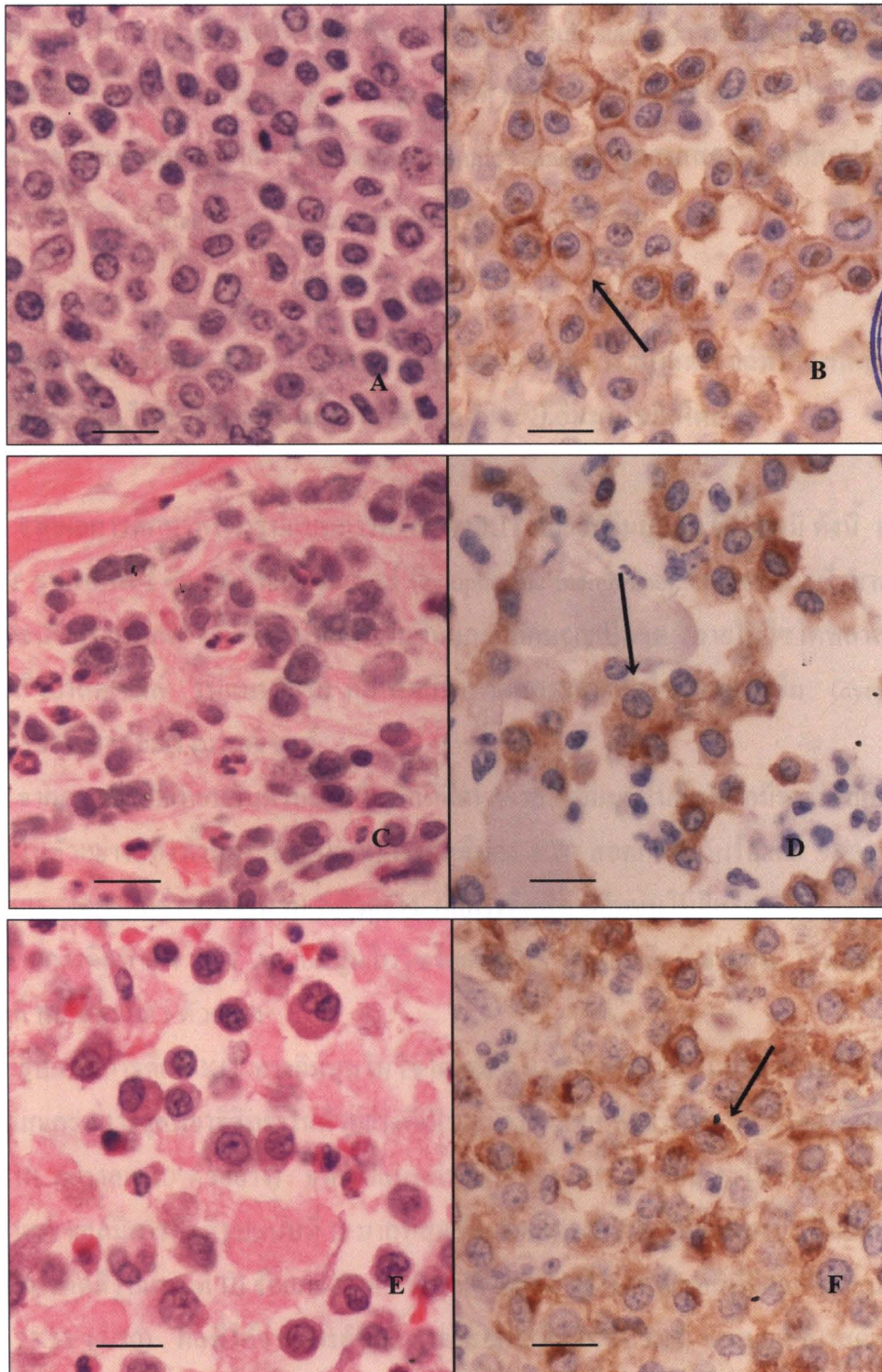


บทที่ 4

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 รูปแบบการคิดสีของ KIT (CD 117) ในตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัขทางภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี และการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา

