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 ไศละสูต (พ.ศ. 2549) บันทึกประวัติสัตว์ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ พันธุ์ รวมไปจนถึงข้อมูลของเนื้องอกตามระบบ TNM (Tumor Node Metastasis system) ของ World Health Organization (WHO) (Owen, 1980) (ได้แก่ ตำแหน่ง ขนาด รูปร่าง การกระจายของเนื้องอกไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง) เพื่อประเมินระดับอาการทางคลินิก (ตารางที่ 1) ตรวจสุขภาพทางกายภาพและทางโลหิตวิทยา และเคมีเลือด ประกอบด้วย การตรวจการทำงานของตับ ได้แก่ Alanine aminotransferase (ALT) และAlkaline phosphatase (ALP) และการทำงานของไต ได้แก่ ค่า Blood urea nitrogen (BUN) และ Creatinine (Cr) และอื่นๆตามดุลยพินิจของสัตวแพทย์ผู้ทำการตรวจรักษา (ภาคผนวก ก)

3

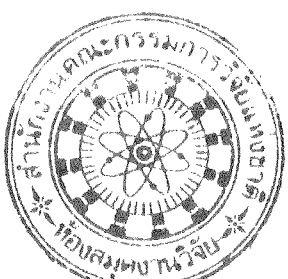
ภาพที่ 3 ภาพสุนัขป่วยด้วยมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 1 การแบ่งระดับอาการทางคลินิกของเนื้องอก (Owen, 1980)

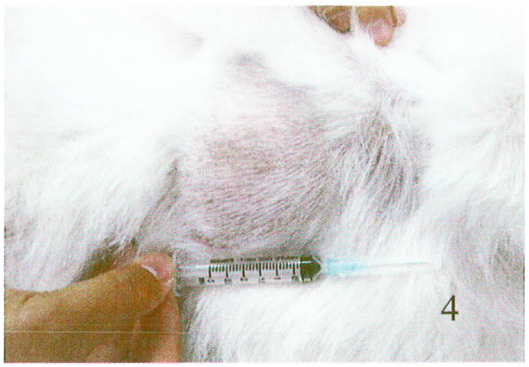
Stage	Clinical Stage
Stage I	One tumour confined to the dermis, no local or regional lymph node involvement
Stage II	One tumour confined to dermis with local or regional lymph node involvement
Stage III	Large infiltrating tumours with or without regional lymph node involvement
Stage IV	Any tumour with 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 ดังนี้เนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด I จะเป็นเนื้องอกที่เซลล์เนื้องอกมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับมาสต์เซลล์ปกติที่พบที่บริเวณผิวหนัง (Well-differentiated) ส่วนเกรด II (Intermediately differentiated) จะพบว่าเซลล์เนื้องอกจะมีการพัฒนาตัวอยู่ระหว่างมาสต์เซลล์ปกติ กับเซลล์ต้นกำเนิดของมาสต์เซลล์ (Mast cell progenitor) และเนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด III นั้น พบว่าเซลล์เนื้องอกนั้นจะมีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด (Undifferentaited หรือ Atypical) (Patnaik et al., 1984) และเนื้อเยื่อเนื้องอกมาสต์เซลล์นำไปศึกษาทางอิมมูนโนฮีสโตเคมีต่อไป

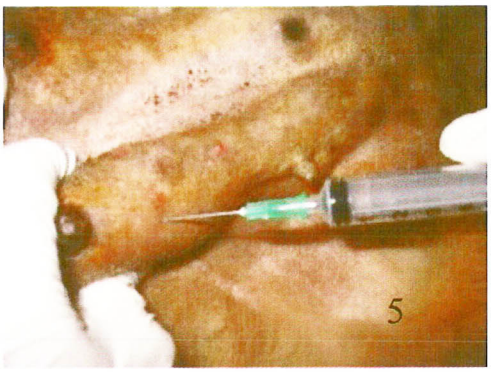
เก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยการเจาะดูดด้วยเข็มขนาด 23 gauze (อัจฉริยา ไศละสูต และคณะ พ.ศ. 2549) จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 พ่นลงบนสไลด์สะอาดที่เคลือบด้วยสาร Silane ตรึงสภาพเซลล์ด้วย cold acetone ที่ 4 องศาเซลเซียส และนำไปศึกษาทางอิมมูนโนไซโตเคมีต่อไป ส่วนที่ 2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของออองโคยีน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



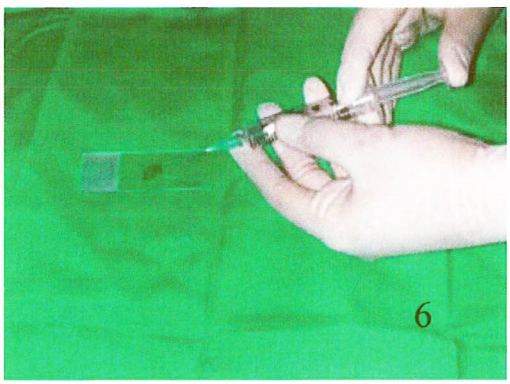
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
รับที่ 6 มิ.ย. 2555
246032



