



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปศุสัตว์ทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

ปศุสัตว์ทางสัตวแพทย์

ปศุสัตว์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาร์คเกอร์ชนิด Anti-Vimentin และ Anti-Cytokeratin สำหรับจำแนกกลุ่มเนื้อเยื่อผิวหนังในสุนัข

Development of Tumor Markers: Anti-Vimentin and Anti-Cytokeratin for Canine Skin Tumor Classification

นามผู้วิจัย นางสาวจิราภรณ์ ศรีทัน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ไชยันต์ เกษรดอกบัว, DVM., Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เจลิยา ศาลากิจ, DVM., Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาร์คเกอร์ชนิด Anti-Vimentin และ Anti-Cytokeratin
สำหรับจำแนกกลุ่มเนื้องอกผิวหนังในสุนัข

Development of Tumor Markers: Anti-Vimentin and Anti-Cytokeratin
for Canine Skin Tumor Classification

โดย

นางสาวจิราภรณ์ ศรีทัน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิราภรณ์ ศรีพัน 2553: การพัฒนาการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาร์กเกอร์ชนิด Anti-Vimentin และ Anti-Cytokeratin สำหรับจำแนกกลุ่มเนื้องอกผิวหนังในสุนัข
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาพยาธิวิทยาทาง
สัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ไชยยันต์ เกษรดอกบัว, DVM., Ph.D. 112 หน้า

เนื้องอกผิวหนังในสุนัข เป็นโรคที่พบได้บ่อย การวินิจฉัยแยกชนิดของเนื้องอกมีความสำคัญ ซึ่งปัจจุบันการจำแนกชนิดของเนื้องอกผิวหนังในสุนัขสามารถจำแนกโดยการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา ที่นิยมจำแนกตามชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดและพฤติกรรมของเนื้องอก การศึกษานี้เป็นการศึกษาพัฒนาการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาช่วยในการพัฒนา tumor marker สำหรับจำแนกเนื้องอกผิวหนังสองกลุ่มในสุนัขได้แก่ เนื้องอกที่มีเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์บุผิว (epithelial tumors) จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วย squamous cell carcinoma (5), basal cell tumor (5) basal cell carcinoma (5) sebaceous epithelioma (5) sebaceous gland adenocarcinoma (5) perianal gland adenoma และเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal tumors) จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ fibrosarcoma (5) schwannoma (5) melanoma (5) hemangiopericytoma (5) hemangiosarcoma (5) และ liposarcoma (5) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ cytokeratin สำหรับ epithelial tumors และ vimentin สำหรับ mesenchymal tumors ร่วมกับการใช้ระบบการตรวจวัด (detection system) ที่มีความไวสูง ทำการประเมินผลจากตำแหน่งของการติดสี ความเข้มของการติดสี พบว่าผลที่ได้ในการใช้ tumor markers ให้ผลบวกสำหรับเนื้องอกแต่ละชนิดสอดคล้องกับการจำแนกเนื้องอกทั้งสองกลุ่มจากผู้เชี่ยวชาญ ($\kappa = 1$) แต่พบว่ายังมีความผันแปรของระดับการติดสีและปริมาณเซลล์ที่ติดสีในเนื้องอกต่างชนิดกันที่ใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกัน ความเข้มข้นของแอนติบอดีทั้ง vimentin และ cytokeratin ที่เหมาะสมสำหรับเนื้องอกแต่ละชนิดพบว่า anti-vimentin ความเข้มข้นที่ 1:200 เป็นความเข้มข้นที่ได้การติดสีที่ยอมรับได้ในเนื้องอกทุกชนิดที่ศึกษาในกลุ่ม mesenchymal ส่วนการใช้ anti-cytokeratin สามารถปรับความเข้มข้นได้ที่ 1:300 สำหรับเนื้องอกในกลุ่ม epithelial tumors ที่นำมาศึกษา เมื่อใช้ร่วมกับการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนที่โดยการให้ความร้อนด้วยเตาอบไมโครเวฟร่วมกับระบบการตรวจวัดแบบ polymer detection system

Jiraporn Sritun 2010: Development of Tumor Markers: Anti-Vimentin and Anti-Cytokeratin for Canine Skin Tumors Classification. Master of Science (Veterinary Pathology), Major Field: Veterinary Pathology, Department of Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Chaiyan Kasorndorkbau, DVM., Ph.D. 112 pages.

Currently, canine skin tumors are a common disease. Tumor classification is based on routine histopathological examination. In routine study, canine skin tumors have been classified according to cell origin and tumor behavior. The purpose of this study was to define the tumor marker of important skin tumors. This study presents the results of immunohistochemical studies on the distribution of intermediate filamentous proteins vimentin and cytokeratin which proposed to be tumor markers. Vimentin is specific antibody to mesenchymal cells whereas cytokeratin is specific to epithelial cells. In this study, the collected test specimen included 30 epithelial tumors and 30 mesenchymal tumors. Epithelial tumors consist squamous cell carcinoma (5), trichoblastoma (5) basal cell carcinoma (5), sebaceous gland adenocarcinoma (5) sebaceous gland epithelioma (5) perianal gland adenoma (5). Mesenchymal tumors were: fibrosarcoma (5), schwannoma (5) melanoma (5) hemangiopericytoma (5), hemangiosarcoma (5) and liposarcoma. Vimentin was expressed on all of mesenchymal tumors with variable intensities and amount of positive cells. The expression of cytokeratin was noticed on all of epithelial tumors with variable intensities of immunoreactive cells. These results are correlated with routine histopathological staining interpretation ($\kappa = 1$). Data of each factor was collected such as antibody concentration, antigen retrieval methods and detection system. Antibody concentration was evaluated. The proper anti-vimentin concentration for each mesenchymal tumor was 1:200 whereas suitable concentration of anti-cytokeratin for each epithelial tumor was 1:300. The application of this concentration was used with suitable antigen retrieval methods and polymer detection systems.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยยันต์ เกษรดอกบัว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำงาน การเขียนรายงาน

ขอขอบคุณคุณวนิดา เลหาสุรโยธิน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา สฟ. มก. และคุณจารุวรรณ วงษาดี นักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพยาธิกายวิภาควินิจฉัย หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ บางเขน ที่คอยช่วยเหลือดูแลให้การทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคุณเทียนธรรม พรหมชินวงศ์ บริษัทชินชัยพลายซ์และ อ. ส.พญ.ดร. ทวีวัลย์ ตันสฤติย์ที่ช่วยสนับสนุนน้ำยาเคมีสำหรับทดลองใช้ในงานวิจัยบางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรทิพา เล็กเจริญสุข ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเกี่ยวกับเทคนิคการทำงานวิจัยและคำปรึกษาตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือและสารเคมีต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพยาธิวิทยาและสรีรวิทยาคณะสัตวแพทยศาสตร์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อมนตรี ศรีทันและแม่เครือวัลย์ ศรีทัน สำหรับกำลังใจ ความห่วงใยและความเข้าใจที่มีให้ตลอดเวลาและน้องชายทั้งสองคนที่คอยสนับสนุนทุกอย่างจนการทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จิราภรณ์ ศรีทัน

มีนาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	45
อุปกรณ์	45
วิธีการ	45
ผลและวิจารณ์	51
ผล	51
วิจารณ์	95
สรุปและข้อเสนอแนะ	98
สรุป	98
ข้อเสนอแนะ	98
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	101
ภาคผนวก	108
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เนื้อเยื่อผิวหนัง ที่พบบ่อย 10 อันดับแรก ในสุนัข	20
2 Cytokeratin Expression ในผิวหนังปกติ	43
3 แสดงรูปแบบการติดสี ปริมาณและความเข้มในการติดของเซลล์เนื้องอก กลุ่มเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	52
4 แสดงแบบรูปความเข้มในการติดของเซลล์เนื้องอกกลุ่มเยื่อบุผิวและ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ความเข้มข้นต่างๆ	53
5 แสดงความเข้มของการติดสีเปรียบเทียบสถานะที่ใช้ในการบ่ม primary antibody กับเนื้อเยื่อ	54
6 เปรียบเทียบการใช้ระบบการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นที่ให้ผลการ ติดสีที่ยอมรับได้	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินแสดงบริเวณต่างๆที่เกี่ยวข้องในการทำหน้าที่	4
2	แสดงการจับกันระหว่าง polyclonal antibody กับแอนติเจนได้หลาย Epitopes (ซ้ายมือ) กับการจับกันระหว่างแอนติเจนกับ monoclonal antibody ที่จะจับกับ Epitope ชนิดเดียว (ขวามือ)	6
3	แสดงค่า K_A ที่ใช้แสดงถึงปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จับกันที่เกิดขึ้นที่ภาวะสมดุล	8
4	แสดงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เป็นผลจากการใช้ฟอร์มาลิน	10
5	แสดงแบบจำลอง Polymeric labeling two-step method	16
6	แผนภูมิแสดงสัดส่วนของ Epithelial tumors ที่พบในปี 2548-2550	20
7	แผนภูมิแสดงสัดส่วนของ Mesenchymal tumors ปี 2548-2550	21
8	Basal cell tumor ย้อมด้วย H&E	23
9	Basal cell carcinoma ย้อมด้วย H&E	25
10	Squamous cell carcinoma ย้อมด้วย H&E	27
11	Sebaceous epithelioma ย้อมด้วย H&E	28
12	Sebaceous adenocarcinoma ย้อมด้วย H&E	30
13	Perianal gland adenoma ย้อมด้วย H&E	31
14	Fibrosarcoma ย้อมด้วย H&E	33
15	Hemangiosarcoma ย้อมด้วย H&E	34
16	Hemangiopericytoma ย้อมด้วย H&E	35
17	Liposarcoma ย้อมด้วย H&E	36
18	Schwannoma ย้อมด้วย H&E	38
19	Melanosarcoma ย้อมด้วย H&E	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	56
21	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	56
22	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	57
23	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	57
24	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:500	58
25	Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:500	58
26	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	59
27	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	59
28	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	60
29	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	60
30	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	61
31	Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	61
32	Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
33 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	62
34 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	63
35 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	63
36 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	64
37 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	64
38 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	65
39 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	65
40 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	66
41 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	66
42 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	67
43 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
44	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	68
45	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	68
46	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	69
47	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	69
48	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	70
49	Sebaceous adenocarcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	70
50	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	71
51	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	71
52	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	72
53	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	72
54	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	73
55	Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	73
56	Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
57 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	74
58 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	75
59 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	75
60 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	76
61 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	76
62 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	77
63 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	77
64 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	78
65 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	78
66 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	79
67 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	79
68 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	80
69 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	80
70 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	81
71 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	81
72 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	82
73 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	82
74 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	83
75 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	83
76 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	84
77 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	84
78 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	85
79 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	85
80 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
81	Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	86
82	Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	87
83	Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	87
84	Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	88
85	Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400	88
86	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	89
87	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50	89
88	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	90
89	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200	90
90	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	91
91	Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300	91
92	Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Polymer Detection System	92
93	Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:300) Polymer Detection System	92
94	Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Normal Detection System	93
95	Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:200) Normal Detection System	93
96	Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Not AR Polymer Detection System	94
97	Fibrosarcoma, No primary antibody Polymer Detection System	94

การพัฒนาการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาร์คเกอร์ชนิด Anti-Vimentin และ Anti-Cytokeratin สำหรับจำแนกกลุ่มเนื้องอกผิวหนังในสุนัข

Development of Tumor Markers: Anti-Vimentin and Anti-Cytokeratin for Canine Skin Tumor Classification

คำนำ

เนื้องอก (tumor/neoplasia/neoplasm) ในสุนัข เป็นโรคหนึ่งที่สำคัญ เป็นสาเหตุให้สุนัขจำนวนมากเสียชีวิต โดยเฉพาะถ้าเนื้องอกนั้นเป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงหรือมะเร็ง (Malignant tumors) โดยที่เซลล์มะเร็งเกิดจากเซลล์ร่างกายที่ผิดปกติ เซลล์เนื้องอกจะมีการเจริญเติบโตที่ควบคุมไม่ได้และสามารถแพร่ไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ส่วนเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรง (Benign tumors) จะไม่แพร่กระจายและโตช้า แต่ก็สามารถก่อให้เกิดปัญหาได้โดยการกดอวัยวะและเส้นเลือดข้างเคียง การวินิจฉัยเพื่อแยกชนิดของเนื้องอกมีความสำคัญเนื่องจากทำให้สามารถกำหนดประเภทของเนื้องอกว่าเป็นมะเร็งหรือเนื้องอกธรรมดาเพื่อทำนายพฤติกรรมของเนื้องอกและวางแผนการรักษาได้อย่างถูกต้อง

ในปัจจุบันการจำแนกชนิดของเนื้องอกผิวหนังในสุนัขสามารถจำแนกโดยการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาตามชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดและพฤติกรรมของเนื้องอก การใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาช่วยในการวินิจฉัยเอื้อประโยชน์ในกลุ่มของเนื้องอกที่มีความผันแปรของรูปร่างเซลล์จนผิดเพี้ยนไปจากเซลล์ต้นตออาจก่อให้เกิดความสับสนและจำแนกยาก หากบนผิวหรือภายในเซลล์เนื้องอกเหล่านั้นมีโครงสร้างชีวโมเลกุลบางอย่าง (tumor markers) เป็น “หมาย” ที่จำเพาะต่อชนิดของเซลล์เนื้องอกซึ่งสามารถแยกได้ด้วยการตรวจหาโครงสร้างดังกล่าวด้วยเทคนิคที่เรียกว่าอิมมูโนฮิสโตเคมี แต่การใช้เทคนิควิธีนี้และแอนติบอดีในทางสัตวแพทย์ยังต้องมีการศึกษาพัฒนาเนื่องจากยังมีความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อในสัตว์แต่ละชนิดและแอนติบอดีที่นำมาใช้ในสัตว์ยังขาดความจำเพาะ เนื่องจากแอนติบอดีที่นำมาใช้ส่วนใหญ่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ทางการแพทย์ และการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการใช้แอนติบอดีแต่ละชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้กับสุนัขยังมีน้อย ในขณะที่การวินิจฉัยเนื้องอกในสุนัขที่ปัจจุบันเริ่มมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเนื่องจากอุบัติการณ์การเกิดเนื้องอกในสุนัขมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemical techniques) ที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการวินิจฉัยเนื้องอกผิวหนังในสุนัข
2. ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อมาร์คเกอร์ที่สำคัญของเซลล์เนื้องอก (tumor markers) ที่ผลิตเพื่อใช้ในการทางการแพทย์ และนำมาประยุกต์ใช้ทางสัตวแพทย์
3. ปรับปรุงเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีให้เหมาะสมสำหรับใช้ในงานวินิจฉัยประจำวันเพื่อให้เกิดความสะดวกรวดเร็วและประหยัด

การตรวจเอกสาร

1. พื้นฐานการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Basic Immunohistochemical technique)

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

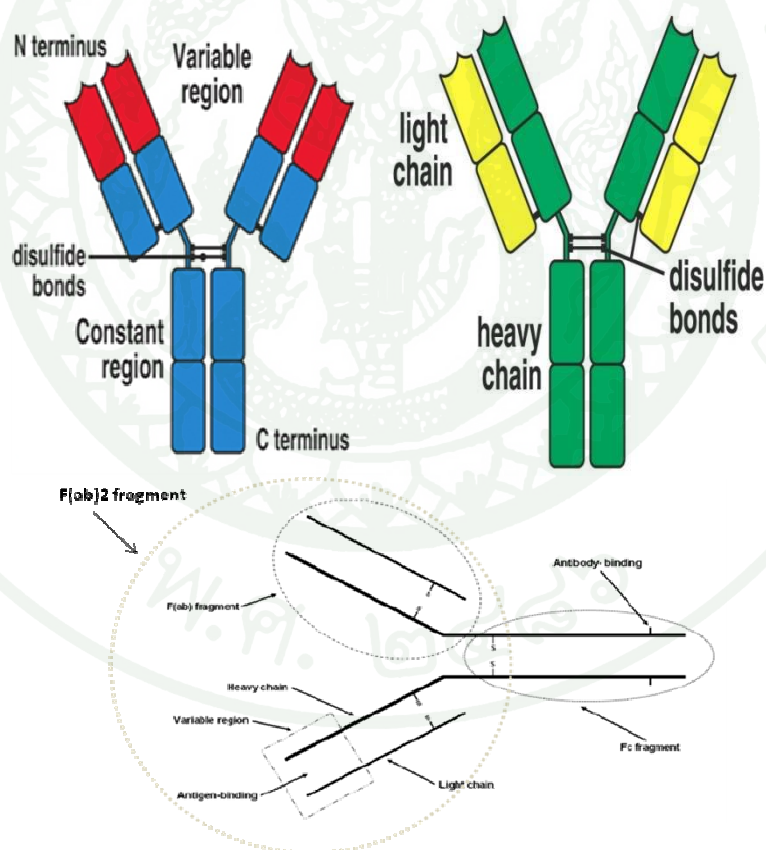
เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อจุดประสงค์สำหรับใช้ในงานวิจัย และช่วยในการวินิจฉัย หลักการพื้นฐานของเทคนิคนี้คือการหาแอนติเจนที่อยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue sections) โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะ (specific antibody) เข้าไปจับกับแอนติเจนเป้าหมายที่อยู่ในเนื้อเยื่อเมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะแสดงปฏิกิริยาเกิดสีจากระบบตรวจวัด (detection system) จากเทคนิคซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา แม้ว่าเทคนิคนี้มีหลักการที่ง่ายแต่วิธีการการทำเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีค่อนข้างซับซ้อนจากขั้นตอนต่างๆ ที่เข้ามาสำหรับช่วยให้เทคนิคมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากที่สุด จากเดิมที่ใช้ simple (direct) methods ซึ่งได้ผลเร็วแต่ขาดความไว ต่อมาได้มีวิิทยายสัญญาณแบบต่างๆ ที่มีความไวในการตรวจหาแอนติเจนเพิ่มขึ้นมาก และการพัฒนาที่สำคัญในระยะยี่สิบปีที่ผ่านมา คือเทคนิคในการกอบกู้แอนติเจน (Antigen retrieval) ที่ถูกรบกวนในระหว่างขั้นตอนการตรึงเนื้อเยื่อ (fixation) ให้กลับคืนมาโดยใช้ความร้อน ทำให้แอนติเจนในชิ้นเนื้อเยื่อที่เคยตรวจไปไม่พบจากเนื้อเยื่อที่ถูกรักษาสภาพด้วยฟอร์มาลินสามารถกลับมาตรวจพบได้มากขึ้น เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นเทคนิคที่สามารถมองเห็นและเก็บรักษาเอาไว้ได้ จึงเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมสำหรับการใช้ในการวินิจฉัยในงานประจำวันและในงานวิจัย (Ramos-Vara, 2005)