รูปแบบการคิดสี KIT ทางภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมี ได้แก่ รูปแบบที่ I, II และ III เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งมาสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง เกรดที่ I, II และ III อย่างละ 10 ตัวอย่าง (ภาพที่ 9) รูปแบบการคิดสีของ KIT ที่พบในมะเร็งมาสต์เซลล์เป็นรูปแบบการคิดสีแบบที่ II มากที่สุด คือ ร้อยละ 46.66 (14/30) รองลงมาเป็นมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบการคิดสีแบบที่ III ร้อยละ 33.33 (10/30) และมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบการคิดสีแบบที่ 1 ร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ ผลจากการจำแนกรูปแบบการคิดสีของ KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์โดยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีสอดคล้องกับผลการแบ่งเกรดจากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา จำนวน 21 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70 (21/30) พบว่ามะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT รูปแบบที่ II จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด II จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT แบบที่ III จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมะเร็งมาสต์เซลล์เกรด III จำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีภูมิคุ้มโนฮิสโตเคมีพบการคิดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ II จำนวน 1 ตัวอย่าง ไม่สอดคล้องจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 (9/30)



ภาพที่ 9 การจำแนกเกรดก่อนมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ผิวหนังในสุนัข ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (Patnaik et al., 1984) H&E มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (A) เกรด II (C) และ เกรด III (E) และรูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของมะเร็งมาสต์เซลล์ มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ I แสดงการติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(perimembrane) (B) ; รูปแบบที่ II แสดงการติดสีเข้ามาภายในไซโต

พลาสมาซึมมากขึ้น บางส่วนติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(cytoplasmic staining) และเป็นหย่อมบริเวณข้างๆนิวเคลียส (paranuclear staining) (D) ; รูปแบบที่ III แสดงการติดสีกระจายทั่วในไซโตพลาสซึมและเซลล์มีขนาดแตกต่างกัน (diffuse cytoplasmic staining) ลูกศรแสดงการติดสีรูปแบบต่างๆ EnvisionTM, Hematoxylin counterstained, DAB , Bar= 50 μ m

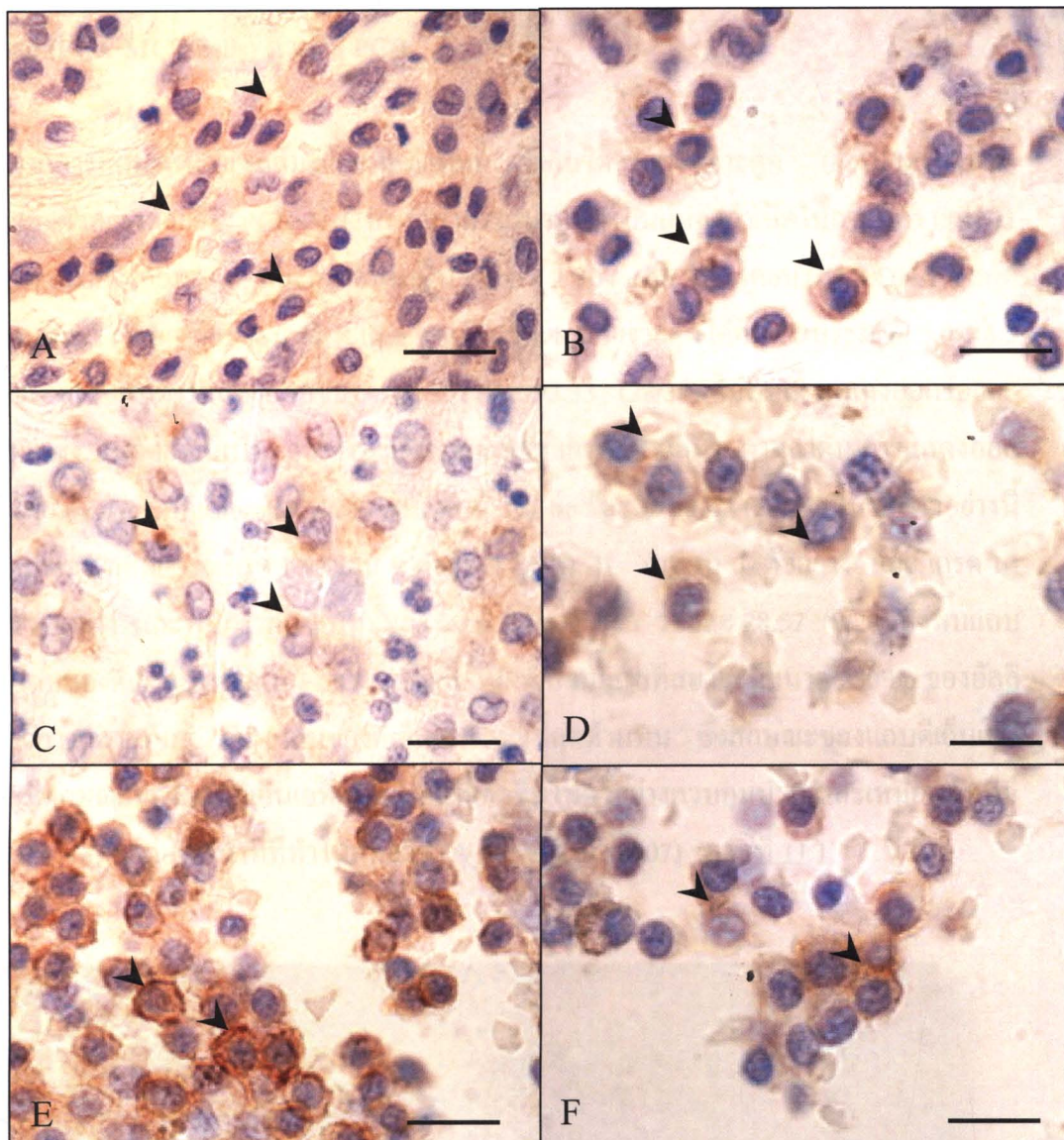
4.2 รูปแบบการติดสีของ KIT (CD117) ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งมัสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ในสุนัขด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมีและวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

