

ชื่อโครงการวิจัย

การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขทางเซลล์
พยาธิวิทยา

ชื่อผู้วิจัย

รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสุต

รศ.น.สพ.ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

น.สพ.ภัทรกฤษ ชิวสุตระกูล

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ

ธันวาคม พ.ศ. 2553

บทคัดย่อ

246032

เนื้องอกหรือมะเร็งที่ผิวหนังชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัขเป็นเนื้องอกที่พบได้เป็นอันดับสองในสุนัข เนื้องอกชนิดนี้มีอุบัติการณ์อยู่ระหว่าง 7-21% สุนัขที่เป็นเนื้องอกชนิดนี้จะมีอายุโดยเฉลี่ยที่ 8 ปี การเกิดเนื้องอกชนิดนี้ไม่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และเพศของสุนัข และเนื้องอกชนิดนี้ต้องการการวินิจฉัย จำแนกเกรด รวมทั้งการพยากรณ์โรคที่รวดเร็ว ในปัจจุบันวิธีที่เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยจำแนกเกรดและพยากรณ์เนื้องอกชนิดนี้จะใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาโดย Patnaik และคณะ (1984) การเจาะดูดเซลล์เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพยาธิสัตวแพทย์ในการตรวจรอกก่อนเนื้องอกและมะเร็งซึ่งสะดวกและรวดเร็ว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ ในการใช้ตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่เก็บได้จากการเจาะดูด มาช่วยในการวินิจฉัยจากรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมี และการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* รวมทั้งตรวจการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีการเจาะดูด จากสุนัขป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ จำนวน 30 ตัว พบว่าสุนัขมีอายุเฉลี่ย 9.6 ปี (>5 - 18 ปี) เป็นเพศเมียร้อยละ 40 (12/30) และ เพศผู้ร้อยละ 60 (18/30) พันธุ์สุนัขที่พบคือ พันธุ์ผสม ร้อยละ 53.34 (16/30) และพันธุ์แท้ร้อยละ 46.66 (14/30) การติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมี พบว่าการติดสีรูปแบบที่ II ร้อยละ 46.66 (14/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 33.33 (10/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมีมีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641$, $P < 0.05$) และได้เปรียบเทียบรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนโนฮิสโตเคมีจากตัวอย่างเซลล์ที่เก็บโดยวิธีเจาะดูด พบว่า รูปแบบที่ II ร้อยละ 40 (12/30) รูปแบบที่ III ร้อยละ 36.66 (11/30) และรูปแบบที่ I ร้อยละ 23.33 (7/30) ตามลำดับ ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของ

เซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไฮสโตเคมี มีความสัมพันธ์กับเกรดจากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615$, $P < 0.05$) ดังนั้นรูปแบบการติดสี KIT หรือ CD117 ของเซลล์มะเร็ง และ เนื้อเยื่อจากมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไฮสโตเคมี และอิมมูโนฮิสโตเคมี ตามลำดับมีความสัมพันธ์กับวิธีการจำแนกเกรดมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยาสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้ และพบว่าการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีพีซีอาร์ จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) โดยพบการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ปกติที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (9 ตัวอย่าง) เกรด II (6 ตัวอย่าง) และ เกรด III (5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ และพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ร้อยละ 28.57 (8/28) ในตัวอย่างเซลล์จากมะเร็งมาสต์เซลล์ เกรด II (5 ตัวอย่าง) และเกรด III (3 ตัวอย่าง) ดังนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด สามารถใช้ศึกษาการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* พบในมะเร็งมาสต์เซลล์ทั้งเกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I และพบว่าอาการทางคลินิกและการประเมินสุขภาพทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือด ไม่พบความสัมพันธ์กับเกรดของเนื้องอกและการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* สรุปผลการประยุกต์ใช้เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูดจากมะเร็งมาสต์เซลล์ โดยใช้รูปแบบการติดสี KIT หรือ CD 117 ทางอิมมูโนไฮสโตเคมี สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการวินิจฉัยจำแนกเกรด และตรวจการแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัขเพื่อช่วยกำหนดแผนการรักษาในระดับข้างต้นต่อไป

คำสำคัญ: มะเร็งมาสต์เซลล์ในสุนัข การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด อิมมูโนไฮสโตเคมี พีซีอาร์

Name of the Investigators	Assoc. Prof. Dr. Achariya Sailasuta Assoc. Prof. Dr. Anudep Rungsipipat Dr. Patharakrit Teewasutrakul
Year	December 2010

246032

Canine mast cell tumor (MCT) is the second most cutaneous tumor found in dogs. The incidence is varied from 7-21% and average age of dogs is approximately 8 years. There are no breed or even gender predilections. In general, the dogs with MCT are required a rapid assessment for grading, diagnosis and prognosis. Recently, the gold standard protocol used for MCT grading, diagnosis and prognosis has been based on Patnaik grading system (1984). To date, fine-needle aspiration is enable for pathologist and clinician in routinely screening for MCT diagnosis. Therefore, the objectives of this study are to establish the standard protocols of the immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns and expression of *c-kit* using fine needle aspiration mast cell tumors (FNA-MCT cells) from 30 MCT dogs at the Oncology Clinic, Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. The dogs were 9.6 years of age (>5-18 years). There were male at 60% (18/30) and female at 40% (12/30). The breeds were mixed breed at 53.34% (16/30) and pure breed at 46.66% (14/30). By comparing the histopathology grading and immunohistochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (IHC-MCT), the results revealed that IHC-MCT were mostly in pattern II at 46.66 % (14/30), pattern III at 33.33% (10/30) and pattern I at 20% (6/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.641$, $P < 0.05$). In case of immunocytochemical KIT (CD 117) staining patterns of MCT (ICC-MCT) in comparison to histopathology grading demonstrated that ICC-MCT were

also mostly in pattern II at 40 % (12/30), pattern III at 36.60% (11/30) and pattern I at 23.33% (7/30) respectively. There was significantly positive correlated (Spearman Correlation: $r = 0.615$, $P < 0.05$). It is suggested that both KIT staining patterns of ICC-MCT and IHC-MCT could be used as the practical tool for MCT grading in comparison to standard histopathology method. The establishment using FNA-MCT cells for *c-kit* expression by PCR was successfully performed which were demonstrated as 93.33 % (28/30). There were normal *c-kit* at 71.42% (20/28), which were 9 samples in grade I, 6 samples in grade II and 5 samples in grade III respectively. While, the mutation in Exon 11 of *c-kit* was at 28.57 % (8/28), which were 5 samples in grade II and 3 samples in grade III. The mutation of *c-kit* in MCT grade I could not be detected. Regards to the clinical signs, hematological and blood chemistry analysis, there was no significant correlated to the grade and mutation of Exon 11 of *c-kit*. In conclusion, it is speculated that the methods used in this study based on FNA-MCT cells could be used as a bed-side tool for MCT grading, diagnosis, prognosis, and therapeutic planning.

Keywords: Canine mast cell tumor, *c-kit* expression, Fine needle aspiration sample, KIT, (CD117) immunocytochemistry, PCR