1.1 แอนติเจนและแอนติบอดี

เนื่องจากหลักการอิมมูโนฮิสโตเคมี ขึ้นอยู่กับการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะภายในชิ้นเนื้อเยื่อ โดยปกติอิมมูโนโกลบูลิน [immunoglobulin (Ig)] ที่ใช้ในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีได้แก่ IgG

1.1.1 โครงสร้างของแอนติบอดี (Antibody structure)

อิมมูโนโกลบูลินมีลักษณะเป็นรูปตัววาย (Y-shaped) ประกอบด้วย light chains สองเส้นและ heavy chains สองเส้น ส่วนที่เป็น heavy chains เป็นตัวระบุถึง Antibody class ส่วนหางของตัว Y เรียกว่าส่วน Fc ส่วน light chains ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิดจะมีสองแบบเรียกว่า kappa และ lambda ในโมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลิน ส่วน light chains ทั้งสองเส้นและส่วน heavy chains ทั้งสองเส้นจะเป็นชนิดเดียวกัน ส่วนที่เป็น light chains ประกอบด้วยสองส่วนคือส่วนครึ่งที่เป็น C-terminal เป็นส่วนที่ constant จะเรียกว่า CL (constant: light chain) ขณะที่อีกครึ่งหนึ่งเป็น N-terminal ที่จะมีลำดับอะมิโนที่มีความผันแปรจำนวนมากจะเรียกว่าส่วน VL (variable: light chain) ส่วน Fab เป็นส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของอิมมูโนโกลบูลินประกอบด้วยส่วน variable และ constant ของ heavy และ light chains ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินแสดงบริเวณต่างๆที่เกี่ยวข้องในการทำหน้าที่

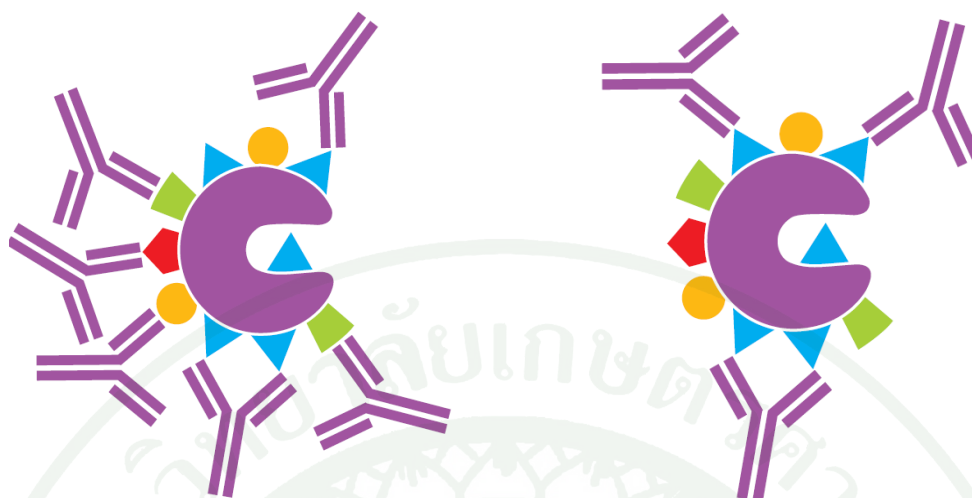
ที่มา: Janeway *et al.* (2005)

ส่วน Fc ของแอนติบอดี มีหน้าที่ช่วยให้แอนติบอดี จับกับแอนติบอดีตัวอื่นๆ จับกับ Fc receptors ของ complement และเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) โดย ส่วนนี้ของอิมมูโนโกลบูลินมีความจำเป็นในหลายขั้นตอนของเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี นอกจากนั้นส่วน Fc ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดการติดสีพื้นหลัง (background staining) เนื่องจากการจับแบบ nonimmune ของแอนติบอดีกับชิ้นเนื้อเยื่อ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวจึงมีแนวโน้มจะมีการใช้เฉพาะส่วน Fab หรือ F(ab)2 ของอิมมูโนโกลบูลิน สำหรับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี แต่ปัญหาคือส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินเป็นตัวที่ช่วยให้แอนติบอดีสามารถจับกับของแข็งเช่นพวกเนื้อเยื่อได้แน่นขึ้น

การจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดในส่วน hypervariable regions ของทั้ง heavy chain และ light chain ของ amino terminus ส่วนของแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนเรียกว่า paratope

ส่วน epitope คือส่วนของแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดี โดย epitope มักเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 5–21 ตัว สิ่งที่สำคัญต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีคือโครงสร้างสามมิติ (tertiary structure) ของ epitope หรือสายโปรตีนที่ขดพับเข้าด้วยกันหรือ ปฏิกริยากับโปรตีนที่อยู่ข้างเคียง โดย paratope จะทำปฏิกริยากับโครงสร้างสามมิติของ epitope ด้วย พันธะอย่างอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ โดยยังมีพันธะเกิดขึ้นมากจะยังทำการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีแน่นมากยิ่งขึ้น IgG เป็น bivalent (มีสองแขนที่ใช้สำหรับจับกับแอนติเจน)

แอนติบอดีสามารถผลิตได้โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ (เช่น หนู กระต่าย แพะ ม้า) ด้วยแอนติเจนที่ทำให้บริสุทธิ์ (purified Ag) สัตว์จะตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนดังกล่าวขึ้น โดย polyclonal antibody นิยมผลิตโดยใช้ กระต่าย ม้า แพะ และไก่ Polyclonal antibody มี affinity สูงกว่าและทำปฏิกริยากับ epitope บนแอนติเจนได้หลากหลายแต่มีความจำเพาะต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ monoclonal antibody นอกจากนั้นการเตรียม polyclonal antibody อาจมีความผันแปรของ antibody titer และคุณภาพแอนติบอดีที่ได้ยังขึ้นอยู่กับสัตว์ที่กระตุ้นด้วย polyclonal antibody อาจพบ cross-reactivity กับ epitope อื่นๆที่คล้ายกันในโปรตีนอื่นดังนั้นทำให้เกิดเป็นผลบวกหลวง (false positive) ได้



ภาพที่ 2 แสดงการจับกันระหว่าง polyclonal antibody ที่จับได้กับแอนติเจนได้หลาย epitopes (ซ้ายมือ) กับการจับกันระหว่างแอนติเจนกับ monoclonal antibody ที่จะจับกับ epitope ชนิดเดียว (ขวามือ)

ที่มา: Key (2006)

1.1.2 Monoclonal Antibody

Monoclonal antibody ส่วนใหญ่ผลิตในหนูถีบจักร ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับการผลิต monoclonal antibody โดยการฉีดด้วยแอนติเจนที่ทำให้บริสุทธิ์ หลังจากที่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็จะเก็บลิมโฟไซต์ชนิดบี (B lymphocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีจากม้าม เนื่องจากลิมโฟไซต์ ที่แยกได้มีช่วงอายุที่จำกัดจึงได้นำไปรวมเข้า (fused) กับ mouse myeloma cells และตามด้วยการคัดเลือกเซลล์ที่เป็นลูกผสม (hybridoma) จำเพาะที่ต้องการ โดยเซลล์ลูกผสมที่ได้จะเป็นเซลล์ที่ไม่ตาย (immortal cell) และสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับ epitope เดียว ที่เรียกว่า monoclonal antibody ซึ่งมีความจำเพาะและความบริสุทธิ์มากกว่า polyclonal antibody ช่วยทำให้การข้อมติพื้นหลังที่ไม่จำเพาะลดลง (Ramos-Vara, 2005)

1.2 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Antigen-Antibody interactions)

จากลักษณะทางเคมีและชีวเคมีพบว่าปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี พบว่าแรงที่เกี่ยวข้องเป็นพันธะอย่างอ่อน (ส่วนใหญ่เป็น hydrophobic และ electrostatic) ซึ่งไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ได้แก่

1.2.1 แรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) ที่มีแรงตึงผิว (surface tensions) น้อยกว่าน้ำซึ่งอาจเป็นแรงที่เกิดระหว่างอะตอม (interatomic) หรือระหว่างโมเลกุล (intermolecular) โดยแรงไฮโดรโฟบิกพบได้ในส่วนโซ่ข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนชนิด phenylalanine tyrosine และ tryptophan เนื่องจากมีแรงดึงดูดกับโมเลกุลน้ำต่ำกว่า กรดอะมิโนเหล่านี้จึงมีแนวโน้มที่จะเชื่อมกับกรดอะมิโนอีกตัว

1.2.2 ปฏิสัมพันธ์ไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างด้านที่มีประจุหนึ่งหรือประจุมากกว่าที่อยู่บน epitope ของประจุที่ตรงข้ามที่อยู่บน active site ของแอนติบอดี โดยทั่วไปจะเป็นหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) และหมู่อะมิโน (amino) ของกลุ่มอะมิโนที่มีขั้ว (polar amino acids) ของโมเลกุลแอนติเจนและแอนติบอดี

1.2.3 แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals forces) เป็นแรง electrostatic อย่างอ่อนระหว่างโมเลกุลหรืออะตอมที่มีขั้วสองโมเลกุล โดยแรงแวนเดอร์วาลส์ และแรงดึงดูด electrostatic จะมากที่สุดที่ระยะทางสั้นที่สุด ดังนั้น การวางตำแหน่งที่ถูกต้องแม่นยำของประจุที่ตรงข้ามกันบน epitopes และ paratopes จะทำให้เกิดพันธะ electrostatic ที่แข็งแรง

1.2.4 พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) เป็นผลของปฏิกิริยาระหว่างสองขั้ว (dipole interactions) ระหว่าง หมู่ OH และ C=O, NH และ C=O, NH และ OH พลังงานที่ใช้ในการจับจะมีลักษณะคล้ายกับแรงแวนเดอร์วาลส์และปฏิสัมพันธ์ไฟฟ้าสถิต ซึ่งมีผลทำให้การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ไม่น่าจะเนื่องจากจำเป็นต้องมีความแม่นยำพอดีระหว่างทั้งสองโมเลกุลจึงจะจับกันได้ แม้ว่ากรณีที่มีแรงเพียงชนิดเดียวที่สำคัญต่อการจับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในแอนติเจนที่ประกอบด้วย พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และ โพลีเปปไทด์ (polypeptide) เป็นส่วนใหญ่ พันธะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเป็นแรงแวนเดอร์วาลส์และปฏิสัมพันธ์ไฟฟ้าสถิตร่วมกัน

แอนติบอดีส่วนใหญ่ยกเว้น IgM เป็น divalent ส่วนโปรตีนส่วนใหญ่ในแอนติเจนเป็น multivalent โดย valency site แต่ละตำแหน่งของโปรตีนแอนติเจนโดยทั่วไปเป็น epitope ที่มีรูปร่าง (configuration) ต่างกันอย่างสมบูรณ์จาก valency site อื่นๆ ทั้งหมด (เช่น แอนติบอดีชนิดโมโนโคลน (monoclonal antibody) สามารถทำปฏิกิริยากับ valency site เดียวของโปรตีนแอนติเจนนั้น) Affinity เป็นการแสดงลักษณะทางพลังงาน (thermodynamic) ในการจับกันของแอนติบอดีในส่วนที่เรียกว่า paratope กับแอนติเจนส่วน epitope โดยใช้ค่า Affinity อาจแสดงเป็นค่าทางคณิตศาสตร์เป็นค่าคงที่ affinity constant (K_A) ที่สามารถคำนวณได้ดังสมการ



$$K_A = \frac{[Ag \sim Ab]}{[Ag] \cdot [Ab]}$$

ภาพที่ 3 แสดงค่า K_A ที่ใช้แสดงถึงปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จับกันที่เกิดขึ้นที่ภาวะสมดุล

ที่มา: Ramos-Vara (2005)

ช่วงของค่าคงที่ affinity แอนติเจนแอนติบอดีมีช่วงค่อนข้างกว้างและผันแปรตั้งแต่ต่ำกว่า 10^5 liters/mol จนถึง 10^{12} liters/mol โดยตัวเลขดังกล่าวหมายถึงแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดการจับกัน ที่มีค่า K_A เท่ากับ 10^{12} liters/mol มี affinity มากกว่าการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีค่า K_A เท่ากับ 10^9 liters/mol 1,000 เท่า โดยค่า affinity ของปฏิกิริยาในการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี มีความสำคัญเนื่องจากแอนติบอดีที่มี affinity สูงจะสามารถจับกับแอนติเจน ได้มากกว่าโดยใช้เวลาน้อยกว่า ในแอนติบอดีที่มี affinity ต่ำ และโดยทั่วไป affinity ที่มากกว่าจะสามารถเจอจากแอนติบอดีเพิ่มขึ้นได้มากกว่า

1.3 แอนติเจน

สำหรับแอนติเจนที่จะทำการตรวจหาโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีนั้นจะหมายถึงชีวโมเลกุลหรือเชื้อที่อยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อที่สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และสามารถนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้ ในการศึกษาแอนติเจนที่จะเป็นหมายของแอนติบอดีจำเพาะได้แก่โปรตีน intermediate filament ชนิด vimentin และ cytokeratin

1.4 การตรึงเนื้อเยื่อ (Fixation)

การรักษาสภาพเนื้อเยื่อ เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากสำหรับเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยาเพื่อให้สามารถรักษารูปร่างประกอบของเซลล์ รวมทั้งส่วนที่ละลายอยู่ในเซลล์และโครงสร้างโปรตีนของเซลล์ รวมถึงช่วยไม่ให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จนทำให้ส่วนประกอบของเซลล์ผิดไปจากตำแหน่งปกติ และคงส่วนประกอบของเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายไปเมื่อผ่านขั้นตอนเตรียมเนื้อเยื่อ (processing) ซึ่งช่วยให้มีการติดสีและการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีได้ผลดี สารที่ใช้สำหรับการตรึงเนื้อเยื่อ (fixative) เพื่อรักษาสภาพที่ใช้ทางจุลพยาธิวิทยา คือ cross-linking (noncoagulating) fixatives และ coagulating fixatives

1.4.1 สารรักษาสภาพกลุ่มที่เป็น cross-linking fixatives

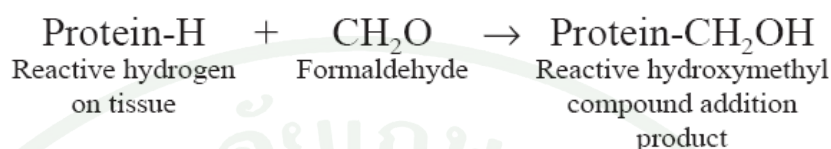
ฟอร์มาลีน (Formaldehyde) เป็นสารตรึงเนื้อเยื่อ ที่นิยมใช้ในงานจุลกายวิภาคประจำวันและในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ฟอร์มาลีนจะช่วยคงสภาพเปปไทด์หลักและโครงสร้างทั่วไปของ cellular organelles นอกจากนั้นยังทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกแต่มีผลกับพวกคาร์โบไฮเดรตน้อย

ฟอร์มาลีนสามารถจับกับกรดอะมิโนดังต่อไปนี้คือ lysine, tyrosine, asparagines, histidine, arginine, cysteine และ glutamine กลไกพื้นฐานของการตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลีนคือการเกิดผลผลิตระหว่างฟอร์มาลีน และกลุ่ม reactive amino ที่ไม่มีประจุ ($-NH$ หรือ NH_2) เกิดเป็นรูป cross links ขึ้นและเมื่อมี reactive hydrogen ตัวต่อไปมาทำปฏิกิริยาจะทำให้ hydroxymethyl group เกิดเป็นรูป methylene bridge ผลสุดท้ายที่ได้จากการรักษาสภาพด้วยฟอร์มาลีนคือมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งอาจทำให้แอนติบอดีไม่สามารถจับกับ โปรตีนที่เป็น

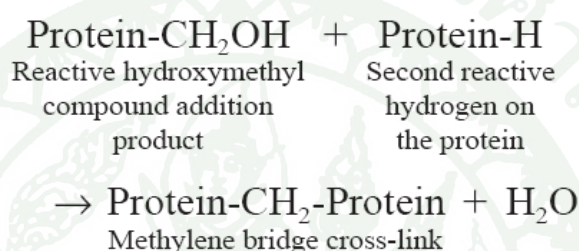
แอนติเจนได้เนื่องจาก การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติ (tertiary structure) ของโปรตีนดังภาพที่

4

1. Formation of addition products



2. Formation of methylene bridges



ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เป็นผลจากการใช้ฟอร์มาลีน

ที่มา: Ramos-Vara (2005)

ขณะที่โครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิ เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยมากโดยผลของฟอร์มาลีน มีผลมากขึ้นตามระยะเวลาที่ชิ้นเนื้อถูกเก็บรักษาในฟอร์มาลีน ถ้าชิ้นเนื้อแช่อยู่ในฟอร์มาลีนนานเกินไปอาจทำให้เกิดผลลบลงได้เมื่อนำไปตรวจด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเนื่องจากการเกิด cross-link มากเกินไปจนบดบังส่วนแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา อย่างไรก็ตามการรักษาสภาพอาจทำให้เกิดผลที่ไม่สามารถคาดการณ์ได้ ผลของการรักษาสภาพที่ต้องคำนึงถึงคือขนาดของตัวอย่าง ผลของฟอร์มาลีนต่อแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่เนื้อเยื่อเก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลีน

การเก็บเนื้อเยื่อที่รักษาสภาพโดยใช้ฟอร์มาลีนในแอลกอฮอล์ จะช่วยลดการเกิด cross-link ได้จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในกรณีที่ต้องการตรวจหาแอนติเจน ถ้าเนื้อเยื่อนั้นต้องตรวจด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อไป

