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 (Loplamlert et al., 2010) ลักษณะทางภายนอกของเนื้องอกชนิดนี้นั้นจะมีลักษณะเป็นก้อนของเนื้องอกเดี่ยวๆ สีชมพูมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเนื้องอกของผิวหนังของสุนัขชนิดอื่นๆ อาจจะพบแผลหลุมเกิดขึ้นบนผิวหนังบริเวณที่เป็นเนื้องอกได้ ซึ่งเป็นลักษณะที่เป็นอันตรายสำหรับสุนัขป่วยเพราะแสดงให้เห็นว่าเนื้องอกนั้นมีความรุนแรงสูง อย่างไรก็ตามในสุนัขบางพันธุ์ เช่น พันธุ์ Golden retriever สามารถพบเนื้องอกชนิดนี้เป็นลักษณะเกิดขึ้นมาหลายๆก้อนได้ และมีความรุนแรงกว่าเนื้องอกที่เกิดเพียงก้อนเดียว นอกจากนี้บริเวณที่เนื้องอกเกิดขึ้นมานั้นมีความสำคัญโดยเฉพาะเนื้องอกชนิดนี้นั้นถ้าเกิดบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหนังกับเยื่อเมือก หรือบริเวณขาหนีบของสุนัข พบว่าเนื้องอกจะมีพฤติกรรมทางชีวภาพที่รุนแรงสูงและเป็นอันตรายต่อชีวิตของสุนัขสูงมาก สำหรับการแพร่กระจายของจะไม่ค่อยพบ โดยปกติอุบัติการณ์ในการแพร่กระจายอยู่ที่ประมาณ 3% ของสุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้ (Dobson and Scase, 2007)

เนื่องจากเนื้องอกชนิดนี้มีความหลากหลายของพฤติกรรมทางชีวภาพ (biological behavior) นอกจากนี้ระดับความรุนแรงของก้อนเนื้องอกมีตั้งแต่ระดับเป็นก้อนเนื้องอกที่ไม่มีความรุนแรงซึ่งเมื่อผ่าตัดเลาะออกไปจะไม่พบการกลับมางอกขยายใหม่ได้ไปจนถึงระดับเป็นก้อนมะเร็งที่ลุกลามและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆได้อย่างรวดเร็ว 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) นอกจากนี้การรักษาและการพยากรณ์โรคยังต้องพิจารณาถึงตำแหน่งของเนื้องอก ระยะเวลาในเจริญเติบโต อาการทางคลินิก concurrent treatment และ proliferate activity โดยใน

ส่วนของ Proliferative activity ต้องอาศัยเทคนิคการย้อมสีพิเศษทางอิมมูนโนฮีสโตเคมี เช่น Ki67 และ Argyrophilic nucleolar organizing regions [AgNOR] เป็นต้น การใช้เซลล์วิทยา เป็นที่นิยมในการวินิจฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (อัจฉริยา ไศละสูต และ คณะ พ.ศ. 2549)

ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งมาสต์เซลล์ ให้มีความแม่นยำสูงขึ้นเพื่อใช้ประกอบกับการตรวจวินิจฉัยเนื้องอกชนิดนี้ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ทำให้การตรวจวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ถูกต้องและสมบูรณ์ขึ้นมาก ได้แก่การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกโดยใช้การย้อมสีโปรตีนที่เป็นผลผลิตของ *c-kit* คือโปรตีน KIT (CD117) โดยการใช้แอนติบอดี้สำหรับ KIT เข้าจับกับตัวโปรตีนแล้วทำการย้อมสีแอนติบอดี้ซึ่งวิธีดังกล่าวเรียกว่า CD117 Immunohistochemistry (CD117-IHC) จากการศึกษาพบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลรูปแบบการติดสี KIT (KIT staining pattern) ที่แตกต่างกัน 3 แบบ โดยแต่ละแบบมีความสอดคล้องกับการแบ่งเกรดของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทางจุลพยาธิวิทยาดังนี้ การติดสีแบบที่ 1 จะพบการติดสีของ KIT ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เนื้องอก (Perimembranc 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 จำแนกเกรดของเนื้องอกทางจุลพยาธิวิทยา และดัชนีการงอกขยายของเนื้องอกเหล่านี้ทำให้การพยากรณ์โรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Simose et al., 1994)

2.2 เทคนิคการเจาะดูดเซลล์ (Fine Needle Aspiration Technique)

การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกชนิดนี้ในทางคลินิกสัตวแพทย์นิยมใช้วิธี การเจาะดูดเซลล์ (Fine-Needle Aspiration หรือ FNA) ซึ่งสามารถใช้สำหรับให้การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นก่อนที่จะเก็บตัวอย่างเนื้องอกเพื่อส่งไปตรวจทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป (อัจฉริยา ไศละสูต และ คณะ พ.ศ. 2549) ดังนั้นการทำหัตถการในการเจาะดูดเซลล์จากก้อนเนื้องอกนั้น จึงเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้องอกที่ได้จากการเจาะดูด (Fine Needle Aspirated tumor cell) นั้นยังมีข้อจำกัดในการให้ข้อมูลแก่สัตวแพทย์ในการแบ่งเกรดรวมทั้งการพยากรณ์โรค ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์เนื้องอกมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไม่ชัดเจน หรือเซลล์เนื้องอกมีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์เนื้องอกชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์เนื้องอกรูปร่างกลมในสุนัข (Canine Round Cell Tumor) เนื้องอกของอวัยวะสืบพันธุ์ชนิดที่ถ่ายทอดสู่สุนัขอื่นได้ (Transmissible Venereal Tumor, TVT) หรือเนื้องอกของเซลล์ฮีสทิโอไซท์ (Histiocyte) เป็นต้น (Prihirunkij et al., 2007) ทำให้การวินิจฉัยอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้

2.3 วิธีอิมมูนโนไซโตเคมี (Immunocytochemistry)

เป็นวิธีการในการตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา ซึ่งโดยปกติแล้วการจำแนกชนิดทางเซลล์วิทยา อาศัยจากลักษณะของเซลล์ นิวเคลียส ไซโตพลาสซึม จากการทำ Fine Needle Aspiration (FNA) ที่สามารถเจาะดูดเซลล์จากอวัยวะต่างๆ และก้อนเนื้องอกได้ (อัจฉริยา ไศละสูต และ คณะ พ.ศ. 2549) โดยวินิจฉัยจากรอยโรคต่าง ๆ เพื่อการวางแผนการรักษาให้เหมาะสมที่สุด ในกรณีที่ลักษณะของเซลล์มีลักษณะที่เด่นชัด (typical appearance) ปัญหาในการวินิจฉัยจะมีน้อย แต่ในกรณีที่ลักษณะของเซลล์ไม่เด่นชัด (Atypical) การตรวจด้วยวิธี Immunocytochemistry จะช่วยในการวินิจฉัยทำได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น แอนติบอดี้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยจะช่วยจำแนกชนิดของเซลล์ได้ เช่นจำแนก เซลล์เยื่อบุ (epithelium), เซลล์สร้างเม็ดน้ำเหลือง (lymphoid cell), ฮีสทิโอไซต์ (histiocytes), พลาสมาเซลล์ (plasma cell), เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue), เนื้อเยื่อเซลล์ประสาท (nervous tissue) ฯลฯ เป็นวิธีการที่สะดวกในทางปฏิบัติ โดยการเตรียมสไลด์และตรึงสภาพแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานเป็นสัปดาห์ โดยที่ คุณสมบัติทางอิมมูน (immunoreactivity) ไม่เสื่อมสลาย อ่านผลจากการย้อมได้ทันที สะดวก รวดเร็วและแม่นยำ

2.4 ออองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์

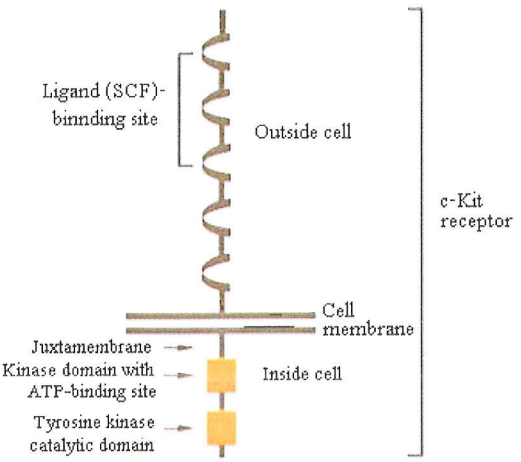
โปรโตออองโคยีน *c-kit* (Protooncogene *c-kit*) เมื่อมีการถอดรหัสจะได้โปรตีนยีนหรือโปรตีนรับจำเพาะที่มีชื่อว่าโปรตีนรับจำเพาะ *c-kit* (*c-kit* receptor) ซึ่งจะอยู่บนผนังเซลล์ หน้าที่โดยทั่วไปของยีนดังกล่าวคือควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ของเซลล์ แต่ในกรณีเนื้องอกมาสต์มักพบความผิดปกติ 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 ทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต 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) ทั่วไปคือประกอบไปด้วย 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 ตลอดเวลาแม้จะไม่มีการจับกันระหว่าง stem cell growth factor กับ KIT receptor ดังนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆจนเกิดเป็นลักษณะก้อนเนื้องอก หากทำการวินิจฉัยด้วยวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี จะพบการติดสีของ KIT receptor หรือ CD117 ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นจึงนำคุณลักษณะดังกล่าวมาใช้เป็นดัชนีพยากรณ์ (prognostic marker) เนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ที่มีอนุพันธ์ของยีน 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) และเยื่อบุมดลูก (สุนัขและแมว) (Morini et al., 2004). ในทางสัตวแพทย์ *c-kit* ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยเนื้องอกชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ เนื่องจาก immunostaining ค่อนข้างจะมีความคงตัวสูงและจำเพาะต่อเนื้องอกชนิดนี้มาก ซึ่งเมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี พบลักษณะการติดสีเป็นแบบกระจาย (diffuse)นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจเนื้องอกชนิดอื่นได้ 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 นอกจากนี้การแสดงออกของ KIT ทำให้สามารถแยกระหว่าง Canine hemangiosarcoma ออกจาก Benign proliferative endothelial