จากผลการศึกษาพบว่ารูปแบบการติดสีของ KIT ด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมี ดังนี้ การติดสีของ KIT รูปแบบที่ I คือ ติดสีที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ของเซลล์มะเร็งมัสต์เซลล์อย่างชัดเจน รูปแบบที่ II คือ ติดสีจะเข้มข้นและมีลักษณะเป็นจุด ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งมัสต์เซลล์ รูปแบบที่ III คือ ติดสีการติดสีกระจายทั่วไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining) ของเซลล์มะเร็งมัสต์เซลล์

จากการเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่า ลักษณะการติดสีในตัวอย่างของทั้งสองวิธีมีรูปแบบการติดสีของ KIT สอดคล้องกันร้อยละ 93.33 (28/30) (ภาพที่ 10) โดยแตกต่างกันจำนวน 2 ตัวอย่าง ผลการติดสีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นรูปแบบที่ II จำแนกจากการติดสีของ KIT ทางอิมมูโนไฮโตเคมีเป็น รูปแบบที่ I จำนวน 1 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง

รูปแบบการติดสี KIT ทางอิมมูโนไฮโตเคมี ทั้ง 3 รูปแบบ (I, II และ III) เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งมัสต์เซลล์จำนวน 30 ตัวอย่าง (เกรดที่ I, II และ III อย่างละ 10 ตัวอย่าง) จากรูปแบบการติดสีของ KIT ทางอิมมูโนไฮโตเคมี ที่พบในมะเร็งมัสต์เซลล์มีการติดสีรูปแบบที่ II มากที่สุด คือ ร้อยละ 40 (12/30) รองลงมาเป็นมะเร็งมัสต์เซลล์ที่มีการติดสีรูปแบบที่ III ร้อยละ 36.66 (11/30) และ มะเร็งมัสต์เซลล์ที่มีการติดสีรูปแบบที่ I ร้อยละ 23.33 (7/30) ผลที่ได้จากการจำแนกรูปแบบการติดสีของ KIT ของมะเร็งมัสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมี สอดคล้องกับการแบ่งเกรดของตัวอย่างที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาทั้งหมด 21 ตัวอย่างจาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70 (21/30) พบว่ามะเร็งมัสต์เซลล์เกรด I จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมีได้การติดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ II จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ III จำนวน 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างมะเร็งมัสต์เซลล์เกรด II จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมีการติดสีของ KIT เป็นรูปแบบที่ III 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมะเร็งมัสต์เซลล์เกรด III จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุล

พยาธิวิทยา ศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมีการติดสี KIT เป็นรูปแบบที่ I และ รูปแบบที่ II จำนวน 1 ตัวอย่างตามลำดับ ไม่สอดคล้องจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 (9/30)