1.4.2 Fixatives อื่นๆ

ปัญหาจากการใช้ฟอร์มาลิน คือ ทำให้เกิดการสูญเสีย immunoreactivity โดยเฉพาะก่อนที่จะมีการพัฒนาวิธีการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน (Antigen Retrieval) ด้วยการใช้ความร้อนขึ้นมานักวิจัยได้พยายามหาสารเคมีอื่นๆ สำหรับใช้รักษาสภาพ เพื่อใช้เป็นทางเลือก สารที่นำมาทดแทนฟอร์มาลิน ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม coagulating fixatives ที่จะทำให้โปรตีนตกตะกอนด้วยการแตกพันธะไฮโดรเจน และไม่ได้ทำให้โปรตีนเกิด cross-link โดยทั่วไป non-cross-linking fixative คือ เอทานอล (ethanol) โปรตีนส่วนใหญ่ในร่างกายมีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moieties) ในขณะที่น้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำเมื่อสัมผัสกันจะทำให้เกิดความคงตัวของพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond) การกำจัดน้ำโดยเอทานอล จะทำให้พันธะไฮโดรโฟบิกของโปรตีนเสียความคงตัวเนื่องจากบริเวณที่ไม่ชอบน้ำเป็นอิสระ และโครงสร้างสามมิติของโปรตีนไม่มีการขดพับในเวลาเดียวกันการกำจัดน้ำออกจะทำให้พันธะไฮโดรเจนไม่คงตัวในบริเวณส่วนที่ชอบน้ำ ได้โปรตีนเสียสภาพ (denaturation) เป็นผลผลิตสุดท้าย ในปัจจุบันยังไม่มีสารที่ใช้รักษาสภาพที่สามารถรักษา immunoreactivity ของ epitope แต่ละชนิดให้ดีที่สุดเพื่อใช้สำหรับทำเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Ramos-Vara, 2005)

ปัจจุบันงานวิจัยประจำวันนิยมใช้ ฟอร์มาลินเป็นสารรักษาสภาพเนื่องจากสามารถรักษารูปร่างทางจุลกายวิภาคได้ดีทำให้มีความน่าเชื่อถือในงานด้านจุลพยาธิวิทยาทั่วไป และราคาถูกส่วนผลการลบเลือนไปของแอนติเจนบางชนิดเมื่อนำไปตรวจด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี สามารถแก้ไขได้ด้วยเทคนิคการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน (Grizzle *et al.*, 2008)

1.5 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (Tissue processing)

การรักษาสภาพและกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processing) ให้อยู่ในรูปพาราฟินบล็อก มีความสำคัญต่อผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ อาจมีผลต่อการรักษาความเป็นแอนติเจน (antigenicity) เชื่อว่าผลจาก cross-linking fixatives รวมกับความร้อนและสารละลายที่ไม่มีขั้ว (nonpolar solvents) ที่ใช้ใน paraffin embedding จะมีผลต่อโครงร่าง (conformation) ของแอนติเจนอาจมีผลทำให้ส่วนของ epitope ไม่สามารถถูกแอนติบอดีจดจำได้ แม้ว่า epitopes เดียวกันนั้นจะสามารถตรวจพบได้จากเนื้อเยื่อแช่แข็ง (frozen section) แต่อาจตรวจไม่พบจากเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการเตรียมให้อยู่ในรูปพาราฟินบล็อก

หลักการเตรียมเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปพาราฟินบล็อก (Tissue processing) เป็นขั้นตอนดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ และนำสารค้ำจุน (support medium) เข้าไปทดแทนเพื่อช่วยให้แข็งพอที่จะสามารถตัดให้เป็นชิ้นบางๆได้ โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้คือการดึงน้ำออก (Dehydration) เป็นการนำน้ำและสารรักษาสภาพออกจากเนื้อเยื่อ ขั้นตอนต่อมาเรียกว่า Clearing คือการนำสารละลายที่ดึงน้ำออกออกไปเพื่อทำให้องค์ประกอบในชิ้นเนื้อเยื่อยอมให้พาราฟินแทรกเข้าได้ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อจะแข็งเนื่องจากพาราฟินที่แทรกเข้าไปช่วยค้ำจุนโครงสร้างเนื้อเยื่อ (Spencer and Bancroft, 2008)

1.6 การเปิดปฏิริยาแอนติเจน (Antigen retrieval)

ขั้นตอนการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ มักจะมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของโปรตีนของแอนติเจน มีผลให้ไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ เป็นปัญหาที่สำคัญของการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี การพัฒนาวิธีที่จะทำให้แอนติเจนที่ไม่สามารถตรวจพบได้เนื่องจากความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการรักษาสภาพกลับมาตรวจพบได้อีกครั้ง เป็นขั้นตอนที่ได้มีการพัฒนาอย่างกว้างขวางและต่อเนื่องโดยเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้จะเรียกโดยทั่วไปว่าการเปิดปฏิริยาแอนติเจน (antigen retrieval) ขั้นตอนการเปิดปฏิริยาแอนติเจน มีความจำเป็นมากโดยเฉพาะในกรณีที่เนื้อเยื่อถูกรักษาสภาพด้วยสารรักษาสภาพกลุ่ม cross-linking fixatives มีข้อมูลระบุว่าแอนติเจนประมาณ 85% จำเป็นต้องทำการเปิดปฏิริยาแอนติเจนที่เหมาะสม การเลือกวิธีการทำการเปิดปฏิริยาแอนติเจน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนเพียงอย่างเดียวแต่ต้องคำนึงถึงชนิดของแอนติบอดีที่จะใช้ด้วยเนื่องจากก่อนหน้านี้มีรายงานว่า Polyclonal Antibody จะสามารถตรวจหาแอนติเจน ได้ดีกว่า monoclonal antibody ในกรณีที่ไม่ได้ทำขั้นตอนการเปิดปฏิริยาแอนติเจน โดยทั่วไปขั้นตอนการเปิดปฏิริยาแอนติเจนที่เข้าร่วมกับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี มีสองแบบคือ การใช้เอนไซม์ (enzymatic) และการใช้ความร้อน (heat-based retrieval) (D'Amico *et al.*, 2009)

1.6.1 การเปิดปฏิริยาแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์

การเปิดปฏิริยาแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน [Protease-induced epitope retrieval (PIER)] เป็นวิธีที่มีรายงานว่าเป็นวิธีการเปิดปฏิริยาแอนติเจน ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายก่อนที่จะมีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ความร้อนขึ้น มีเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้สำหรับจุดประสงค์นี้ได้แก่ trypsin, proteinase K, pronase และ pepsin กลไกของการเปิดปฏิริยาแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์ คือเกิดการย่อยโปรตีน แต่การย่อยจะเกิดแบบไม่จำเพาะดังนั้นอาจมีผลให้แอนติเจนบางชนิดตรวจไม่

พบได้จากการใช้วิธีนี้ ผลของการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับเอนไซม์ อุณหภูมิ และค่า pH ของสารละลาย รวมถึงระยะเวลาที่เนื้อเยื่อแช่อยู่ในฟอร์มาลิน ซึ่งโดยทั่วไปเวลาที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์จะพิกัดกับระยะเวลาที่เนื้อเยื่อแช่อยู่ในฟอร์มาลิน ข้อดีของการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน คือมีแอนติเจนเพียงไม่กี่ชนิดที่เหมาะสมกับการทำการเปิดปฏิกิริยาด้วยวิธีนี้และอาจมีผลทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อเปลี่ยนแปลง และอาจทำลายส่วนที่เป็น epitope ได้ (Pileri *et al.*, 1997)

1.6.2 การเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้ความร้อน (Heat-induced epitope retrieval)

วิธีการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้ความร้อน [Heat-induced epitope retrieval (HIER)] ได้พัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสำหรับหาแอนติบอดีที่หายไปในช่วงตอนการรักษาสภาพ ใน cross-linking fixatives เช่น ฟอร์มาลิน (Shi *et al.*, 1997)

วิธีการเปิดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อนนี้ ได้พัฒนามาจากหลักการของ Fraenkel-Conrat และคณะที่ระบุว่าปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนและฟอร์มาลินสามารถผันกลับได้ในบางส่วนด้วยการใช้อุณหภูมิสูง หรือการใช้ด่างแก่ (Ramos-Vara, 2005) กลไกที่เกี่ยวข้องในการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้ความร้อน ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่ผลสุดท้ายคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ได้เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการรักษาสภาพให้กลับคืนมาได้ การให้ความร้อนสามารถเปิด epitope ที่ถูกดบังโดยเกิดการ hydrolysis ในส่วน methylene cross-links นอกจากนั้นยังมีปฏิกิริยาอื่นที่ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดด้วย เนื่องจากวิธีนี้สามารถช่วยให้ผลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อที่รักษาสภาพโดยเอทานอลดีขึ้นด้วย ทั้งที่เนื้อเยื่อที่รักษาสภาพด้วยเอทานอล ไม่ได้เกิด cross-links นอกจากนั้นยังมีสมมติฐานว่ามีการดึงเอาโปรตีนที่ขัดขวาง (blocking proteins) ที่แทรกอยู่ออก การตกตะกอนโปรตีนการเอาน้ำคืนกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydration) จะช่วยให้แอนติบอดีสามารถแทรกซึมได้ดีขึ้น รวมทั้งสมมติฐานเกี่ยวกับการที่ความร้อนทำให้เกิด เคลื่อนของพาราฟินเล็กน้อย การให้ความร้อนอาจทำที่อุณหภูมิสูง (100 °C) ในช่วงเวลาสั้น (10 นาที) ที่มีรายงานว่าได้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในเวลานานกว่า อย่างไรก็ตามผลที่เหมาะสมอาจต้องทำการทดสอบในแอนติเจนแต่ละชนิด สำหรับสารละลายที่ใช้ในการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้ความร้อน ยังใช้ได้ไม่แน่นอนดังนั้นก็จะมี สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาเปิดแอนติเจน (HIER solutions) หลายชนิด เช่น citrate, TBS และมี pH ที่ผันแปร (3–10) pH ของสารละลายมีความสำคัญในแอนติเจนบางตัวอาจสามารถกลับคืนมาได้ ด้วยสารละลายที่ pH ต่ำหรือบางตัวต้องใช้สารละลายที่ pH สูง บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยใช้ความร้อน

ร้อนทำได้แก่ 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) ซึ่งมีรายงานว่าได้ผลที่เหมาะสม และช่วยคงรูปร่างลักษณะของเซลล์ได้ดี ผลของการทำการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนขึ้นอยู่กับการรักษาสภาพซึ่งเป็นสิ่งสำคัญมากต่อผลการตอบสนองของแอนติเจนเมื่อทำการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน โปรตีนที่ไม่ถูกรักษาสภาพจะเสียสภาพ (denatured) ที่อุณหภูมิ 70–90 °C ขณะที่จะไม่พบการเสียสภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิเดียวกันเมื่อโปรตีนถูกรักษาสภาพด้วยฟอร์มาลีน นอกจากนั้นฟอร์มาลีนยังป้องกันการเสียสภาพในระหว่างการทำการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนอีกด้วย (Ramos-Vara, 2005)

1.6.3 การศึกษากลไกของการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน

D'Amico *et al.* (2009) ได้รวบรวมกลไกที่เป็นไปได้ของปฏิกิริยาการเปิดแอนติเจน ดังต่อไปนี้คือ การแตก cross linkage ที่เกิดจากฟอร์มาลีนและโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง การดึงโปรตีนที่เข้าไปแทรกขัดขวางอยู่ออกไป ช่วยทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนและการนำน้ำกลับคืนเข้าสู่เนื้อเยื่อจึงมีผลทำให้แอนติบอดีสามารถแทรกเข้าไปได้ถึง epitopes ได้ดีขึ้นในขณะที่ทฤษฎี “breaking crosslinking” ของ Cattoretti *et al.* (1993) เชื่อว่าทฤษฎี “protein denaturation” เป็นสิ่งที่ทำให้พบแอนติเจนที่อาจเสียกลับคืนมาหลังจากที่ทำการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนด้วยความร้อน

โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนขึ้นกับโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) หรือลำดับของกรดอะมิโน โดยทั่วไปถ้าโครงสร้างปฐมภูมิ ของโปรตีนจะไม่เกิดความเสียหาย สามารถย้อนกลับคืนเป็นโครงสร้างตติยภูมิเริ่มแรกได้ถ้ามีขั้นตอนการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนที่เหมาะสม เนื่องจากการเกิด cross-link เป็นขบวนการที่ซับซ้อนขึ้นอยู่กับการปัจจัยเช่น ค่า pH อุณหภูมิ และสภาวะการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหลากหลายอย่างหลากหลาย ดังนั้นจึงควรต้องมีการทดสอบให้ได้วิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด แม้ว่าเทคนิคการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน ยังอยู่ในขั้นตอนกำลังพัฒนาแต่ได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี การศึกษาถึงกลไกของการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนแต่ละชนิดยังต้องพัฒนาให้มีมาตรฐานต่อไปซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาในแง่พยาธิวิทยา ทั้งในด้านพยาธิวิทยาและ การวิเคราะห์โครงสร้าง

1.7 ระบบการตรวจหา (Detection Systems)

ปฏิกิริยาของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นไม่สามารถมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดาได้โดยตรง ต้องมีการติดฉลาก (labeled) เพื่อเป็นตัวรายงาน (reporter molecule) ผลการเกิดปฏิกิริยาโดยฉลาก ที่ถูกติดกับแอนติบอดี ที่เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ทุติยภูมิ หรือตติยภูมิตามลักษณะของระบบการตรวจหา (detection system) ที่ใช้เพื่อให้สามารถมองเห็นปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีได้ ฉลากที่นิยมใช้ในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีคือเอนไซม์ เช่น peroxidase, alkaline phosphatase, glucose oxidase เอนไซม์จะมีตัวย่อย (substrate) จำเพาะเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะเกิดเป็นสี (chromogen) ในบริเวณที่มีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเกิดขึ้น การเลือกระบบการตรวจวัด มีความสำคัญมากเนื่องจากความไวของเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีขึ้นอยู่กับระบบการตรวจวัดที่ใช้

ระบบการตรวจวัดสามารถแบ่งได้เป็น วิธี direct และวิธี indirect ดังนี้

1.7.1 Direct methods

เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด โดยเกิดปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวโดยติดฉลากที่ใช้รายงานผลกับแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ที่ใช้จับกับแอนติเจนโดยตรง สามารถใช้ฉลากได้หลากหลายทั้ง fluorochromes, enzymes, colloidal gold และ biotin เป็นวิธีที่เร็วแต่มีความไวต่ำสำหรับการหาแอนติเจนส่วนใหญ่ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อในงานประจำวัน

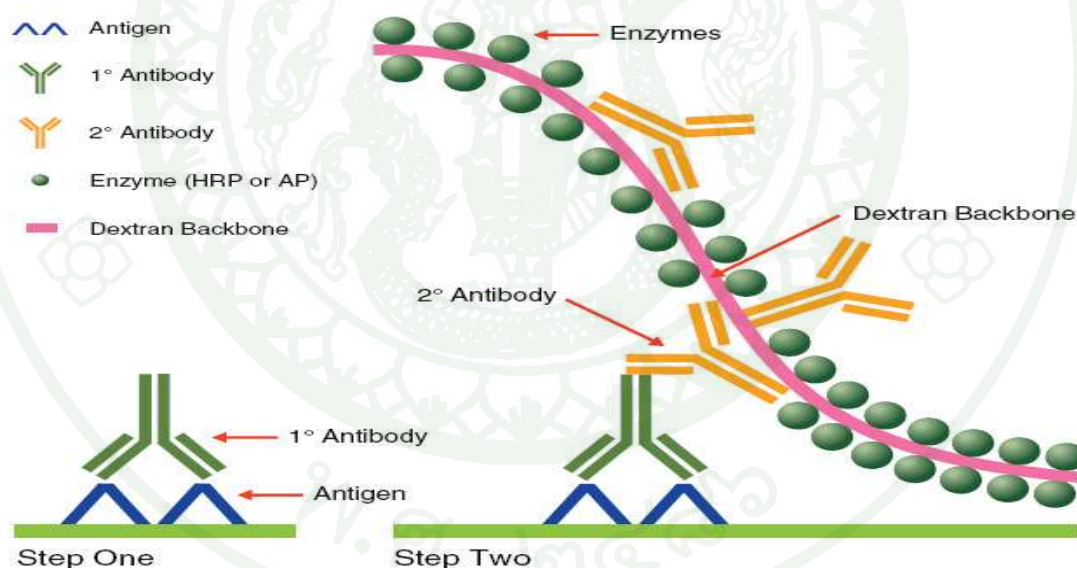
1.7.2 Indirect methods

เพื่อให้เพิ่มความไวในการตรวจวัดแอนติเจน (antigen detection) ที่ Coons และคณะได้พัฒนาขึ้นเป็นวิธีการสองขั้นตอน (two-step method) โดยขั้นแรกจะเป็นแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ที่ไม่ได้ติดฉลาก แต่แอนติบอดีต่อแอนติบอดีตัวแรก (secondary antibody) นั้นจะถูกติดฉลาก ความไวของวิธีนี้จะสูงกว่าแบบ direct method เนื่องจาก primary antibody ที่ไม่ถูกติดฉลากจะยังคงมี activity และมีผลให้เกิดสัญญาณแรงขึ้น และจำนวนของฉลาก (เช่น peroxidase) ต่อโมเลกุลของ primary antibody จะสูงขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจึงมีผลให้สามารถตรวจพบ แอนติเจนที่มีอยู่ ปริมาณน้อยหรือสามารถเจือจาง primary antibody เพิ่มขึ้นได้ เพราะจะมี

แอนติบอดี ที่ติดฉลากอย่างน้อยสองตัวที่สามารถจับกับโมเลกุล primary antibody ได้ วิธีนี้จะสะดวกกว่า direct method เนื่องจาก secondary antibody ที่เหมือนกันสามารถใช้ตรวจหา primary antibody ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต่างกันได้

