE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ANUDEP RANGSIPIPAT, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PRASARN TANGKAWATTANA, Ph.D., 83 pp. ISBN: 974-14-2974-6.

Twenty three dogs having cutaneous mast cell tumor (MCT) were treated with Vinblastine sulfate and oral Prednisolone. Evaluation of the 23 pre-treated and 11 post-treated tissue samples were performed on their clinical stages, histopathological features, expression of proliferative markers such as Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs), Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67, and multidrug resistant proteins such as P-glycoprotein (PGP) and Multidrug Resistant associated Protein (MRP). All cases were diagnosed in MCT grade II without post-treatment changes in histopathological grade. Increase of uniform nucleus, stroma but decrease of cytoplasm, number of visible nucleolus, intralesional vascularization, eosinophilic aggregation, and the mean of mitotic index (pre-treatment = 1.6 cells/HPF, post-treatment = 1.1 cells/HPF) were observed in the post-treated samples. With regard to the clinical evaluation, 18 dogs (78.2%) were partially responsive and the rest (21.8%) were stable. Median survival time of these cases was 101 days. In addition, mean±standard deviation of AgNORs (dots/cell), PCNA (%) and Ki-67(%) were 1.83±0.4, 18.67±9.25, 6.86±7.23 in the pre-treatment group and 1.59±0.3, 12.4±7.15, 1.9±1.35 in the post-treatment group, respectively. All proliferative markers decreased statistically different after treatment ($p < 0.05$, $n=11$). Moreover, the expression of PGP and MRP in all cases was 31.1% (9/23) and 43.4% (10/23), respectively. Positive result of at least one of the two multidrug resistant proteins was 60.8% (14/23). Whilst the expression of PGP and MRP were not statistically different ($p > 0.05$, $n=11$) there were 8.55±6.4, 16.66±20.84 in the pre-treatment group and 9.4±5.6, 17.45±22.96 in the post-treatment group, respectively. In conclusion, the MCT dogs treated with Vinblastine sulfate and oral Prednisolone were showed to decrease in histopathological malignancy characteristics which including AgNORs, PCNA, Ki-67 indices. However, correlations between the expression of PGP and MRP and the efficacy of treatment should be further investigated.

Department Veterinary Pathology

Field of Study Veterinary Pathobiology

Academic Year 2006

Student's Signature..... 

Advisor's Signature..... 

Co-advisor's Signature..... 

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังนี้

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. นสพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษา
ร่วมวิทยานิพนธ์ รศ. นสพ. ดร. ประสาน ดังวัฒนา และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ. สพญ. ดร.
มีนา สาริกฤติ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง
ต่างๆ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ผศ. สพญ. สิริขจร ดังวัฒนา ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในงานวิจัยในด้านการ
ปฏิบัติงานอิมมูโนโอสโตเคมี

ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2548 ของบัณฑิต
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

รศ. สพญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา อ.นสพ. สว่าง เกษ
แดงสกุลวุฒิ นายสุประดิษฐ์ หวังในธรรม และบุคลากรทุกท่านในหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิ
วิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ทำการวิจัย
สารเคมี อุปกรณ์ และเทคนิคในการทำงาน

อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ในคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตว
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในงานด้านการรักษาและ
การเก็บตัวอย่าง

อ. สพญ. ดร. ศยามณ ศรีสุวรรณาสกุล ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตว
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์แอนติบอดี และคำแนะนำในงาน
ด้านอิมมูโนโอสโตเคมี ผศ. นสพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในงานทางสถิติ

เจ้าของสัตว์ป่วยและสัตว์ป่วยที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวที่ให้ความรัก กำลังใจ และความช่วยเหลือ
ตลอดมา สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
สารบัญคำย่อ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	16
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	52
รายการอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก.....	63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การประเมินความเป็นพิษจากยา.....	22
2 แสดงจำนวนตัวอย่าง อายุ พันธุ์ ตำแหน่งก้อนเนื้อออก การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง การแพร่ของมาสต์เซลล์ในกระแสเลือด ระดับเนื้องอกทางคลินิก ระดับเกรดทางจุลพยาธิวิทยา.....	37
3 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตัวอย่างชิ้นเนื้อประเมินก่อนและหลังการรักษา.....	38
4 แสดงการประเมินผลการรักษาทางคลินิก.....	39
5 แสดงค่าเฉลี่ยผลการตรวจทางโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีเลือด ในช่วงก่อนการรักษา และในช่วงระหว่างการรักษา.....	40
6 แสดงค่าเฉลี่ยดัชนีออกซายา AgNORs PCNA และ Ki-67 ของตัวอย่างเนื้อเยื่อก่อนและหลังรักษา.....	42
7 แสดงค่าร้อยละของโปรตีน PGP และ MRP ของตัวอย่างเนื้อเยื่อก่อนและหลังการรักษา.....	44
8 แสดงค่าการให้ระดับคะแนนของโปรตีน PGP และ MRP ของตัวอย่างเนื้อเยื่อก่อนและหลังการรักษา.....	46
9 แสดงเกรดทางจุลพยาธิวิทยา ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs PCNA และ Ki-67 ค่าเฉลี่ยโปรตีนต่อต้านยา PGP และ MRP และการตอบสนองต่อการรักษา.....	48
10 ความสัมพันธ์ของตำแหน่งของเนื้องอกและการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองต่อดัชนีออกซายาและโปรตีนต่อต้านยา.....	49
11 ความสัมพันธ์ของการตรวจการแพร่กระจายไปยังกระแสเลือด การตรวจพบอาการทางคลินิก และระดับอาการทางคลินิกต่อดัชนีออกซายาและโปรตีนต่อต้านยา.....	50
12 ความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อการรักษาและระยะเวลาการมีชีวิตต่อดัชนีออกซายาและโปรตีนต่อต้านยา.....	51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ภาพทางเซลล์วิทยาของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์.....7
2	แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์.....7
3	แสดงวัฏจักรเซลล์ (cell cycle).....9
4	สูตร โครงสร้างของ Vinblastine sulfate.....12
5	แสดงแผนภาพตำแหน่งของ P-glycoprotein.....14
6	แสดงตำแหน่งก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์ของสุนัขป่วยที่เข้ารับการรักษา.....32
7	แสดงลักษณะทางมพยาธิของเนื้องอกมาสต์เซลล์.....33
8	ภาพจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกมาสต์เซลล์ ก่อนและหลังการรักษา.....34
9	แสดงการข้อมติคีสีส โคเคมีชนิด AgNORs และสีอิมมูโน โนฮีส โคเคมีชนิด PCNA และ Ki-67 ก่อนรักษาและหลังรักษา.....35
10	แสดงเซลล์ที่ข้อมติสีอิมมูโน โนฮีส โคเคมี ชนิด PGP และ MRP.....36
11	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยผลการตรวจทางโลหิตวิทยา และค่าชีวเคมีเลือด ในช่วงก่อนการรักษาและในช่วงระหว่างการรักษา.....41
12	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของดัชนี AgNORs PCNA และ Ki-67.....43
13	แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการแสดงออกของ โปรตีน PGP และ MRP.....45
14	แผนภูมิแสดงร้อยละของจำนวนสุนัขที่พบการแสดงออกของ โปรตีน PGP และ MRP ในแต่ละระดับคะแนน.....47

สารบัญย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ซม.	: เซนติเมตร
°ซ	: องศาเซลเซียส
คร.ม.	: ตารางเมตร
มก.	: มิลลิกรัม
ABC	: Avidin biotin peroxidase complex
AgNORs	: Argyrophilic nucleolar organizer regions
ALP	: Alkaline phosphatase
ALT	: Alanine amino transferase
BUN	: Blood urea nitrogen
Hct	: Hematocrit
HPF	: High power field
H&E	: Hematoxylin & Eosin
kD	: Kilodalton
MDR	: Multidrug resistance
MRP	: Multidrug-resistance associated protein
PCNA	: Proliferative nuclear antigen
PGP	: Permeability-glycoprotein
PLT	: Platelet
RBCs	: Red blood cells
TNM	: The tumor node metastasis
WBCs	: White blood cells
μm	: Micrometer