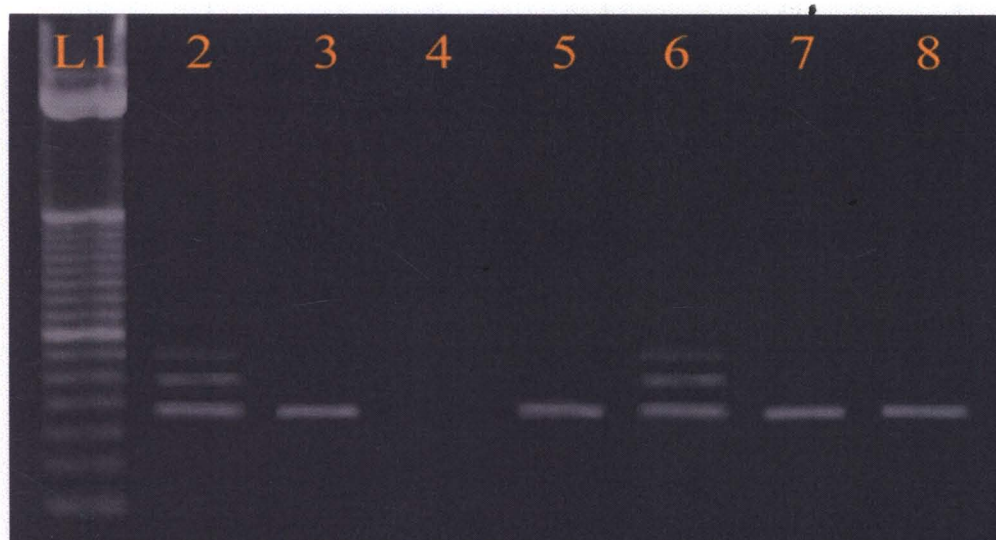


ภาพที่ 10 รูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโนไฮโตเคมีของมะเร็งมาสต์เซลล์ (A,C,E) และ อิมมูโนไฮโตเคมีจากตัวอย่างเซลล์จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) (B,D,F) มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ I แสดงการติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(perimembrane) (Aและ B) ; รูปแบบที่ II แสดงการติดสีเข้ามาภายในไซโตพลาสซึมมากขึ้นและยังมีบางส่วนติดสีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์(cytoplasmic staining) (C และ D) ; รูปแบบที่ III แสดงการติดสีกระจายทั่วใน

ไซโตพลาสซึมและเซลล์มีขนาดแตกต่างกัน (diffuse cytoplasmic staining) (E และ F) หัวถูกสกร แสดงการติดสีรูปแบบต่างๆ Envision™, Hematoxylin counterstain, DAB, BAR = 50 μ m

4.3 การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* จากเซลล์มะเร็ง มาตรฐานเซลล์ (FNA-MCT cells) ด้วยวิธี PCR

จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งมาตรฐานเซลล์ ที่เก็บได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) จำนวน 30 ตัวอย่างด้วยวิธี PCR นั้น พบว่าสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งกำเนิดในการวิเคราะห์การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* และกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* ได้ โดยปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งโดยเฉลี่ยประมาณ $> 1 \mu$ g จากจำนวนเซลล์ที่เจาะดูดได้ครั้งละประมาณ $3.0 - 4.5 \times 10^5$ cells/ μ l พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) ไม่พบการแสดงออกร้อยละ 6.67 (2/30) ซึ่ง 2 ตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างมะเร็งมาตรฐานเซลล์ เกรด III และ I ตามลำดับ การแสดงออกของอองโคยีน *c-kit* ปกติ (normal MCT) พบแถบที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) ใน 20 ตัวอย่างนี้เป็นเซลล์มะเร็งมาตรฐานเซลล์เกรด I จำนวน 9 ตัวอย่าง เกรด II จำนวน 6 ตัวอย่าง และ เกรด III จำนวน 5 ตัวอย่าง และพบการกลายพันธุ์ของ exon 11 ของ *c-kit* ร้อยละ 28.57 (8/28) ซึ่งพบแถบแรกเป็นแถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีลปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีลของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน ซึ่งลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับที่เกิดขึ้นในตัวอย่างควบคุมบวก และเหมือนกับที่มีรายงานในการศึกษาก่อนหน้าที่ทำในเนื้อเยื่อ (Webster et al., 2007) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงแถบของผลผลิต PCR จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเม็ดในสุนัข ที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) ตัวอย่างเซลล์ในช่อง 5,7 และ 8 แสดงแถบ DNA ของ normal MCT ที่ 191 bp เปรียบเทียบตัวควบคุมบวก ช่องที่ 3 ส่วนช่องที่ 6 พบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ c-kit เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกช่องที่ 2 (Webster et al., 2007)

ดังนั้นตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเม็ดที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCTcells) สามารถนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ของ Exon 11 ของ *c-kit* พบในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเม็ดเกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกเกรดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเม็ดในสุนัขทางจุลพยาธิวิทยา รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และจากตัวอย่างเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเม็ดที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells) รูปแบบการติดสีทางอิมมูโนไซโตเคมี และ การแสดงออกของยีน *c-kit* (n=30)