1.7.3 Polymeric labeling two-step method

วิธีนี้จะเป็นการติดฉลากส่วนที่เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อแอนติบอดีตัวแรกโดยใช้ สายที่เป็นสารจำพวกโพลีเมอร์ (polymer) ที่มีเอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะอยู่ วิธีนี้มีข้อดีคือทำได้สะดวกเมื่อเทียบกับวิธีการใช้วิธีขยายสัญญาณอื่นๆ เช่น Avidin-biotin complex (ABC) หรือ วิธี Labeled streptavidin biotin (LSAB) ที่ได้ผลที่มีความไวเท่ากันหรือน้อยกว่า รวมทั้งวิธีนี้ทำให้เกิดการย้อมติดพื้นหลังที่ไม่จำเพาะจาก biotin หรือ avidin ที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้อยกว่า แต่วิธีนี้เป็นวิธีใหม่ที่มีราคาค่อนข้างสูง



ภาพที่ 5 แสดงแบบจำลอง Polymeric labeling two-step method

ที่มา: Key (2006)

การเพิ่มความไวของระบบการตรวจวัดแอนติเจนนั้นมีวิธีการตรวจหาที่ใช้ได้ดีสำหรับการตรวจหาแอนติเจนจำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตามวิธีส่วนใหญ่จะมีราคาแพงดังนั้นจึงมีทางเลือกอื่นที่ใช้ในกรณีที่ใช้วิธีมาตรฐาน (เช่น PAP, ABC, LSAB) ที่มีรายงานเช่นการใช้หลายวิธีร่วมกันหรือการทำซ้ำในบางขั้นตอน การเพิ่มระยะเวลาการสัมผัสกันของแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถทำได้ (Ramos-Vara, 2005)

1.7.4 สีของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Color of the Ag-Ab reaction)

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดยใช้ การติดฉลากโดยใช้เอนไซม์ โดยเฉพาะ peroxidase และ alkaline phosphatase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีสับสเตรท (substrate) จำเพาะเมื่อถูกเอนไซม์ย่อยจะเกิดเป็นสีที่มองเห็นได้ การเลือกเอนไซม์และสารสับสเตรทที่ทำให้เกิดสี ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ ความเข้มของปฏิกิริยา บริเวณที่แอนติเจนอยู่ มีการมีเม็ดสีภายในเนื้อเยื่อ (endogenous pigments) mounting media ที่ใช้

กรณีที่เอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวติดฉลากเป็นเอนไซม์ horseradish peroxidase นิยมใช้ chromogen ดังนี้

ก. 3'3'diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogen ชนิดนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ peroxidase จะเกิดเป็นสีน้ำตาลและไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ แต่ในกรณีที่เนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจมี endogenous peroxidase สูงมาก หรือมีเม็ดสีเมลานิน ชัดเจน DAB เป็น chromogen ที่ไม่เหมาะสมสามารถเลือกใช้ chromogens อื่นหรือการติดฉลากโดยใช้ alkaline phosphatase แทน

ข. 3-Amino-9- ethylcarbazole (AEC) เป็น chromogen อีกตัวที่ใช้กับ peroxidase จะเกิดสีแดงแต่ต้องระวังไว้เสมอในกรณีที่ใช้สารนี้เป็น chromogen คือในขั้นตอนที่จะปิดสไลด์ด้วย coverslip ต้องใช้ medium ที่ละลายในน้ำ (เนื่องจากสีที่ตกตะกอนจะละลายออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents))

ค. 4-Chloro-1 naphthol จะตกตะกอนเกิดเป็นสีน้ำเงินที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

กรณีที่ใช้เอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวติดฉลากเป็นเอนไซม์ alkaline phosphatase นิยมใช้ chromogen ดังนี้

ก. 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazoliumchloride (BCIP/NBT; blue, permanent media)

ข. Fast red (red, aqueous mounting media)

ค. New fuchsin (fuchsin, permanent media) เป็น chromogens ที่นิยมใช้ alkaline phosphatase เป็นตัวที่แนะนำให้ใช้ในการทำ immunocytochemistry สำหรับตัวอย่างในการตรวจเซลล์วิทยา (cytological specimens)

การเลือก counterstain ขึ้นอยู่กับสีของ immune reaction เป็นหลัก โดย counterstain ควรจะตัดกับ chromogen precipitate เพื่อไม่ให้เกิดความสับสน counterstains ที่นิยมใช้คือ hematoxylin (blue), methyl green (green) และ nuclear fast red (red) counterstain ต้องเป็นสีอ่อนที่ไม่รบกวน chromogen precipitate ที่เกิดขึ้น (Renshaw, 2007)

1.8 สรุปพื้นฐานการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในด้านสัตวแพทย์สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อทั้งในแง่การวินิจฉัยโรคและในงานวิจัยแต่เนื่องจากการใช้เทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับหลายขั้นตอนที่สำคัญที่ต้องพัฒนาเพื่อให้เหมาะสมและได้มาตรฐาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางสัตวแพทย์ที่ต้องมีการทดสอบเพื่อให้แต่ละขั้นตอนในสัตว์แต่ละชนิดมีความเหมาะสม รวมทั้งการประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่มีอยู่อย่างมีประสิทธิภาพและพัฒนาแอนติบอดีที่เฉพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิดก็ยังเป็นสิ่งที่ควรให้ความสนใจและศึกษาต่อไป (Ramos-Vara *et al.*, 2008)

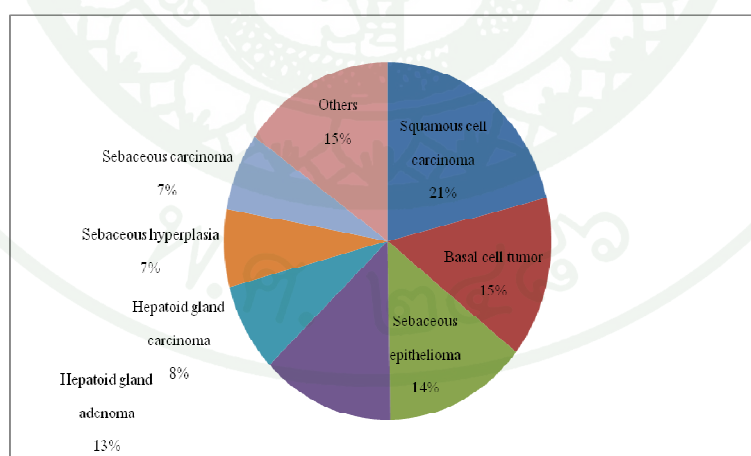
2. เนื้องอกผิวหนังในสุนัข

เนื้องอกผิวหนังในสุนัข เป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีแนวโน้มของอุบัติการณ์ของโรคสูงขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบันเนื้องอกผิวหนังในสุนัขสามารถจำแนกโดยการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา การจำแนกกลุ่มของเนื้องอกผิวหนังจำแนกตามเซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกออกเป็นกลุ่มเนื้องอกจากเซลล์บุผิว (epithelial tumors) และเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal tumors) และเนื้องอกกลุ่มเซลล์รูปร่างกลม (round cell tumors) และยังมีการจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อยตามระยะของโรคเพื่อช่วยในการทำนายพฤติกรรมของเนื้องอกซึ่งช่วยในแง่การพยากรณ์โรค และวางแผนการรักษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาเนื้องอกชนิดร้ายแรงมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และมีความจำเพาะจำเป็นอย่างยิ่งต้องการวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น การศึกษานี้จะเน้นเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์บุผิวและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบบ่อยแต่จะไม่กล่าวถึงเนื้องอกในกลุ่ม round cell tumors โดยข้อมูลเนื้องอกที่พบบ่อยจากรายงานและการเก็บรวบรวมข้อมูลจากหน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ปี 2548-2550 และจากรายงานการเก็บข้อมูลย้อนหลังเนื้องอกที่พบได้บ่อยในเขตกรุงเทพมหานคร (อนุเทพ และคณะ 2546) รวมทั้งข้อมูลของ Withrow และ Vail (2007) ดังตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงเนื้องอกผิวหนัง ที่พบบ่อย 10 อันดับแรก ในสุนัข (N=6,282)

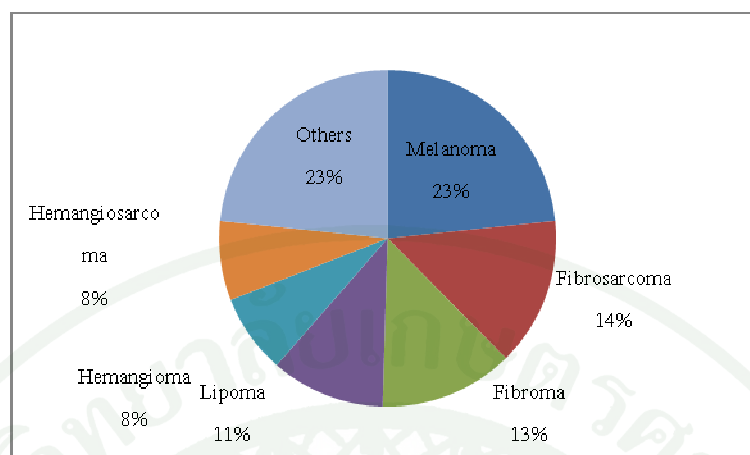
ชนิดของเนื้องอก	จำนวนที่พบ (ร้อยละ)
MCT (Mast Cell Tumor)	18.8
Hepatoid (perianal)	10.1
Adenoma/adenocarcinoma	
Lipoma	7.1
Sebaceous hyperplasia	6.7
Squamous cell carcinoma	6.2
Melanoma	6.2
Fibrosarcoma	6.1
Basal cell tumor	4.6
Hemangiopericytoma	4.4

ที่มา: Withrow and Vail (2007)



ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงสัดส่วนของ Epithelial tumors ที่พบในปี 2548-2550

ที่มา: ไชยยันต์ (2551)



ภาพที่ 7 แผนภูมิแสดงสัดส่วนของ Mesenchymal tumors ปี 2548-2550

ที่มา: ไชยยันต์ (2551)

2.1 กลุ่มเนื้องอกจากเซลล์บุผิว (Epithelial tumors)

2.1.1 Basal cell tumors

Basal cell tumors เป็นเนื้องอกพัฒนามาจากเซลล์ pluripotential basal epithelial โดยปกติ basal epithelial cells จะพัฒนาเป็นผิวหนัง เนื้องอกชนิด Basal cell tumors พบได้บ่อยในสุนัข อายุโดยเฉลี่ยของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้อยู่ที่ 8 ปี Basal cell tumors เป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง

ลักษณะมหพยาธิวิทยา

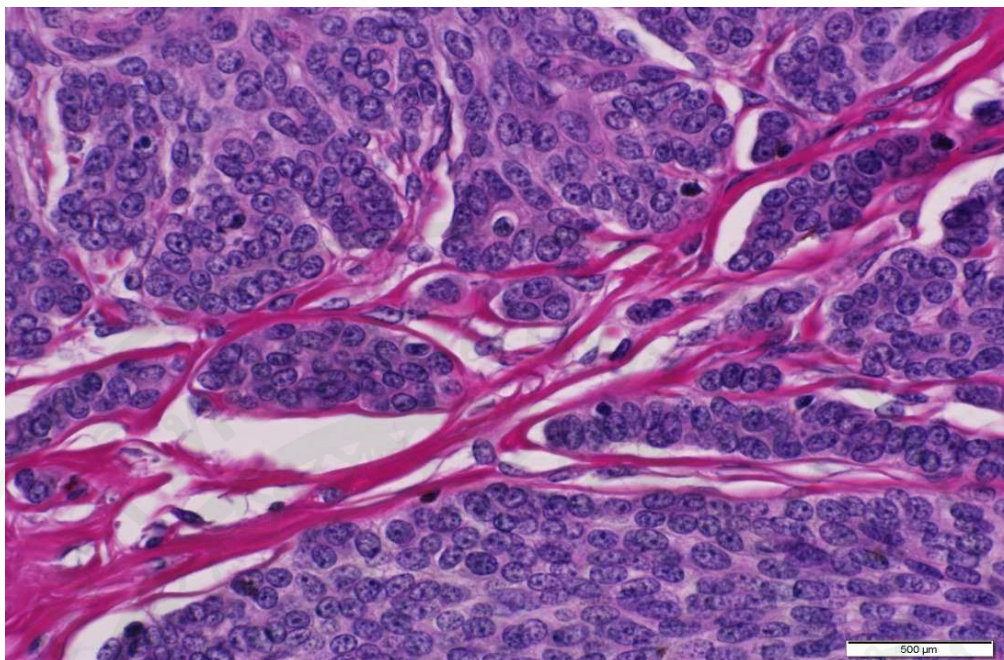
ลักษณะทางมหพยาธิวิทยาของ Basal cell tumors ในสุนัขมีขอบเขตชัดเจน ส่วนใหญ่เป็นก้อนรูปร่างกลม แน่น มักไม่ยึดกับเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านล่าง Basal cell tumors โดยทั่วไปจะเป็นก้อนเดี่ยว โตช้าแต่อาจพบเนื้องอกขนาดใหญ่ได้ มีรายงานถึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร และมีชั้นผิวหนังบางๆ คลุมอยู่ อาจพบเม็ดสี สีดำ อาจพบมีแผลหลุมและถุงน้ำ

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกชนิดนี้ พบหลายรูปแบบได้แก่ solid garland, medusoid, adenoid, cystic ภายในเนื้องอกก้อนเดียวกันอาจประกอบด้วยหลายรูปแบบได้ แม้ว่าเนื้องอกจะมีลักษณะหลายรูปแบบแต่ไม่พบว่ามีผลต่อการพยากรณ์โรค เซลล์ที่พบในก้อนเนื้องอกแบ่งออกเป็นสองชนิดหลัก ได้แก่ เซลล์ที่มีลักษณะ columnar และมักเรียงเป็นแถว ซึ่งจะมีไซโตพลาสซึมน้อย และมีนิวเคลียสรูปไข่ นิวคลีโอไล่มิขนาดเล็ก หรือ เซลล์เนื้องอกที่มีลักษณะคล้าย basal cell ซึ่งลักษณะที่พบขึ้นอยู่กับแนวการตัดเนื้องอก อาจพบเซลล์ลักษณะกลมรูปไข่หรือยาวรี ไซโตพลาสซึมปริมาณน้อย อยู่ล้อมรอบขอบนิวเคลียส อาจพบ mitotic figures จำนวนมาก แต่ในเนื้องอกชนิดนี้ไม่ได้แสดงว่ามีการเจริญของเนื้องอกอย่างรวดเร็วเท่าที่นั่นแต่ยังบ่งชี้ถึงว่ามีการตายของเซลล์สูงด้วย และอาจพบ stroma ที่ล้อมรอบเนื้องอกซึ่งมีองค์ประกอบเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ปริมาณของ stroma ไม่แน่นอน แต่เนื้องอกส่วนใหญ่จะมีคอลลาเจนจำนวนมาก อาจพบว่าเนื้องอกกดเบียดผิวหนังรอบๆ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นใต้ผิวหนังทำให้พบลักษณะเป็นแคปซูลล้อมรอบ ซึ่งเป็นมีความสำคัญสำหรับการระบุขอบเขตในการผ่าตัดเพื่อให้ตัดก้อนเนื้องอกออกจากเนื้อเยื่อโดยรอบออกได้หมด

พฤติกรรมของเนื้องอก

การพยากรณ์โรคของเนื้องอกชนิดนี้ดี ยังไม่พบรายงานว่ามีการแพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่น เมื่อตัดเนื้องอกออกได้หมดจะไม่พบการเกิดซ้ำในตำแหน่งที่ผ่าตัด



ภาพที่ 8 Basal cell tumor ย้อมด้วย H&E

2.1.2 Basal cell carcinomas

Basal cell carcinomas เป็นเนื้องอกที่เซลล์เนื้องอกลักษณะคล้ายกับ BCT แต่เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงพบว่าการแทรกเข้าชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนัง Basal cell carcinoma พบได้บ่อยในบริเวณหัว คอ และขา การรักษาและพยากรณ์โรค สำหรับ basal cell carcinoma ในสุนัขไม่พบรายงานการแพร่กระจาย

ลักษณะทางมหาพยาธิวิทยา

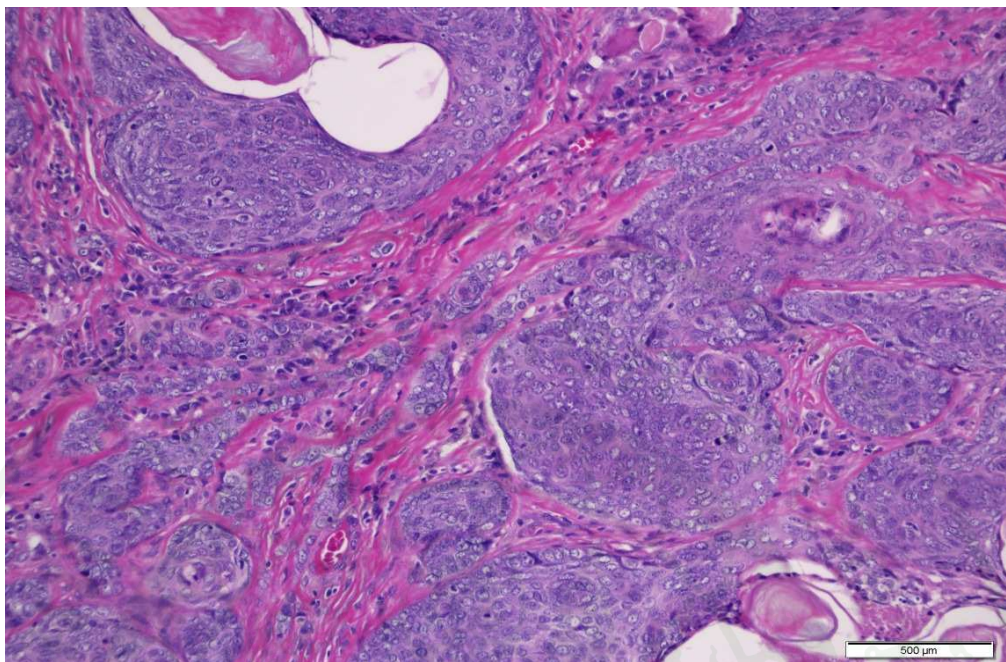
ลักษณะของเนื้องอกชนิดนี้มีรูปแบบโครงสร้างหลัก คือ พบเป็นก้อน ตุ่มเนื้อเล็กๆ อยู่ที่พื้นผิวหรือมีการแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อ อาจมีลักษณะเป็นแผ่นแข็ง ขนาดวัดได้หลายมิลลิเมตรจนถึง หลายเซนติเมตร ผิวหนังที่ปกคลุมเนื้องอกมักขนร่วง มีสะเก็ดคลุมและมีแผลหลุมได้ เนื้องอกชนิดนี้ในสุนัขพบได้บ่อยในบริเวณลำตัว