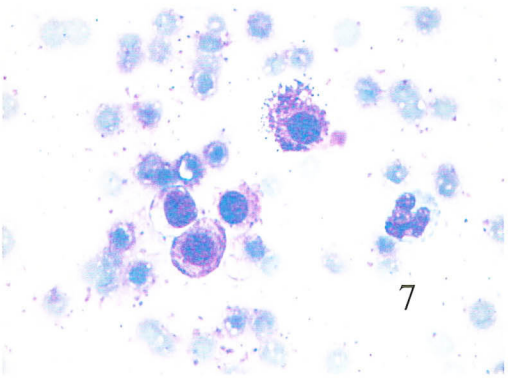
ภาพที่ 4 แสดงการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์



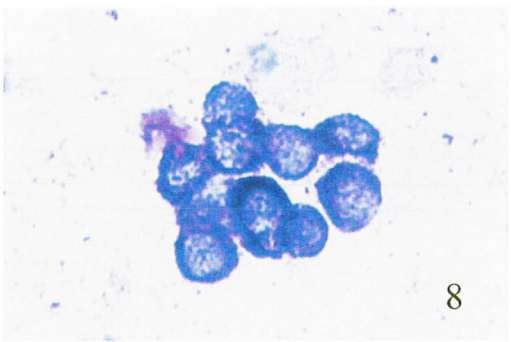
ภาพที่ 5 แสดงการเก็บตัวอย่างโดยวิธีเจาะดูด (Fine Needle Aspiration) **(FNA-MCT cells)**



ภาพที่ 6 การพ่นเซลล์มะเร็งป้ายละเลงบนสไลด์ เพื่อตรึงสภาพและย้อมสีต่อไป



ภาพที่ 7 ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์ พบเซลล์มะเร็งมี granule จำนวนมาก Giemsa's stain



ภาพที่ 8 ภาพเซลล์วิทยาของมะเร็งมาสต์เซลล์ พบการติดสี Metachromatic granule จำนวนมาก Toluidine blue stain

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

ตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกมาสต์เซลล์ทั้งหมด ภายหลังจากผ่านขบวนการในการเตรียมเนื้อเยื่อมาตรฐานที่ใช้ใน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้ว ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำเข้าสู่ขบวนการละลายพาราฟินออก (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 จากนั้นล้างตัวอย่างโดยปล่อยน้ำไหลผ่านตัวอย่าง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาเตรียมสไลด์ตัวอย่างด้วยการใส่ Tris-EDTA แล้วนำไปอบด้วยไมโครเวฟใช้ความร้อนระดับ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเพิ่มการปรากฏตัวของแอนติเจนในเนื้อเยื่อตัวอย่าง ล้างสไลด์ด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ peroxidase ภายในเซลล์เนื้องอกด้วย 0.3%H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (หรือใช้เมธานอลบริสุทธิ์ 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 ล้างตัวอย่างโดยการปล่อยน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 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 แทนแอนติบอดี้ตัวแรก ส่วนสไลด์ควบคุมบวก (positive control) คือ ชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยนับที่กำลังขยาย X40 (HPF) โดยเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวก (positive control) ชิ้นเนื้อจากก้อนเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์เกรด II การติดสีของ KIT ในเซลล์มะเร็งแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ การติดสีแบบที่ I คือ การติดสีที่ผนังส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) และอาจพบการติดสีที่ส่วนไซโตพลา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สซึมเล็กน้อย การติดสีแบบที่ II คือ การติดสีจะเข้มขึ้นและมีลักษณะเป็นจุดหรือหย่อมภายในไซโตพลาสซึม การติดสีแบบที่ III คือ การติดสีกระจายทั่วไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอกมาสเซลล์

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

ตัวอย่างของเซลล์เนื้องอกจะถูกป้ายลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบ Silane (Silane glass slide) แล้วตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ขบวนการตรึงสภาพด้วยสารละลาย Acetone เย็น (4°C Cold actone) เป็นเวลา 1-2 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ peroxidase ภายในเซลล์เนื้องอกด้วย 0.3%H_2O_2 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% H_2O_2 50 ไมโครลิตร) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการล้างในน้ำกลั่น แล้วทำการย้อมสีทับด้วย hematoxylin เป็นเวลา 2 นาที ล้างตัวอย่างโดยการปล่อยน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที และทำการปิดเนื้อเยื่อด้วย Cover slip แล้วนำมาตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดยเปรียบเทียบลักษณะการติดสีกับผลที่ได้จาก รูปแบบการติดสีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมี

3.4 วิธีการศึกษาการแสดงออกของ ออองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* จากตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (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 ต่อมาเติมสารละลาย TD2 จำนวน 400 µl แล้วปั่นที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทน้ำกรองทิ้ง จากนั้นปั่นหลอดใส่ตัวอย่างเซลล์อีกครั้งที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3

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

ภายหลังจากได้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้ว สารละลายดีเอ็นเอจะถูกนำมาเตรียมเป็นสารละลายสำหรับทำ PCR (PCR cocktail) โดยเริ่มจากนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จำนวน 2 µl ผสมกับสารละลาย 12.5 µl commercial PCR master mix จำนวน 12.5 µl 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 µl สุดท้ายเติม PCR distillated water จำนวน 6.5 µl ลงในสารละลายสำหรับทำ PCR ซึ่งปริมาตรสุดท้ายของ PCR cocktail เท่ากับ 25µl

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

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