ตัวอย่าง	จำแนกเกรดทาง จุลพยาธิวิทยา	รูปแบบการ ติดสี KIT IHC-MCT	รูปแบบการ ติดสี KIT ICC-MCT	<i>c-kit</i> Expression
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	1	1	1	1
6	1	1	1	1
7	1	2	2	1
8	1	2	2	2
9	1	2	2	1
10	1	3	3	1
11	2	2	2	2
12	2	2	2	2
13	2	2	2	1
14	2	2	2	1
15	2	2	2	1

16	2	2	2	1
17	2	2	2	2
18	2	3	3	1
19	2	3	3	-
20	2	3	3	1
21	3	3	3	2
22	3	3	3	2
23	3	3	3	1
24	3	3	3	1
25	3	3	3	1
26	3	3	3	-
27	3	3	3	1
28	3	3	2	1
29	3	2	3	2
30	3	2	1	1

หมายเหตุ

การจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยา เกรด I = 1 เกรด II = 2 เกรด III = 3

รูปแบบการติดสี KIT (CD 117) ทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และ อิมมูโนไซโตเคมี

รูปแบบที่ I = 1 รูปแบบที่ II = 2 รูปแบบที่ III = 3

การแสดงออกของ *c-kit* ในตัวอย่างเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเจาะดูด (FNA-MCT cells)

Normal MCT = 1, Mutation in Exon 11 of *c-kit* = 2

4.4 ความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก โลหิตวิทยา และเคมี
เลือด ของสุนัขที่ได้ศึกษา กับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์

ไม่พบความสัมพันธ์ เนื่องจากอาการทางคลินิก ผลทางโลหิตวิทยา และเคมีเลือดของสัตว์
ป่วยแต่ละรายมีความจำเพาะในแต่ละราย (ภาคผนวก ก)

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เปรียบเทียบกับการจำแนกเกรดทางจุลพยาธิวิทยาจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ II พบร้อยละ 46.66 (14/30) รองลงมาเป็นรูปแบบที่ III พบร้อยละ 33.33 (10/30) และรูปแบบ I พบร้อยละ 20 (6/30) ตามลำดับ พบว่าจากการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของมะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี มีความสัมพันธ์กับเกรดที่ได้จากการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.641, P < 0.05$)

ผลการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ (FNA-MCT cells) ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี จากเซลล์มะเร็งที่เก็บโดยวิธีเจาะดูด เทียบกับการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา พบว่ารูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์รูปแบบที่ II ร้อยละ 40 (12/30) รองลงมาเป็นรูปแบบที่ III คือ ร้อยละ 36.66 (11/30) และรูปแบบที่ I พบร้อยละ 23.33 (7/30) ตามลำดับ พบว่าการจำแนกรูปแบบการติดสี KIT ของเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมีมีความสัมพันธ์กับการจำแนกด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาในทางบวก (สหสัมพันธ์ของสเปียร์แมน; $r = 0.615, P < 0.05$)

ผลการแสดงออกของยีน *c-kit* ในเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์ (FNA-MCT cells) โดยวิธี PCR จากตัวอย่างเซลล์ของเนื้องอกมาสต์เซลล์ที่เก็บด้วยวิธีการเจาะดูด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ *c-kit* ร้อยละ 93.33 (28/30) โดยพบแถบของ DNA ปกติที่ 191 bp ร้อยละ 71.42 (20/28) จากตัวอย่างเซลล์มะเร็งมาสต์เซลล์เกรด I (9 ตัวอย่าง) เกรด II (6 ตัวอย่าง) และ เกรด III (5 ตัวอย่าง) และพบการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* พบแถบแรกเป็นแถบของดีเอ็นเอขนาด 191 bp ของยีนอัลลีลปกติ ส่วนแถบที่สองจะมีขนาด 250 bp ของอัลลีลของยีนที่มีการกลายพันธุ์ ส่วนแถบของดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดด้านบน ร้อยละ 28.57 (8/28) ในตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด II (5 ตัวอย่าง) และ เกรด III (3 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ดังนั้นตัวอย่างเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ที่ได้จากการเจาะดูดสามารถศึกษาการแสดงออกของยีน *c-kit* ได้ และการกลายพันธุ์ใน Exon 11 ของ *c-kit* พบในก้อนเนื้องอกมาสต์เซลล์เกรด II และ III แต่ไม่พบในเกรด I

อาการทางคลินิก ผลทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือดของสัตว์ป่วยแต่ละราย มีความจำเพาะในแต่ละราย ไม่พบความสัมพันธ์กับเกรดของมะเร็งมาสต์เซลล์ที่ศึกษา