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

Basal cell carcinoma (BCCs) โดยทั่วไปเป็นเนื้องอกที่มีขอบเขตชัดเจนแต่ไม่มีแคปซูลหุ้ม ก้อนเนื้องอกที่โผล่พ้นผิวหนังขึ้นมาจะมีลักษณะไม่สมมาตร BCCs ที่มีขนาดใหญ่จะเป็นก้อนยื่นลงไปยังผิวหนังที่อยู่ลึก ก้อนเนื้องอกอาจมีขนาดใหญ่หรือมีหลายกลุ่ม ที่ติดอยู่กับผิวหนังด้านล่างของผิวหนัง ที่อาจมีแผลหลุมด้านบนได้ Basal cell carcinomas ประกอบด้วยกลุ่มเดียวของเซลล์เนื้องอก หลายๆ กลุ่มที่มีลักษณะขอบเรียบ มีมุม หรือมีรอยหยักขรุขระชัดเจน เซลล์เนื้องอกมีลักษณะคล้าย basal cell ของ epidermis หรือ hair follicle เซลล์มีลักษณะหลายเหลี่ยมมุม มีไซโตพลาสติดสีจางปริมาณน้อย ไม่เห็นส่วน intercellular bridge ได้ชัดเจน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ ค่อนข้างรี ถึงยาวรี ติดสีเข้ม (hyperchromatic) ไม่สม่ำเสมอ ในแต่ละเซลล์มีขนาดไม่เท่ากัน (anisokaryosis) เล็กน้อย สัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสตสูง โดยทั่วไปนิวคลีโอลัสมีขนาดเล็ก พบ Mitotic activity ไม่แน่นอน อาจพบการแบ่งตัวของเซลล์ในลักษณะผิดปกติ (atypical mitoses) ได้ แนวการจัดเรียงของเซลล์จะอยู่ล้อมรอบกลุ่มเซลล์บุผิว ที่เป็นส่วนของเนื้องอก ไม่พบลักษณะ polarity ของเซลล์ด้านในของก้อนเนื้องอก อาจพบหย่อมเนื้อตาย หรือเกิดลักษณะของถุงน้ำ ซึ่งพบได้บ่อยในบริเวณกลางกลุ่มเซลล์เนื้องอกที่เป็นก้อนใหญ่ (Gross *et al*, 2005)

พฤติกรรมของเนื้องอก

Basal cell carcinomas ตอบสนองดีต่อการฉายรังสี เชื่อว่าสามารถเป็นการรักษาทางเลือกนอกเหนือจากการผ่าตัด รวมทั้งตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดโดยใช้ยา bleomycin, mitoxantrone, actinomycin และ cyclophosphamide



ภาพที่ 9 Basal cell carcinoma H&E

2.1.3 Squamous cell carcinoma (SCC)

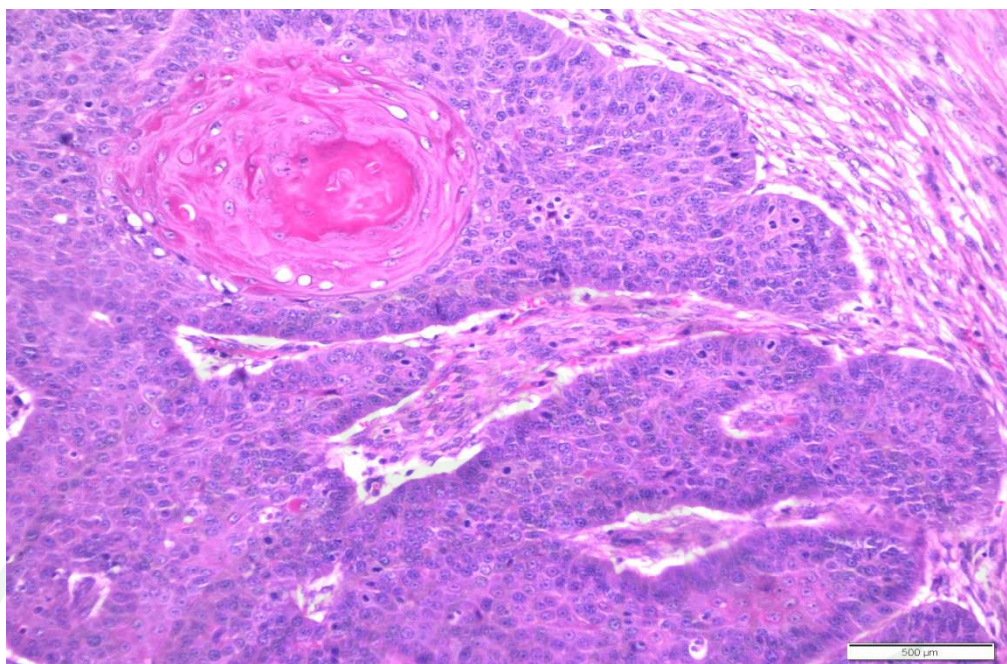
เนื้องอกกลุ่มที่เป็น squamous cell carcinoma เป็นมะเร็งผิวหนังชนิดร้ายแรงที่พบเป็นอันดับสองของเนื้องอกผิวหนังในสุนัข ประมาณ 3-20 % (Goldschmidt and Shofer, 1992) สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มตามระดับของการแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง พบการแทรกเข้าไปใน basement membrane และ dermis มีศักยภาพในการแทรกเข้าเนื้อเยื่อข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่นได้ SCC พบได้ประมาณ 5% ของเนื้องอกผิวหนังของสุนัข SCC มักเกิดในสัตว์ที่อายุมาก โดยอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 8 ถึง 10 ปี สาเหตุที่แน่นอนของการเกิด SCC ในสุนัขยังไม่ทราบ SCC ในสุนัขพบได้บ่อยบริเวณ หู หนังตา จมูก นิ้วเท้าและปาก SCC อาจเป็นแบบ proliferative หรือ erosive proliferative lesions มีลักษณะทางพยาธิวิทยาหลากหลายผันแปร การวินิจฉัยจำเป็นต้องวินิจฉัยจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากสัตว์ป่วย

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกในชั้นหนังกำพร้า อาจพบลักษณะการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีความลึกระดับต่างๆ และพบ rete ridges ชัดเจน โดย rete ridges จะยื่นลงไปใฝ่หนัง เซลล์ keratinocytes อาจมี vacuole และมีไกลโคเจนเป็นองค์ประกอบ อาจพบการสร้างเส้นเลือดใหม่ร่วมกับการแทรกเข้ามาของเซลล์อักเสบ เซลล์เนื้องอกมีลักษณะจัดเรียงเป็นลักษณะ cords และ nest อยู่ภายในผิวหนัง และอาจยื่นลงไปชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เซลล์เนื้องอกมีลักษณะหลายเหลี่ยมมุม (polygonal) มีไซโตพลาสติดสี eosinophilic และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ เป็น vesicular nucleus เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน squamous cell carcinoma มีลักษณะทางจุลกายวิภาคหลากหลาย เซลล์เนื้องอกสามารถแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่ออย่างรุนแรง (Goldschmidt and Shofer, 1992)

พฤติกรรมของเนื้องอก

การเกิดซ้ำในบริเวณที่ผ่าตัดพบได้น้อยในกรณีที่ผ่าตัดออกได้หมดแต่ในบริเวณที่ไม่สามารถผ่าตัดในบริเวณกว้างได้ อาจเกิดปัญหาไม่สามารถผ่าตัดออกได้หมด การแพร่กระจายไปตำแหน่งอื่นพบได้ไม่บ่อยคือการแพร่กระจายไปทางระบบน้ำเหลืองไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงหรือไปยังปอดได้ การรักษา squamous cell carcinoma ต้องทำการผ่าตัดให้ห่างจากก้อนเนื้องอกให้มาก (wide surgical excision) การฉายรังสีพบมีรายงานว่าประสบความสำเร็จในบางกรณี และการใช้เคมีบำบัดเช่น การใช้ cisplatin มีรายงานว่าใช้ได้ในส่วนที่เป็น squamous cell carcinoma (Goldschmidt and Shofer, 1992)



ภาพที่ 10 Squamous cell carcinoma H&E

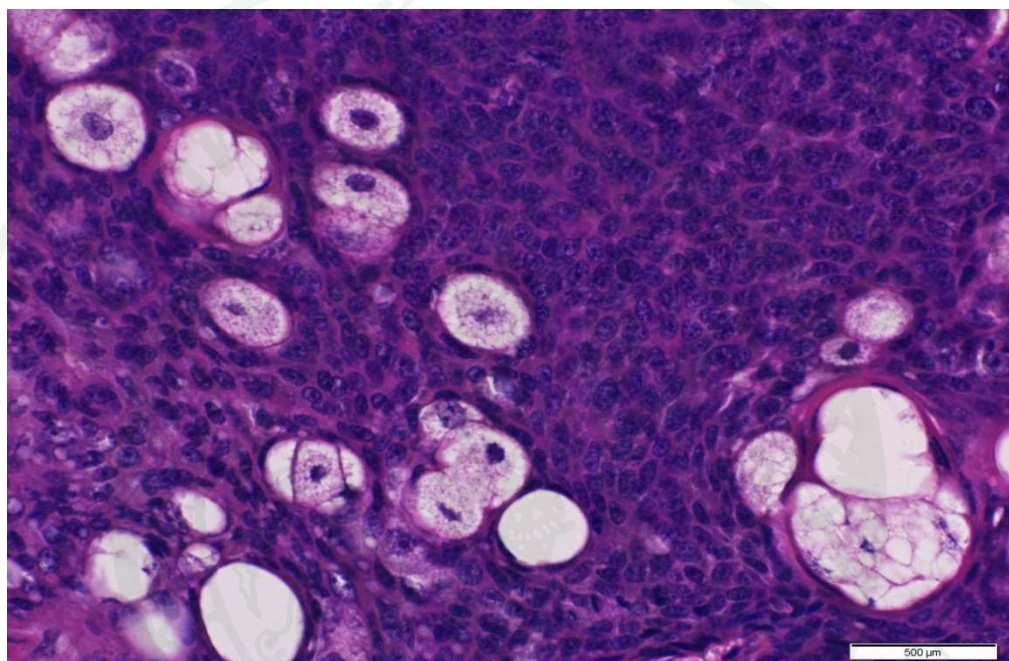
2.1.3 Sebaceous epithelioma

Sebaceous epithelioma เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยในสุนัข จัดว่าเป็น low-grade malignancy อาจมีการแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียงและอาจเกิดขึ้นซ้ำหลังจากผ่าตัดออกไป โดยทั่วไปพบมีลักษณะเป็นก้อนแน่นมีขอบเขตชัดเจน พบบ่อยในบริเวณหัว หู ช่วงอายุเฉลี่ย 8 ถึง 13 ปี (Gross, *et al.*, 2005; Goldschmidt, *et al.*, 2002)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

sebaceous epithelioma ประกอบด้วยกลุ่ม epithelial reserve cells จำนวนหลายกลุ่มบางครั้งพบเป็น anastomosing trabeculae และ cords ของ reserve cells ขอบเขตของก้อนเนื้องอกอาจมีขอบเขตชัดเจนที่พบในเนื้องอกขนาดเล็กหรือมีการแทรกเข้าเนื้อเยื่อข้างเคียงในเนื้องอกที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายกับ basal cell carcinomas อาจพบหลายหย่อมชิดอยู่กับผิวหนัง พบมีแผลหลุมได้และมักกระจายอยู่ใน sebaceous epitheliomas ที่มีขนาดใหญ่ อาจพบ stroma ของ reactive collagenous tissue เล็กน้อยถึงปานกลาง เซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มีลักษณะคล้าย basaloid reserve cell ที่อยู่ในบริเวณขอบของต่อมไขมันปกติ โดยเป็นเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมมีขนาดค่อนข้างเล็กมี

ไซโตพลาสติดสี eosinophilic ปริมาณน้อย สามารถมองเห็นนิวเคลียสรูปร่างรี ได้ชัดเจน นิวเคลียสส่วนใหญ่มีขนาดรูปร่างใกล้เคียงกัน นิวเคลิโอัสขนาดเล็กอาจพบได้หลายอัน จำนวน Mitotic figures ค่อนข้างน้อย พบ กลุ่มเซลล์ที่มีการเจริญพัฒนานกคล้าย sebaceous ปกติโดยเซลล์มีไขมันอยู่ในไซโตพลาสซึมมากขึ้น นิวเคลียสของ sebocytes ที่พัฒนาเต็มที่มักมีรอยหยัก พบ นิวเคลียสที่มีรูปร่างลักษณะผิดปกติได้ (Gross *et al*, 2005)



ภาพที่ 11 Sebaceous epithelioma H&E

2.1.4 Sebaceous carcinoma

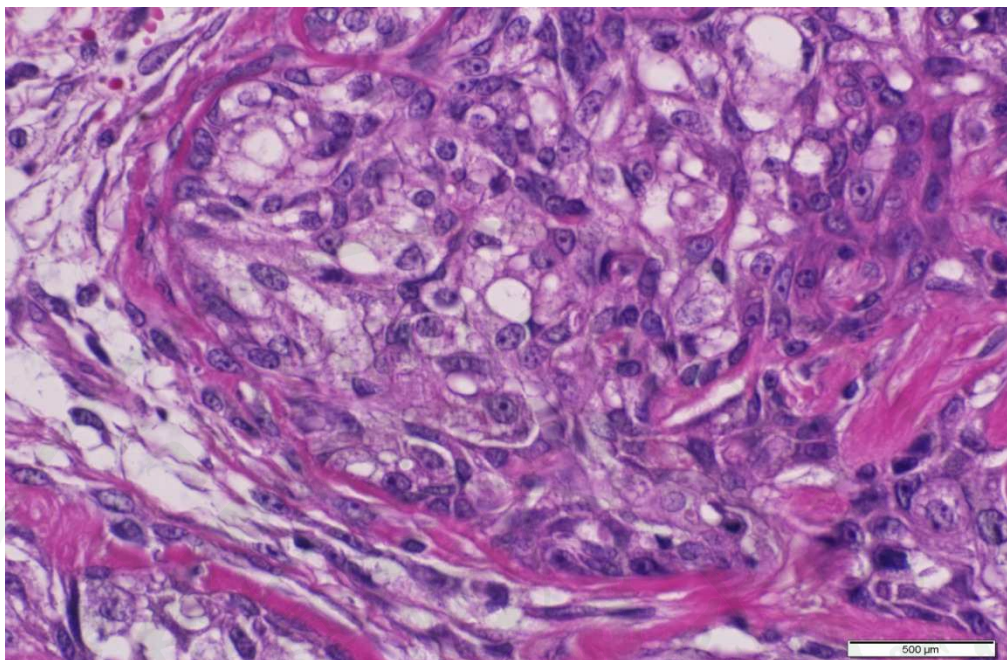
Sebaceous adenocarcinomas เป็นเนื้องอกร้ายแรง วินิจฉัยพบไม่บ่อยเท่า sebaceous epithelioma สามารถแยก sebaceous adenocarcinomas ซึ่งมี sebocyte ชัดเจนออกจาก รอยโรคที่พบมี reserve cells ที่ชัดเจนเช่น sebaceous epitheliomas ซึ่งช่วยในการประเมินพฤติกรรม ของเนื้องอกได้ ในสุนัขเนื้องอกชนิดนี้ส่วนใหญ่พบในบริเวณหัว ช่วงอายุสุนัขเฉลี่ยที่พบเนื้องอก ชนิดนี้อยู่ที่ 9 ถึง 12 ปี (Goldschmidt and Shofer, 1992)

ลักษณะทางมหาพยาธิวิทยา

ลักษณะของ sebaceous carcinomas มักพบเป็นก้อนเดี่ยว เป็นก้อนแน่น พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้จนถึง 7.5 เซนติเมตร อาจพบขนร่วงและแผลหลุมบริเวณที่เกิดเนื้องอก sebaceous adenocarcinomas มักพบการแทรกเข้าเนื้อเยื่อข้างเคียงอย่างรุนแรงแต่พบการแพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่นน้อยจึงพบว่าการเกิดซ้ำที่ตำแหน่งลึกลงไปและต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงได้

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

Sebocytic sebaceous carcinomas ก้อนเนื้องอกมีรูปร่างไม่แน่นอนแต่มีขอบเขตชัดเจน อาจพบมีหลายก้อนอยู่ภายในผิวหนัง ในก้อนเนื้องอกประกอบด้วยกลุ่มของ epithelial cell ที่เซลล์ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่กว่า basaloid reserved cells อาจพบแผลหลุมในเนื้องอกที่มีขนาดใหญ่ และเนื้องอกอาจแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังโดยแต่ละ lobules มี collagenous stroma ที่อยู่ในรูปที่เป็น stromal-epithelial cleft ปริมาณเล็กน้อยถึงปานกลางแทรกอยู่ อาจพบเนื้อตายและถุงน้ำ ในบริเวณกลางก้อนเนื้องอก ลักษณะเซลล์ที่พบได้ตั้งแต่ basaloid reserve cells จนถึงเซลล์ sebocytes ที่มีรูปร่างผิดปกติหรือไม่พบ sebocyte อาจพบลักษณะ squamous differentiation ที่มีหรือไม่มีการสร้าง keratin pearl พบ sebaceous carcinoma ที่ยังมีโครงสร้างของต่อมที่บุด้วย columnar epithelial cells ได้น้อยมาก เซลล์เนื้องอกมีลักษณะไซโตพลาสติดสี eosinophilic มีปริมาณ vacuolation ไม่แน่นอน ใน sebocytic sebaceous carcinoma พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย sebocytes ปกติที่เจริญเต็มที่ได้น้อยถึงปานกลาง โดย lipid vacuole ที่พบอาจมีขนาดใหญ่และปริมาณน้อยกว่า sebocytes แต่ในเนื้องอกที่มีการเจริญพัฒนาของเซลล์ไม่ดีจะพบลักษณะของ sebaceous ได้จำกัด ลักษณะเซลล์ในเนื้องอกอื่นๆ มีเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมมุม ไซโตพลาสติดสี eosinophilic งาม ปริมาณปานกลางถึงมากติดสี eosinophilic งาม ในบริเวณที่เกิด squamous metaplasia จะพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย well differentiated squamous cell carcinoma โดยนิวเคลียสมีขนาดใหญ่มองเห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน มีรูปแบบโครมาตินไม่แน่นอน จำนวน mitotic activity มีความผันแปรไม่แน่นอน พบ atypical mitotic figures ได้บ่อย (Gross *et al.*, 2005)