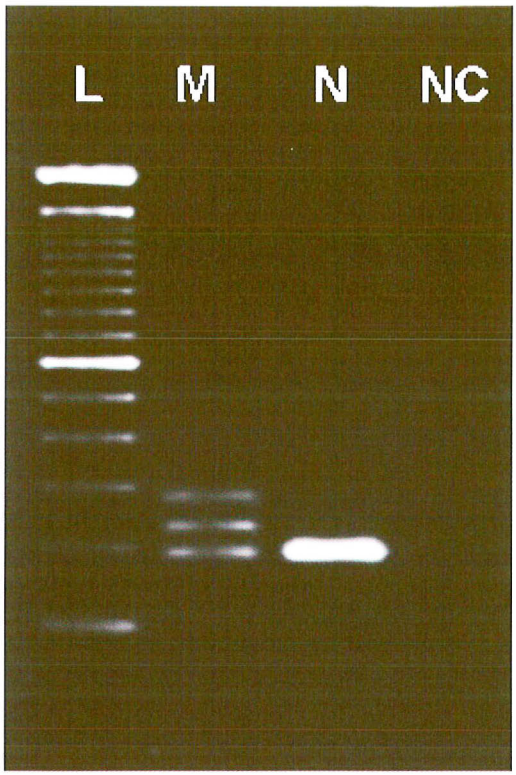
lesion (Fosmire et al., 2004) ส่วนเนื้องอกที่ไม่มีคุณสมบัติทางอิมมูนต่อ KIT ได้แก่ Non-Hodgkin lymphoma (สุนัขและแมว), Pheochromocytoma (สุนัข), Adrenal cortical carcinoma (สุนัข), Thyroid gland carcinomas (สุนัขและแมว), Endometrial carcinoma (แมว), Leiomyomas (สุนัข), Leiomyosarcomas (สุนัขและแมว) และ Transmissible venereal tumor, TVT (สุนัข) (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 tendam 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) ที่มีลักษณะคล้ายกับอิมมูโนกลอปบูลินของแอนติบอดี้ จำนวน 5 ส่วน และส่วนโครงสร้างภายในเซลล์ (Intracellular domain) ที่ประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า Juxtamembrane domain และบริเวณของเอนไซม์ Kinase (kinase หรือ phosphotransferase domain) การทำงานของ KIT ขึ้นเมื่อบริเวณโครงสร้างภายนอกจับกับโมเลกุลของโปรตีนเฉพาะที่เรียกว่า Stem cell factor (SCF หรือ Mast cell growth factor) ส่งผลให้เกิดการถ่ายทอดหมู่ฟอตเฟตไปยังโมเลกุลของ Tyrosine ที่อยู่บน KIT โดยอาศัยการทำงานของ Kinase domain เร่งปฏิกิริยาส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณภายในมาสต์เซลล์ขึ้นเป็นลำดับ สัญญาณดังกล่าวส่งผลให้มาสต์เซลล์เกิดการพัฒนาและมีการเปลี่ยนแปลงรวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนขึ้น (Webster et al., 2007) ซึ่งขบวนการส่งสัญญาณดังกล่าวจะถูกยังยั้งจากการทำงานของส่วนที่เป็น Juxtamembrane domain ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการส่งสัญญาณยับยั้ง (Negative regulator)

