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 มักจะเป็นสุนัขพันธุ์ผสมและสุนัขที่พบมะเร็งมาสต์เซลล์ในเขตกรุงเทพมหานครฯเป็นพันธุ์ผสมมากกว่าพันธุ์แท้ 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 ระยะการพบก้อนมะเร็ง สัตว์ป่วยเคยได้รับการรักษามาก่อน ก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์กลับมาเกิดขึ้นใหม่ สภาพการเลี้ยงดู สุขภาพของสุนัขป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนด้วยโรคในระบบต่างๆด้วย ทำให้ข้อมูลทางคลินิกและพยาธิวิทยาคลินิกมีความจำเพาะแต่ละราย ดังนั้นสุนัขที่เป็นมะเร็งหรือเนื้องอกมาสต์เซลล์ควรได้รับการวินิจฉัยโดยวิธีการจุลพยาธิวิทยา หรืออิมมูนโนฮิสโตเคมีเพื่อจำแนกเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์เพื่อใช้เป็นแนวทางปฏิบัติในการวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรคในแต่ละราย

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

al., 2004) จากผลการศึกษามีจำนวน 9 ตัวอย่างผลทางอิมมูนโนฮีสโตเคมี แตกต่างจากจุลพยาธิวิทยา โดยในเกรด I แต่ผลทางอิมมูโนฮีสโตเคมีเป็นรูปแบบที่ II และ III ซึ่งพบการติดสีรูปแบบที่ II ร้อยละ 46.66 (14/30) อาจเนื่องจากพฤติกรรมทางชีวภาพของเนื้องอกอยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงในระยะก้ำกึ่ง (transitional stage) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาย้อนหลังอุบัติการณ์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่พบเกรด II มากที่สุดเช่นกัน (Loplamlert et. al., 2010) นอกจากนี้ การแสดงออกของ KIT ทางอิมมูโนฮีสโตเคมีช่วยในการวินิจฉัยแยกแยะมะเร็งมาสต์เซลล์ออกจากมะเร็งผิวหนังชนิดอื่นๆ 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

การประยุกต์ใช้วิธีอิมมูนโนไซโตเคมี (Immunocytochemistry) ในการวินิจฉัยเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (Fine Needle Aspiration, FNA) โดยใช้รูปแบบการติดสีช่วยในการจำแนกเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์ได้ พบว่ามีความสอดคล้องเช่นเดียวกับกับรูปแบบการแสดงออกของ KIT ของวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี จากการประเมินรูปแบบการติดสีของ KIT ทางอิมมูนโนไซโตเคมีสอดคล้องกันถึงร้อยละ 93.33% ซึ่งสามารถนำมาใช้ควบคู่กันได้ รวมทั้งความสัมพันธ์กับการจำแนกเกรดด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยามาตรฐานในเชิงบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615$, $P<0.05$) เช่นเดียวกับวิธีทางอิมมูนโนฮีสโตเคมีซึ่งเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นรูปแบบการติดสีของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีการอิมมูนโนไซโตเคมี สามารถนำมาใช้เพื่อการจำแนกเกรดทางคลินิกได้อย่างรวดเร็ว สะดวกรวดเร็วเหมาะสมในทางปฏิบัติข้างตัวสัตว์เช่นเดียวกับเซลล์วิทยาวินิจฉัย

จากผลการศึกษาการแสดงออกขององโคยีน *c-kit* ในเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเซลล์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่เก็บด้วยวิธีการเจาะดูด พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) อาจเนื่องจากคุณภาพของตัวอย่างและจำนวนของเซลล์ที่เก็บได้ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการเก็บตัวอย่างทางคลินิก ตามปกติการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ทางเซลล์วิทยาวินิจฉัย 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) สามารถศึกษาการแสดงออกขององโคยีน *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* ขององโคยีน *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) ในเซลล์มะเร็งโดยวิธีอิมมูนโนไซโตเคมี (ICC-MCT) ตรวจการแสดงออกของออองโคยีน *c-kit* และตรวจสอบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ได้ โดยผลการศึกษาทางวิธีอิมมูนโนไซโตเคมี สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษาจากเนื้อเยื่อมะเร็งมาสต์เซลล์ การติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งพบว่า รูปแบบการติดสีมี 3 แบบคือ แบบที่ I เป็นแบบ Perimembrane pattern แบบที่ II เป็นรูปแบบ Paranuclear pattern และแบบที่ III เป็นรูปแบบ Diffuse pattern ซึ่งรูปแบบการติดสีดังกล่าวจะมีลักษณะสอดคล้องกับรูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) จากวิธีอิมมูนโนฮีสโตเคมี ผลการศึกษาการแสดงออกของออองโคยีน *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 คุณภาพของเซลล์ที่เก็บมีผลต่อในการสกัด และวิธี PCR
3. การพัฒนาวิธีคัดกรองเซลล์มะเร็งที่เก็บได้ให้มีความบริสุทธิ์ จะทำให้ผลการศึกษาการแสดงออกของออองโคยีนชัดเจน