ภาพที่ 12 Sebaceous adenocarcinoma H&E

2.1.4 Perianal gland adenoma

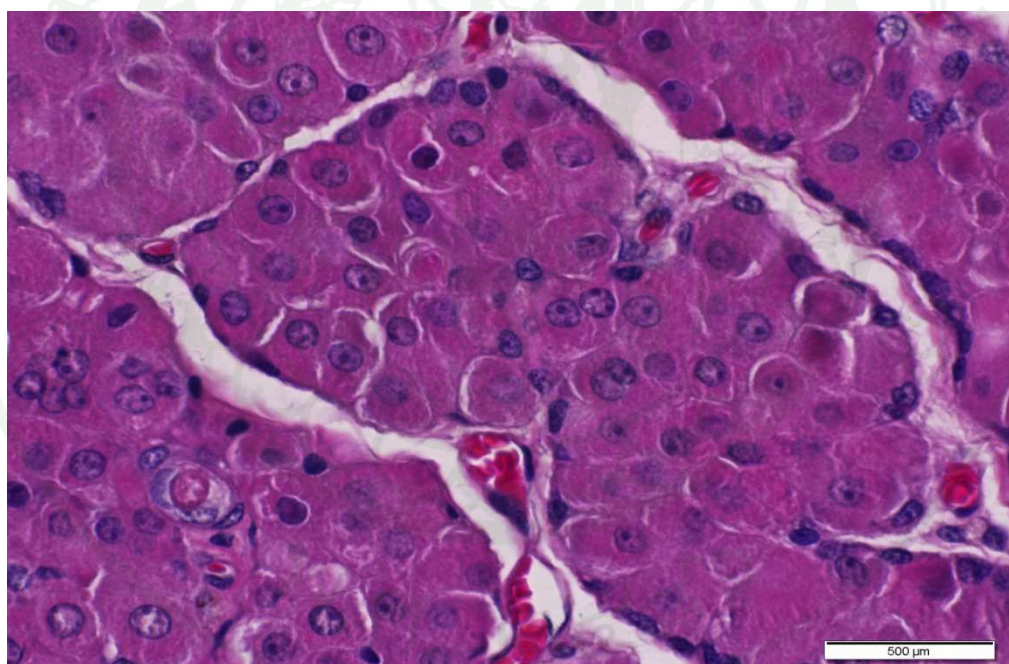
Hepatoid glands เป็น modified sebaceous glands ในสุนัขที่อยู่ที่ผิวหนังบริเวณรอบทวารหนัก และพบล้อมรอบโคนหางด้าน dorsal ตำแหน่ง lumbosacral เชื่อว่าการเจริญของต่อมนี้เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนแอนโดรเจน สาเหตุของ perianal gland hyperplasia และเนื้องอกของต่อมนี้ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เป็นเนื้องอกที่พบบ่อยในสุนัข พบได้ประมาณ 8% ถึง 18 % ของเนื้องอกผิวหนัง (Glodschmidt and Shofer, 1992)

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

Perianal adenoma พบมีลักษณะเป็นก้อนนูน ขนาดตั้งแต่ 2-3 มิลลิเมตร จนถึง 10 เซนติเมตร มีขอบเขตชัดเจนหรือพบมีหลายก้อน มีปริมาณ mature collagen ปานกลางถึงมาก อาจพบเนื้อเยื่อไขมันได้ในส่วนของ stroma เนื้องอกที่มีขนาดใหญ่อาจมีแผลหลุมบนผิวหนังเนื้องอก หรืออาจพบส่วนเนื้อตายที่เกิดจากการขาดเลือดในเนื้องอกได้

ลักษณะจุลพยาธิวิทยา

ก้อนเนื้อประกอบไปด้วย anastomosing trabeculae ของ well differentiated hepatoid cells และพบ basaloid reserve cells ที่เรียงตัวเป็นชั้นเดียวอยู่บริเวณขอบ อาจพบเป็นเซลล์กลุ่มเล็กๆ ที่เห็นรูปแบบการเรียงตัวชัดเจน อาจพบแคลซูลที่มีลักษณะเป็นเส้นใยบางๆ บางครั้งอาจพบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์บุผิวขนาดเล็ก เซลล์เนื้องอกมีลักษณะคล้ายเซลล์ตับ (hepatoid cell) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกันในแต่ละเซลล์ โดยเซลล์เนื้องอกมีไซโตพลาสซึมปริมาณมาก ติดสี eosinophil นิวเคลียสมองเห็นได้ชัดเจน และมีนิวคลีโอลัสเล็ก พบ mitotic figures น้อย พบได้เฉพาะในชั้นของ reserve cell ไม่ค่อยพบลักษณะ mitotic figures ที่ผิดปกติ เนื้องอกชนิดนี้พบว่าเกิด squamous metaplasia ร่วมกับการสร้างเคราตินเกิดเป็น keratin pearl ได้บ่อย เซลล์เนื้องอกประมาณ 90% เป็น reserve cells (Goldsmidt and Shofer, 1992)



ภาพที่ 13 Perianal gland adenoma H&E

2. 2 เนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal tumors)

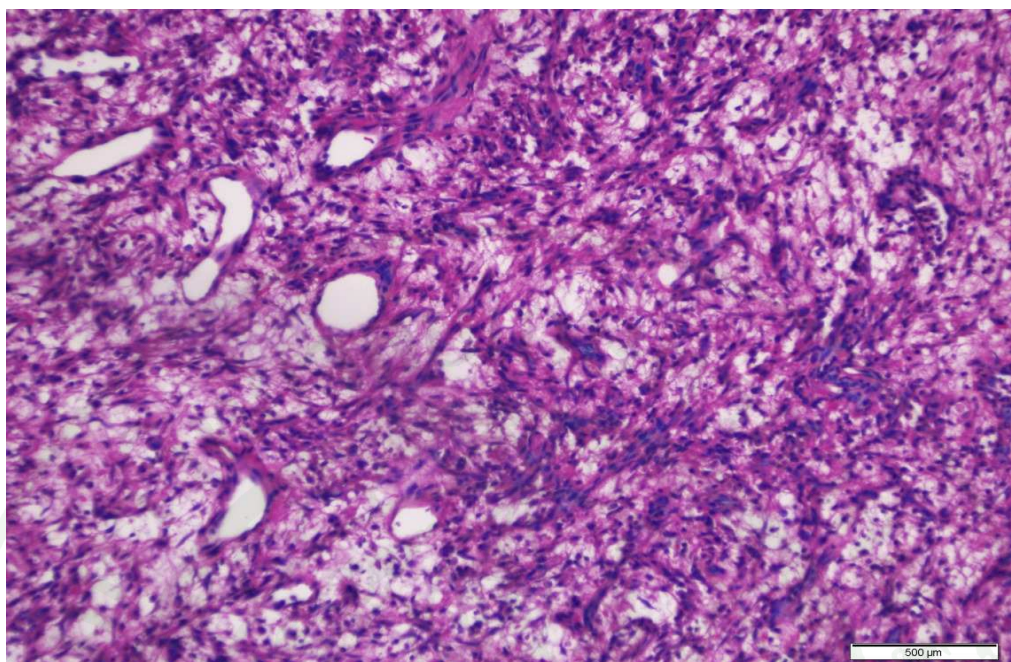
2.2.1 Fibrosarcoma

Fibrosarcoma เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรง ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์ fibroblasts เป็นเนื้องอกกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อายุโดยเฉลี่ยของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้ อยู่ที่ 8.5 ปี เป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงระดับต่ำถึงปานกลาง มักมีการแทรกเข้าเนื้อเยื่อข้างเคียงแต่มีการแพร่ไปตำแหน่งอื่นน้อยแต่อาจพบได้ในระยะท้ายของโรค อัตราการเกิดซ้ำอยู่ที่ 34% และมีรายงานการแพร่กระจายไปยังปอด โดยเซลล์เนื้องอกจะยังคงมีการแสดงออกของ vimentin (Gross *et al.*, 2005)

เนื้องอก fibrosarcoma มีลักษณะเป็นก้อนแน่น ขอบเขตไม่ชัดเจนและมักพบมีหลายก้อน มีขนาดตั้งแต่ 1 -15 เซนติเมตรผิวหนังบริเวณที่เกิดเนื้องอกพบว่าเกิดขนร่วงและแผลหลุมได้บ่อย fibrosarcomas พบบ่อยในตำแหน่งใต้ผิวหนังบริเวณคอและอก

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

Fibrosarcoma มีลักษณะไม่แน่นอน มักพบเป็น multilobular neoplasms อยู่ในชั้นใต้ผิวหนังหรือผิวหนัง หรือในทั้งสองส่วน บางครั้งมีขอบเขตชัดเจน และ partially encapsulated แต่ส่วนใหญ่จะไม่สามารถระบุขอบเขตการแทรกเข้าเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ชัดเจน โดย fibrosarcomas ประกอบด้วยเซลล์รูปกระสวยขนาดใหญ่ (large spindle cells) จัดเรียงตัวอยู่ในลักษณะ interlacing bundles ขนาดต่างๆอย่างชัดเจน โดยแต่ละ bundles ค่อนข้างหยาบและมุมของ intersection ผันแปรมาก ส่วนประกอบหลักของ stroma ในเนื้องอกชนิดนี้เป็น mature collagen ยิ่งเซลล์เนื้องอกมีการเปลี่ยนแปลงไปมากจะพบว่าปริมาณ stroma น้อย การที่พบคอลลาเจนระหว่างเซลล์สามารถตรวจยืนยันได้โดยการย้อมสีพิเศษ Masson's trichrome เซลล์เนื้องอกเป็นเซลล์ที่มีขอบเขตไม่ชัดเจน ไซโตพลาสติดีสีจางปริมาณน้อย นิวเคลียสรูปร่างรีถึงรูปกระสวย เห็นได้ชัดเจนมีนิวคลีโอลัสเห็นได้ 1-2 อัน แต่อาจพบนิวเคลียสลักษณะ ทั้ง vesicular และ hyperchromatic ปนกัน ปริมาณ mitotic figures ไม่แน่นอน อาจพบลักษณะที่มีขนาดใหญ่ผิดปกติได้ (Gross *et al.*, 2005; Goldschmidt and Shofer, 1992)



ภาพที่ 14 Fibrosarcoma H&E

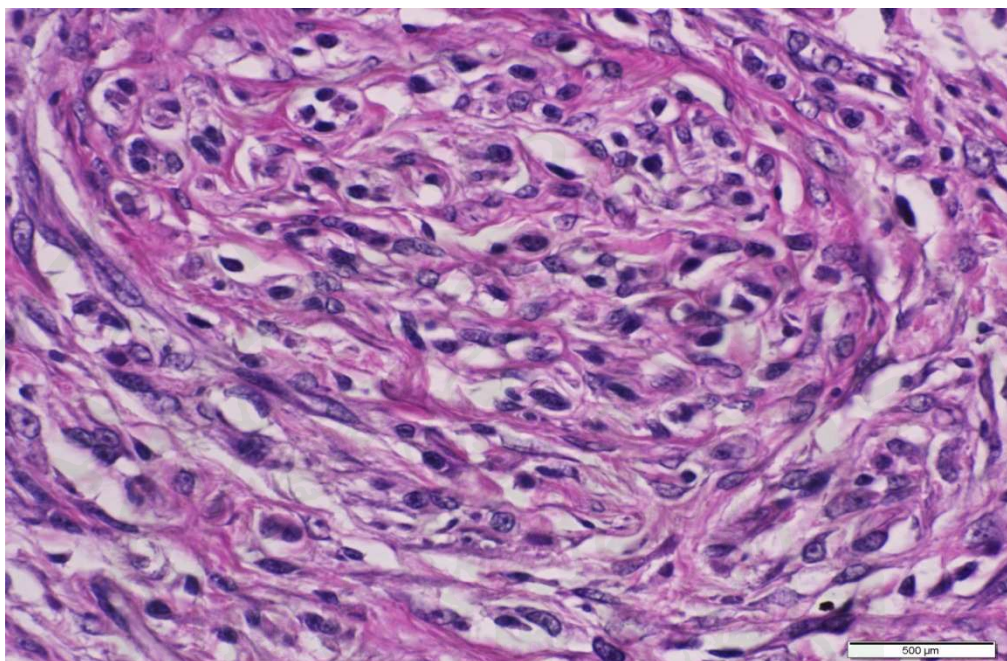
2.2.2 Hemangiosarcoma

Hemangiosarcoma เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) (Weiss and Goldblum, 2001) ในสุนัขพบว่ามีการสัมผัสแสงแดด เป็นเนื้องอกที่มีพฤติกรรมรุนแรงเป็นมะเร็งที่การพยากรณ์โรคไม่ดี มีรายงานการรักษาโดยใช้เคมีบำบัดโดยยาหลายชนิดแต่ผลที่ได้ยังไม่แน่นอน และยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับข้อมูลในแง่พฤติกรรมของ nonvisceral hemangiosarcomas (Schultheiss, 2004)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

Hemangiosarcoma ที่พบในผิวหนังหรือชั้นใต้ผิวหนังพบได้ทั้งที่มีการเจริญพัฒนาดี ซึ่งสามารถแยกจาก hemangiomas ได้ยาก จนถึงเนื้องอกที่มีลักษณะเป็น anaplastic tumor อย่างยิ่ง เนื้องอกชนิด hemangiosarcomas ในผิวหนังพบลักษณะ acantosis ของผิวหนังที่อยู่ด้านบนเล็กน้อยจนถึงรุนแรง พบได้บ่อยว่าเกิดแผลหลุม เนื้อตายและมีเลือดออก โดยเฉพาะในเนื้องอกที่มีขนาดใหญ่ เซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มีการเจริญพัฒนาดีโดยพบมีลักษณะเป็นเซลล์บุหลอดเลือด

ลักษณะ plump endothelial cells ที่เรียงตัวบน trabeculae คอลลาเจน ส่วนเซลล์เนื้องอกที่มีการเจริญพัฒนาน้อยอาจต้องใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีที่จำเพาะต่อไปเพื่อช่วยยืนยัน (Gross *et al.*, 2005)



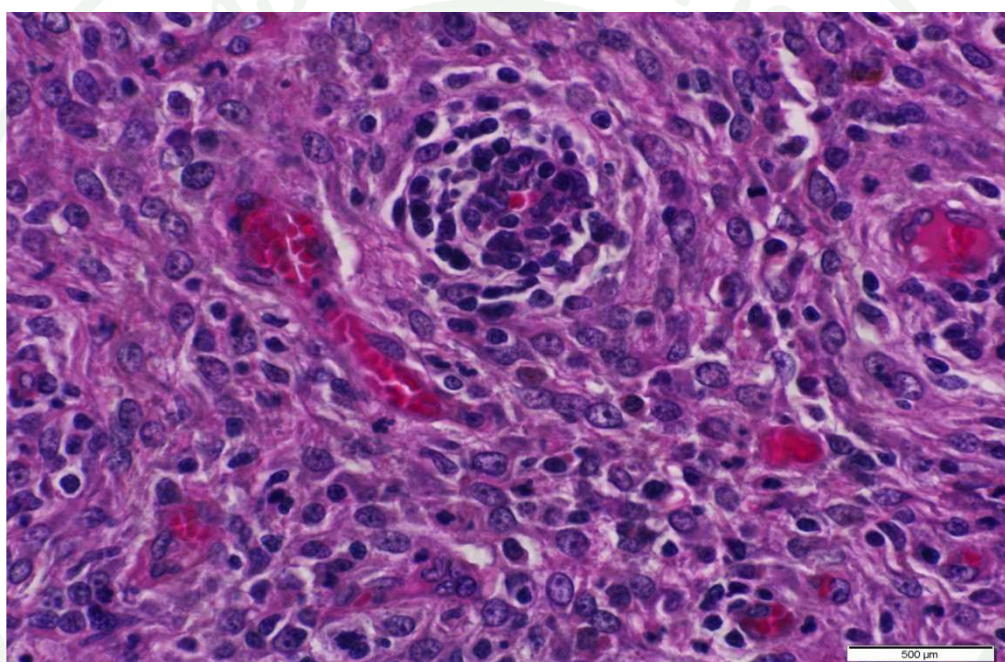
ภาพที่ 15 Hemangiosarcoma H&E

2.2.3 Hemangiopericytoma

เนื้องอกชนิด hemangiopericytoma เป็นเนื้องอกที่มาจากเซลล์ pericyte ซึ่งเป็นเซลล์รูปร่างกระสวยที่ล้อมรอบเส้นเลือด เป็นเนื้องอกที่พบบ่อยในชั้นใต้ผิวหนังของสุนัข (Gross *et al.*, 2005) โดยเฉพาะตำแหน่งขาหลัง (Mazzei *et al.*, 2002) เนื้องอกชนิดนี้จะแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อเฉพาะที่และมักเกิดซ้ำอีกหลังจากผ่าตัดแต่ไม่ค่อยพบว่าการแพร่กระจายไปยังตำแหน่งอื่น

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

เซลล์เนื้องอกมีลักษณะเป็นรูปกระสวยที่มี cytoplasmic process เซลล์มีการจัดเรียงตัวลักษณะเป็นวงล้อมรอบเส้นเลือด มีการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่ามีการแพร่กระจายของ hemangiopericytoma ในสุนัขไปยังตำแหน่งอื่น ได้แก่ ปอด ต่อมน้ำเหลืองในบริเวณ sublumbar และช่องอก พบว่าเซลล์เนื้องอกชนิดนี้ในคน จะแสดงโปรตีน vimentin (Gross *et al.*, 2005)