บริเวณของ Juxtamembrane domain ของ KIT ในสุนัขจะถูกควบคุมโดยกลุ่มของยีนที่อยู่ใน Exon 11 ของ *c-kit* ซึ่งจากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าการกลายพันธุ์ของ *c-kit* ที่ส่งผลให้เกิดมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขนั้นจะเกิดจากการกลายพันธุ์ใน Exon 11 (Zemke et al., 2001) ในบริเวณดังกล่าวโดยเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะมีการแทรกลำดับเบสที่ซ้ำๆกัน ตั้งแต่ 45-70 bp ที่บริเวณปลาย 3' ของ Exon 11 ส่งผลให้เกิดการสร้างลำดับของกรดอมิโนที่ซ้ำๆกันแทรกอยู่ในโครงสร้างของ Juxtamembrane domain ของ KIT (Internal tanderm duplication หรือ ITD) (London, 1999; Zemke et al., 2002) ผลของการกลายพันธุ์ส่งผลให้ KIT สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องมีการจับกับโมเลกุลของโปรตีนจำเพาะ รวมทั้ง Juxtamembrane domain ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ได้ ผลที่ได้ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของมาสต์เซลล์อย่างรวดเร็ว และพัฒนาเป็นเนื้องอกและมะเร็งมาสต์เซลล์ในที่สุด

สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของ 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 ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งวิธีทั้งสองให้ความไวและน่าเชื่อถือได้สำหรับการตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* (Turin et al., 2006) ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วย PCR นั้นพบว่าผลิตผลของ PCR (PCR product) ที่มีการกลายพันธุ์จะแสดงให้เห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอ ที่ประกอบไปด้วยแถบย่อย 3 แถบคือ แถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน เกิดจากการรวมตัวของอัลลีของยีนปกติกับยีนอัลลีที่มีการกลายพันธุ์ (Zemke et al., 2002) สำหรับอุบัติการณ์ในการเกิดการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* นั้นจากการศึกษาพบว่ามีประมาณ 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 ที่เพิ่มขึ้นรูปแบบการติดสีของ KIT ในไซโตปลาสมของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์นั้นซึ่งพบได้ในเนื้องอกเกรด II และ III นั้นมักจะสอดคล้องกับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในสุนัขที่เป็นเนื้องอกมาสต์เซลล์เมื่อเทียบกับเนื้องอกเกรด I (Zemke et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีส่วนในการตัดสินใจให้การรักษาเนื้องอกชนิดนี้โดยการใช้เคมีบำบัดสมัยใหม่ด้วย โดยพบว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จะมีการตอบสนองต่อยาที่ยับยั้งการทำงานของ Kinase (Tyrosine kinse inhibitor) โดยเฉพาะ Toceranib (Palladia®, Pfizer) ได้ดีกว่าเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (London et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกขององโคยีน *c-kit* และกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ในปัจจุบันด้วยวิธี PCR นั้นมีการศึกษาจากตัวอย่างของเนื้อเยื่อที่เก็บมาจากก้อนเนื้องอกเท่านั้น

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

วิทยาศาสตร์ที่ยอมรับได้ เพื่อทำการศึกษาการตรวจวินิฉัยเนื้องอกมาสต์เซลล์โดยใช้ขบวนการ CD117 immunocytochemistry (CD117-ICC) ซึ่งมีหลักการคล้ายคลึงกับ CD117-IHC โดยเทียบกับผลที่ได้จากการวินิจฉัยมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา และการแสดงออกขององโคยีน *c-kit* รวมทั้งการตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จากเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) โดยเทียบผลจากวิธี PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เคยได้รับการศึกษามาแล้วดังกล่าวข้างต้นขึ้นมาเพื่อศึกษาในประเด็นดังกล่าว ภายใต้สมมุติฐานที่ว่าตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์สามารถใช้เป็นแหล่งกำเนิดในการศึกษารูปแบบการติดสีทาง CD117-ICC สำหรับช่วยในการตรวจวินิฉัยเนื้องอกชนิดนี้ได้ รวมทั้งสามารถใช้เซลล์ดังกล่าวสำหรับศึกษาการแสดงออกขององโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* เช่นเดียวกับรูปแบบของชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอก โดยคาดว่าวิธีการดังกล่าวจะสามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัย พยากรณ์โรค และ การวางแผนในการรักษาในลักษณะเป็นเครื่องมือข้างตัวสัตว์ (Bed-side tool) ในการตรวจวินิจฉัย พยากรณ์โรคและรักษาทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม ถูกต้อง สะดวก และรวดเร็วต่อไป