ภาพที่ 16 Hemangiopericytoma H&E

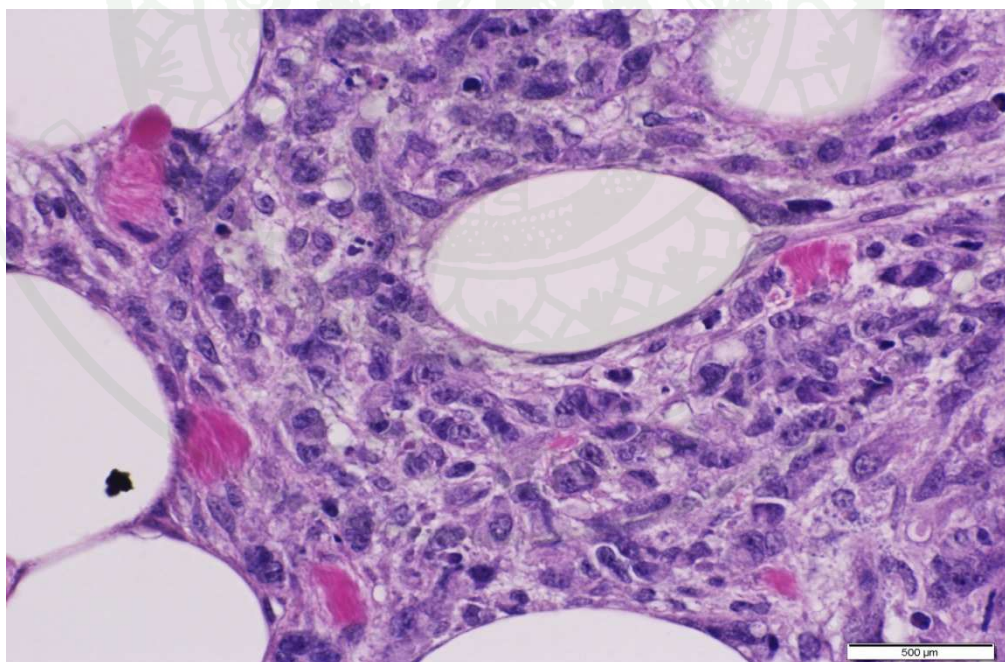
2.2.4 Liposarcoma

Liposarcomas เป็นเนื้องอกที่มาจากเซลล์ lipoblasts เนื้องอกชนิด liposarcomas เป็นเนื้องอกที่อยู่ค่อนข้างลึก liposarcoma สามารถจำแนกเป็น atypical lipoma, well-differentiated liposarcoma, myxoid liposarcoma และ pleomorphic liposarcoma โดย liposarcoma เป็นก้อนมีขอบเขตไม่ชัดเจน ค่อนข้างนุ่ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตรหรือมากกว่า ส่วนใหญ่พบในชั้นใต้ผิวหนังและมักแทรกเข้าชั้นผิวหนัง (Goldschmidt and Shofer, 1992) โดยเมื่อแทรกเข้าผิวหนังจะทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นหนาและขนร่วง อายุเฉลี่ยของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้

คือ 9 - 10 ปี พุติกรรม liposarcoma ในทางการแพทย์จะทำนายพุติกรรมตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (Weiss and Globlum, 2001) โดย atypical lipomas จัดว่าเป็น low-grad malignancy แต่ pleomorphic liposarcoma ถือว่าเป็นชนิดรุนแรงการพยากรณ์โรคไม่ดี แต่ในสัตว์ยังไม่มีการสรุปที่ชัดเจนแต่ก็เชื่อว่าพบการแพร่กระจายของเนื้องอกถึงสามในสี่ของเนื้องอกชนิด pleomorphic liposarcomas (Baez *et al.*, 2004) โดยเฉพาะการแพร่ไปปอด lipocytes มีลักษณะเหมือนเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอื่นก็มีการแสดงออกของ vimentin แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีโปรตีนที่จำเพาะต่อ lipocytes ซึ่งทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยแยก poorly differentiated liposarcoma

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

เนื้องอกที่มีการเจริญพัฒนาดังจะพบเซลล์ adipocytes ได้ชัดเจน เซลล์มีรูปร่างลักษณะผันแปรหลากหลาย อาจพบมีเซลล์ขนาดใหญ่ นิวเคลียสรูปร่างประหลาดหลายนิวเคลียส (bizarre multinucleated cells) และเซลล์ที่มีรูปร่างกลมปนกันอยู่ เซลล์เนื้องอกมีปริมาณ eosinophilic cytoplasm ผันแปรและอาจพบแกรนูล อาจมีหรือไม่มี vacuoles



ภาพที่ 17 Liposarcoma H&E

2.2.5 Schwannoma

Schwannoma เป็นเนื้องอกของ Schwann cell มีลักษณะหลากหลายรูปแบบ เนื้องอกชนิดนี้ในคนเกี่ยวข้องกับ nerve sheaths ในระบบประสาทส่วนปลายแต่ในสุนัขยังไม่ทราบข้อมูลชัดเจน เนื้องอกชนิดนี้พบได้ไม่บ่อยในสุนัขแต่รายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์ยังไม่แน่นอน เนื่องจากการประเมินจากลักษณะจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกซึ่งมีลักษณะคล้ายเนื้องอกที่มีลักษณะเซลล์รูปกระสวยชนิดอื่นๆ ทำให้การวินิจฉัยได้ยาก แต่มีรายงานว่าพบเนื้องอกชนิดนี้ 0.5% ในสุนัข (Goldschmidt and Shofer 1992) อายุโดยเฉลี่ยของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้คือ 7.2 ถึง 8.3 ปี

ลักษณะทางมหพยาธิวิทยา

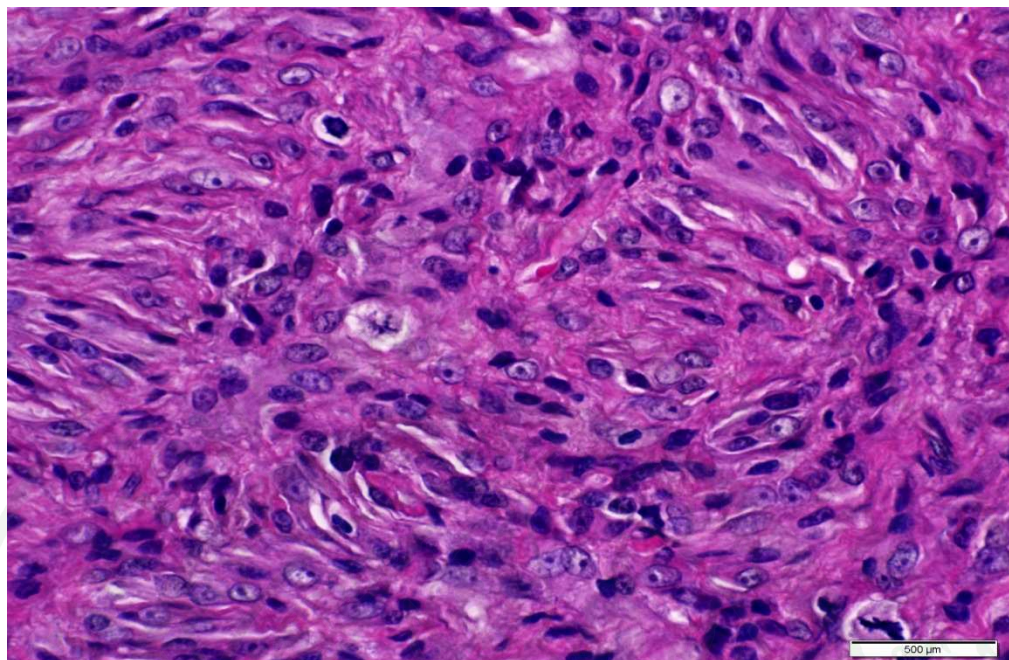
เนื้องอกชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรจนถึง 3 เซนติเมตร ลักษณะแข็งหรือนิ่มความแน่นของเนื้องอกไม่แน่นอน ส่วนใหญ่พบในชั้นใต้ผิวหนัง และมักไม่แทรกเข้าไปในผิวหนัง แต่บางครั้งอาจแทรกเข้าผิวหนังได้ ผิวหนังด้านบนอาจขนร่วงและไม่ค่อยพบว่าเกิดแผลหลุม มักพบเนื้องอกบริเวณลำตัวและปลายขา

ลักษณะจุลพยาธิวิทยา

เนื้องอกมีขอบเขตชัดเจน อาจมีแคปซูลบางๆ หุ้มหรือไม่มีแคปซูล ประกอบด้วยเซลล์ส่วนใหญ่ที่เป็นรูปกระสวย ที่มีนิวเคลียสค่อนข้างรี เรียว หรือลักษณะเป็นเหมือนตัว S ซึ่งนิวเคลียสจะเรียงเป็นแนวและเห็นเป็นแถวยาวโดยมีไซโตพลาสซึมที่อยู่ระหว่างแต่ละเซลล์น้อยติดสีจางมีขอบเขตไม่ชัดเจน ระหว่างแถวของนิวเคลียสปลายไซโตพลาสซึมค่อนข้างชิดกัน ทำให้เกิดเป็นแถบของไฟบรินที่ไม่ใช่เซลล์ติดสีแดงเมื่อย้อมด้วยสี H&E เป็นลักษณะที่พบบ่อยในเนื้องอกชนิด schwannoma ในสุนัข พบ mitotic figures น้อย เซลล์เนื้องอกมักจัดเรียงตัวเป็น wavy bundles และ whorls บางครั้งมีองค์คล้ายเป็นวงอยู่รอบเส้นเลือด อาจเรียกรูปแบบดังกล่าวว่า Antoni ชนิด A ในบางบริเวณ เนื้องอกอาจมีเซลล์ลักษณะหลายเหลี่ยมมุมที่มีนิวเคลียสติดสีเข้มขนาดเล็กอยู่อย่างไม่หนาแน่น ซึ่งรูปแบบนี้เรียกว่า Antoni ชนิด B

พฤติกรรมของเนื้องอก

พบบ่อยว่ามีการเกิดซ้ำในกรณีที่ผ่าตัดออกได้ไม่หมด



ภาพที่ 18 Schwannoma H&E

2.2.6 Melanoma

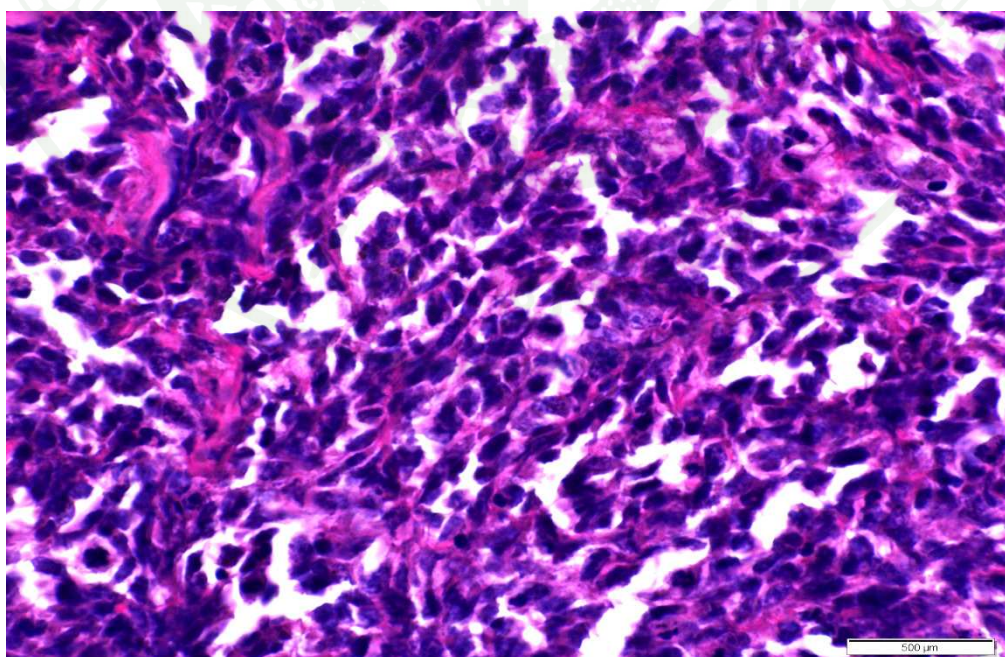
Melanoma เป็นเนื้องอกที่พบบ่อยและก่อความเสียหายอย่างมากในทางสัตวแพทย์ เป็นเนื้องอกที่มาจากเซลล์ต้นกำเนิดคือ melanocytes ในสุนัขพบอุบัติการณ์ ประมาณ 0.8% (Goldschmidt and Shofer 1992) อายุเฉลี่ยของสุนัขที่พบเนื้องอกชนิดนี้อยู่ที่ 9 ถึง 11 ปี (Goldschmidt and Hendrick, 2002) การวินิจฉัยทางจุลพยาธิสำหรับเนื้องอกชนิดนี้ทำได้ยากเนื่องจากมีลักษณะรูปแบบที่ผันแปร เนื้องอกมักแทรกเข้าไปในบริเวณเนื้อเยื่อข้างเคียง

ลักษณะทางมหพยาธิวิทยา

ลักษณะก้อนเนื้องอกที่พบส่วนใหญ่มีขนาด 1 ถึง 3 เซนติเมตร มักยึดอยู่กับเนื้อเยื่อข้างเคียงบางครั้งพบมีลักษณะ polypoid หรือเป็นแผ่น มีสีเทา น้ำตาล หรือดำขึ้นอยู่กับปริมาณเม็ดสีเมลานินที่สร้าง และการเกิดการสะสมของเม็ดสีมากเกินไป ในส่วนหนึ่งกำพริ และอาจเกิดแผลหลุมโดยเฉพาะในเนื้องอกขนาดใหญ่ เนื้องอกชนิดนี้ในสุนัขพบบ่อยบริเวณ หิ้งตา ริมฝีปากและขา (Goldschmidt and Shofer, 1992)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ส่วนใหญ่เนื้องอกชนิดนี้ค่อนข้างมีขอบเขตชัดเจน แต่ไม่มีแคปซูล อาจแทรกเข้าส่วนหนังกำพร้าและหนังแท้เท่านั้นแต่เนื้องอกขนาดใหญ่อาจแทรกเข้าไปในชั้นใต้หนัง ผิวหนังด้านบนอาจเกิดการสะสมของเม็ดสีมากเกินไป โดยอาจพบหรือไม่พบกลุ่มเซลล์เนื้องอก melanocytes ที่อยู่ชิดใต้ epidermis (junctional activity) ก็ได้ พบลักษณะของเนื้อมีตายและแผลหลุมได้บ่อย โดยเฉพาะก้อนเนื้องอกขนาดใหญ่ เซลล์เนื้องอกที่พบได้แก่เซลล์รูปกระสวย เซลล์รูปร่างกลม จนถึงเซลล์หลายเหลี่ยม เนื้องอกชนิดนี้ในสุนัขส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างต่างๆ ในสัดส่วนไม่แน่นอน หรืออาจพบเซลล์รูปร่างแบบเดียวเท่านั้น จากการศึกษาย้อนหลังพบว่า รูปร่างของเซลล์ไม่มีความสำคัญต่อการพยากรณ์โรคนี้ในสุนัข (Miller *et al.*, 1993) เซลล์รูปกระสวยจะเห็นขอบเขตไซโตพลาสซึมไม่ชัดเจน เซลล์ปลายเรียวเหล่านี้จะมักเรียงตัวในรูปแบบ interlacing bundle อาจมีลักษณะเป็น whorls และ nest ในบางส่วน นิวเคลียสอ้วนรี หรือเรียว อาจมีรูปร่างไม่แน่นอน นิวคลีโอไล์ชัดเจน เซลล์ที่รูปร่างกลมและหลายเหลี่ยม มักจัดเรียงเป็น sheets และเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ (packets) ที่มี stroma ปริมาณน้อยแทรกอยู่ มีปริมาณไซโตพลาสซึมมากติดสี eosinophilic จาง มีขอบเขตไม่ชัดเจน นิวเคลียสรีขนาดใหญ่ มีขนาดไม่เท่ากัน (anisokaryosis) เห็นนิวคลีโอไล์ชัดเจน อาจพบลักษณะ mitotic atypia ปริมาณเม็ดสีในไซโตพลาสซึมไม่แน่นอนอาจพบมีมากหรือไม่มี



ภาพที่ 19 Melanosarcoma H&E

3. การตรวจหาโปรตีนเส้นใยที่จำเพาะต่อเซลล์เนื่องด้วยเทคนิคอิมมูโนโอสโตเคมี

3.1 โปรตีนเส้นใย (filamentous proteins)

ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ยูคาริโอติก (eukaryotic cells) ประกอบด้วยโปรตีนฟิลาเมนต์ (filamentous proteins) หลายชนิดที่จัดเรียงตัวเป็นโครงร่างของเซลล์ แบ่งออกเป็นสามชนิด ได้แก่ microtubules, microfilaments และ intermediate-sized filaments (IFs) หรือที่เรียกว่า intermediate filaments ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะทางเคมี และลักษณะทางภูมิคุ้มกันที่ความจำเพาะ (immunologic specificities) และชนิดของเซลล์ที่มันอยู่ ได้แก่ (vimentin, desmin, keratins, glial acidic proteins (GFAP) และ neurofilaments) โดย Intermediate filaments จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ 10 nm ซึ่งเป็นขนาดกลางระหว่าง microtubule ที่มีขนาด 25 nm และ microfilament ที่มีขนาด 7 nm โปรตีน Intermediate filaments เป็นโปรตีนโครงร่าง (cytoskeletal) ของเซลล์ ที่มีโครงสร้างที่คงทนที่สุด โปรตีน microfilament และ microtubule สามารถถูกสกัดออกมาโดยสารละลาย detergent และเกลือ เหลือเพียงองค์ประกอบส่วนที่เป็น intermediate filaments ที่ไม่ละลายออกมา intermediate filaments ทั้งหมดจะประกอบด้วย monomer ที่ประกอบด้วย แกน α -helical ที่เป็นแท่งขนานข้างด้วยส่วน head domain และ tail domains โครงสร้าง monomer ของโปรตีน Intermediate filament ประกอบด้วย 3 domain ได้แก่ α -helical rod domain ที่ขนานข้างด้วย nonhelical N-terminal head domain และ C-terminal tail domain หน้าที่หลักของ intermediate filaments คือช่วยพยุงโครงร่างของเซลล์ โดยการจำแนก intermediate filament proteins ทั้ง 5 ชนิดนั้นจำแนกตามลำดับที่มีความคล้ายกันของ rod domain เป็นชนิดที่ I จนถึง V มีการศึกษารายงานพบโปรตีน intermediate filament 50 ชนิดในปัจจุบัน

3.1.1 ชนิดที่ I คือ acidic keratin และ

3.1.2 ชนิดที่ II คือ neutral ถึง basic keratin โปรตีนรูปนี้เป็น intermediate filament cytoskeleton ของเซลล์บุผิว (epithelial cell) ที่เรียกว่า cytokeratins เพื่อแยกชนิดจาก keratins ที่อยู่ในผมและเล็บ acidic keratin มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 40 จนถึง 60 kd และ neutral-basic มีน้ำหนักอยู่ที่ 50 ถึง 70 kd) cytokeratins

3.1.3 ชนิดที่ III ได้แก่

ก. vimentin มีขนาดโมเลกุลที่ 54 kd โดยทั่วไปจะพบในเซลล์ที่ต้นกำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal origin) ในเซลล์บางชนิด vimentin เกิดเป็นโครงสร้างเชื่อมระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับ nuclear lamins

ข. Desmin เป็นโปรตีนขนาด 53 kd ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์กล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle cells) อยู่ที่ Z disk ของ sarcomere โดยมีส่วนช่วยให้ sarcomeres เกาะกับ Z disk ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหดตัวได้และยังสามารถพบ Desmin ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบด้วย

ค. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) เป็นโปรตีนขนาด 51 kd ที่พบได้ใน astrocytes และ Schwann cell

ง. Peripherin เป็นโปรตีนขนาด 57 kd ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ประสาท (neurons) ของ peripheral nervous system และมีการแสดงออกร่วมกับ neurofilament proteins

3.1.4 ชนิดที่ IV มีพวก Neurofilaments เป็นหลักโดย Neurofilament (NFs) พบใน axons และ dendrites ของ เซลล์ประสาท มีโปรตีนสามชนิดที่เป็นส่วนประกอบของ neurofilament ได้แก่

NF-L เป็น low-molecular –weight neurofilament มีน้ำหนัก 60 ถึง 70 kd NF-M เป็น middle-molecular –weight neurofilament น้ำหนัก 105 ถึง 110 kd และ NF-H เป็น high molecular weight neurofilament ขนาด 135 ถึง 150 โปรตีนอีกชนิดในกลุ่มนี้คือ α –internexin ซึ่งเป็นโปรตีนมีขนาดโมเลกุล 66 kd ที่พบชัดเจนในระบบประสาทส่วนกลาง โดยเฉพาะในไขสันหลังและเส้นประสาท optic

3.1.5 ชนิดที่ V ได้แก่โปรตีน nuclear lamins ที่อ่านออกมากจากยีน LMNA, LMNB1 และ LMNB2 ได้เป็น Lamin A และ lamin B 1 ที่พบในเซลล์ร่างกายทุกชนิด lamin B2 พบแสดงออกในเซลล์ร่างกายทุกชนิดส่วน lamin B3 พบจำเพาะใน spermatogenic cells (Kierszenbaum, 2007)

โดยทั่วไปเซลล์แต่ละชนิดจะมีการแสดงโปรตีน intermediate filament เพียงกลุ่มเดียว เซลล์ที่ขาด intermediate filament มีน้อยมากและส่วนใหญ่พบที่ระยะแรกของการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) ใน blastomeres และ inner cell layer ของ blastocyst (Jackson *et al.*, 1980) เซลล์บางชนิดอาจมีการ express intermediate filament มากกว่า 1 กลุ่มเช่นในกรณี GFAP และ vimentin ที่จะมีการแสดงออกพร้อมได้ในเซลล์จำพวก astrocytes ที่พบในเซลล์และใน primary cultures (Dahl *et al.*, 1981; Schnitzer *et al.* Yen and Fields, 1981) ในขณะที่เซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจมีการแสดงออก intermediate filament ในกลุ่มที่ต่างกันอย่างต่อเนื่องในขณะที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลง เช่น myoblasts ที่สังเคราะห์ vimentin และมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกไปเป็น desmin อย่างชัดเจนเมื่อมันมีการรวมกันไปเป็น myotubes ในช่วงการสร้างระบบประสาท (neurogenesis) neuroblasts จะ express vimentin ในขณะที่มันจะสังเคราะห์ neurofilaments ในขณะที่เริ่ม neurite extension (Tapscott *et al.*, 1981; Ziller *et al.*, 1983) ท้ายที่สุด ปริมาณของ intermediate filament ที่มีการแสดงออกจะเปลี่ยนแปลงไปในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเปลี่ยนแปลง เช่นที่พบในเซลล์ preadipocytes ที่จะพบว่า มี vimentin, actin และ tubulin ลดลงอย่างชัดเจนในช่วงการเจริญพัฒนาไปเป็น adipose (Spiegelman and Farmer, 1982) ข้อมูลที่กล่าวมาได้บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่าง intermediate filament ที่มีการแสดงออกและการเจริญพัฒนาของเซลล์ในช่วงกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์ที่จำเพาะที่ทำให้ได้เซลล์ต่างๆ ที่มีหน้าที่เฉพาะที่ต่างกัน

3.2 โปรตีนเส้นใยที่เลือกใช้ในการศึกษานี้

3.2.1 Cytokeratins

Cytokeratin (CK) ซึ่งเป็น intermediate filaments ที่เป็นรูปแบบหนึ่งของโปรตีนโครงร่าง (cytoskeleton) โดยในปัจจุบันพบโปรตีนชนิดนี้ 20 ตัว (Barrett *et al.*, 1998) ซึ่ง expression อย่างแพร่หลายแต่จำกัดอยู่เฉพาะในเซลล์บุผิว (epithelial cell) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีการนำ cytokeratins มาใช้อย่างหลากหลายรูปแบบ เช่น ใช้ cytokeratins จำเพาะ (เช่น CK7, CK20) หรือคู่ที่เป็น cytokeratins ชนิดกรดและด่างเช่น CK8/18 หรือตามน้ำหนักโมเลกุลของ cytokeratin เมื่อพิจารณาจากการจำแนกกลุ่มล่าสุด สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือการแบ่ง cytokeratins ออกเป็นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งมีประโยชน์มากในแง่ที่ว่า low molecular-weight cytokeratins จะพบได้ใน simple epithelia เช่น simple ductules และพวกที่เป็น high-molecular-weight cytokeratins ซึ่งจะพบใน complex epithelia เช่น urothelium หรือผิวหนัง ในทางปฏิบัติจะใช้สำหรับเรียกแอนติบอดีที่ใช้ pan-cytokeratin เป็นแอนติบอดีที่ได้รับความนิยมซึ่งเป็นแอนติบอดีที่รวม AE1 และ AE3 ไว้ด้วยกันโดย AE1 จะระบุพวกที่เป็น acidic cytokeratins ได้แก่ 10, 14, 15, 16 และ 19 ขณะที่ AE3 จะระบุ basic cytokeratins ได้แก่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 เรียกได้ว่าเป็น wide-spectrum cytokeratin antibodies การแสดงออกของ cytokeratin ในผิวหนังปกติสามารถใช้ผิวหนังเป็นเนื้อเยื่อควบคุม (control tissue) สำหรับการประเมิน การแสดงออกของ cytokeratin โดยเซลล์บุผิวจะมีการแสดงออกของ cytokeratin อย่างจำเพาะดังตารางที่ 2

Cell Type	Cytokeratin Expressed
Suprabasal keratinocytes	1, 10
Basal keratinocytes	5 และ 14
Hair shaft	5, 6, 14, 15, 16, 17
Eccrine ductular cells	7, 8, 17, 18, 19
Eccrine myoepithelial cells	5, 6, 14

ตารางที่ 2 แสดง Cytokeratin Expression ในผิวหนังปกติ

ที่มา: Folpe *et al.* (2007)

3.2.2 Vimentin

Vimentin พบได้ในเซลล์ตัวอ่อนเกือบทุกชนิด ที่เจริญไปเป็นเนื้อเยื่อในกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยโดยพบว่าเซลล์ในเนื้องอกกลุ่ม sarcomas เกือบทุกชนิดจะมีการแสดงออกของ vimentin (Duquette *et al.*, 2005) พบการแสดงออกบนผิวเซลล์ macrophage, platelet และ apoptotic T lymphocytes neutrophil (Moisan and Girarde, 2006) neuronal precursors (Dubey *et al.*, 2004) และมีรายงานการประยุกต์ใช้กับเนื้องอกกลุ่ม schwannoma (Viott *et al.*, 2008) ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีรูปแบบการกระจายตัวของ vimentin อยู่ทั่ว ไซโตพลาสซึมและพบว่าติดสีเข้มที่สุดในบริเวณขอบเซลล์ ส่วนในเซลล์กล้ามเนื้อลายจะพบการแสดงออกน้อยลงเมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ (Young *et al.*, 1994) รวมถึงเซลล์ไขมัน (lipocyte) ที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกลดลงในเซลล์ที่มีการเจริญเต็มที่เช่นกัน แต่ก็ยังพบมีการประยุกต์ใช้ในเนื้องอกชนิด liposarcoma (Wang *et al.*, 2005) การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของ melanocytes ในคนพบการแสดงออกของ vimentin ได้ และมีรายงานการใช้ร่วมกับมาร์คเกอร์ตัวอื่นๆ ในการวินิจฉัย melanoma (Maliver *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2001) เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) และ pericytes พบเป็นเซลล์ที่พบว่า มีการแสดงออกของ vimentin (Virgintino *et al.*, 1993) และมีรายงานการใช้ vimentin เพื่อศึกษาเนื้องอกชนิด hemangiosarcoma ในสุนัขที่เซลล์เนื้องอกมีต้นกำเนิดจากเซลล์บุหลอดเลือด (Sabattini and Bettini, 2009) และ hemangiopericytoma (Perez *et al.*, 1996)

vimentin นิยมใช้สำหรับเป็น มาร์คเกอร์ของ fibroblast ในกลุ่มเซลล์มะเร็งเต้านม และตรวจสอบมะเร็งชนิด fibrosarcoma ในสุนัข (Vascellari *et al.*, 2003) นอกจากนั้นมียาว่าพบการแสดงออกของ vimentin ใน perianal gland cell อีกด้วยแต่รูปแบบในการแสดงออกในบริเวณรอบนิ่วเคลียสเท่านั้นส่วน myoepithelial cell ไม่พบการย้อมติดของ vimentin (Vos *et al.*, 1992) ส่วนใหญ่การใช้ประโยชน์ของ vimentin ในการวินิจฉัยบ่งชี้ชนิดของเนื้องอกและการพยากรณ์โรค จะได้ผลดีเมื่อใช้ร่วมกับ cytokeratin (Thomas *et al.*, 1999)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังที่อยู่ในรูปพาราฟินบล็อก (Processed tissue for paraffin wax embedding)
2. เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome)
3. อ่างน้ำตั้งอุณหภูมิ ประมาณ 43 องศาเซลเซียส
4. Coated slides
5. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave Oven)
6. นาฬิกาจับเวลา
7. Coplin jars
8. 10 mM Citrate Buffer pH 6
9. สารละลาย H_2O_2 3%
10. ปากกาสำหรับใช้ในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี
11. Primary Antibody
12. Visualization Reagent
13. Substrate-Chromogen
14. ชุดย้อมสี Hematoxylin
15. Xylene
16. Absolute Ethanol, 95% Ethanol
17. น้ำกลั่น

วิธีการ

1. การเก็บข้อมูลและตัวอย่าง

กระทำโดยเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเนื้องอกแต่ละกลุ่มที่มีเซลล์ต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อคัพพะต่างกัน สองกลุ่มได้แก่ เนื้องอกจากเนื้อเยื่อ ectoderm ได้แก่ perianal gland adenoma, trichoblastoma, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, sebaceous gland epithelioma, sebaceous gland adenocarcinoma ชนิดละ 5 ตัวอย่าง และเนื้องอกจากเนื้อเยื่อ

mesoderm หรือเซลล์ mesenchyme ได้แก่ fibrosarcoma, schwannoma, osteosarcoma, liposarcoma, hemangiosarcoma และ hemangiopericytoma ชนิดละ 5 ตัวอย่างในระหว่างปี 2549-2552 รวมกลุ่มละ 30 ตัวอย่าง โดยจะเก็บข้อมูลของตัวอย่างชิ้นเนื้อไปผ่านกระบวนการให้อยู่ในรูป พาราฟินบล็อก หลังจากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้มาทำ serial sections หนา 4 μm และวางบนแผ่น สไลด์ ตัวอย่างละ 5 สไลด์

2. การเลือกใช้แอนติบอดี

แอนติบอดีที่นำมาใช้เป็นมาร์กเกอร์ของเนื้องอกนั้นต้องจำเพาะต่อโปรตีนที่ปรากฏใน เซลล์เนื้องอกที่นำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อ โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ Monoclonal Mouse Antibody ต่อ Human Cytokeratin (Cytokeratin clone AE1/AE3, DBS) สำหรับชิ้นเนื้องอกที่กำเนิดจากเซลล์ เยื่อบุผิวและต่อม และใช้ Monoclonal Mouse Antibody ต่อ Vimentin (Vimentin clone V9, DBS) สำหรับชิ้นเนื้องอกที่กำเนิดจากเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือเซลล์ mesenchyme

3. แผนการทดสอบ

3.1 การทดสอบแอนติบอดี Cytokeratin (AE1/AE3)

สำหรับแอนติบอดี cytokeratin AE1/AE3 ใช้ตัวอย่าง จำนวน 30 ตัวอย่างแบ่งเป็นกลุ่ม เนื้องอกจาก ectoderm เช่น ได้แก่ perianal gland adenomas, basal cell tumors, basal cell carcinomas, squamous cell carcinoma, sebaceous gland adenocarcinoma, sebaceous gland epithelioma

ชนิดละ 5 ตัวอย่าง

3.1.1 ขั้นตอนที่ 1

1 ตัวอย่างทำ 4 สไลด์ ก่อนโดยเริ่มจากความเข้มข้นที่แนะนำ และที่ความเข้มข้นที่ ลดลง รวมกับทดสอบกับวิธี AR ที่ได้ศึกษาว่าได้ผลดีกับแอนติเจนชนิดนี้ มีรายงานว่า AE1/AE3 การใช้ AR ด้วยการให้ความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟ ความเข้มข้นที่ 1:50 ดีที่สุด

ใน 1 แผ่นสไลด์ ใช้แอนติบอดีที่เจือจางแล้วประมาณ 100 ไมโครลิตร ก็ท่วม tissue section ซึ่งจะไม่แห้งตลอดระยะเวลาที่บ่มทิ้งไว้ สำหรับขั้นตอนที่ 1 ใช้ แอนติบอดี 5 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนั้น 30 ตัวอย่างใช้ primary antibody 150 ไมโครลิตร
ถ้าทดสอบว่า การใช้ความเข้มข้นที่ 1:100 ยังดีดสีได้ดีสามารถทำขั้นที่สองได้โดย

3.1.2 ขั้นตอนที่ 2 ทำการทดสอบเพิ่มอีก 1 สไลด์ ที่ 1: 200 โดยเมื่อต้องทดสอบเพิ่มอีก 30 สไลด์ ใช้แอนติบอดี อีก 30 ไมโครลิตร ดังนั้น สองขั้นตอนใช้แอนติบอดีรวม 180 ไมโครลิตร

3.2 การทดสอบแอนติบอดี Vimentin

สำหรับแอนติบอดี Vimentin clone V9 ใช้ตัวอย่าง จำนวน 30 ตัวอย่างแบ่งเป็นกลุ่มเนื้อ
งอกจาก mesenchymal ได้แก่ fibrosarcomas, liposarcomas, hemangiosarcomas,
hemangiopericytomas, schwannoma, melanomas ชนิดละ 5 ตัวอย่าง

3.2.1 ขั้นตอนที่ 1 สำหรับ 1 ตัวอย่างจะทำ 4 สไลด์ ก่อนโดยเริ่มจากความเข้มข้นที่
แนะนำ และที่ความเข้มข้นที่ลดลง รวมกับทดสอบกับวิธี AR ที่ได้ศึกษาว่าได้ผลดีกับแอนติเจน
ชนิดนี้ มีรายงานว่าแอนติบอดีต่อ Vimentin นี้ให้ผลดีการใช้วิธีเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนโดยการให้
ความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟ ความเข้มข้นที่ 1:50 ดีที่สุด

ใน 1 แผ่นสไลด์ ใช้แอนติบอดีที่เจือจางแล้วประมาณ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะไม่แห้ง
ตลอดระยะเวลาที่บ่มทิ้งไว้ ขั้นตอนที่ 1 ใช้ แอนติบอดี 5 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่าง
ชิ้นเนื้อ 30 ตัวอย่างใช้ 150 ไมโครลิตร ถ้าทดสอบว่า การใช้ความเข้มข้นที่ 1:100 ยังดีดสีได้ดีให้ทำ
ขั้นที่สอง

3.2.2 ขั้นตอนที่ 2 ทำการทดสอบเพิ่มอีก 1 สไลด์ ที่ 1: 200 ซึ่งในกรณีที่ต้องทดสอบ
เพิ่มอีก 30 สไลด์ ใช้แอนติบอดี อีก 30 ไมโครลิตร ดังนั้นการทดสอบสองขั้นตอนใช้แอนติบอดี
รวม 180 ไมโครลิตร

3. เทคนิคการย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี

3.1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดจะถูกทำปฏิกิริยาเปิดแอนติเจนโดยใช้ความร้อน โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อที่แช่อยู่ในสารละลาย 0.1 M citrate buffer (pH 6) อบด้วยเตาอบไมโครเวฟที่ตั้งกำลังไฟที่ 720 W สามรอบ ๆ ละ 10 นาที ในช่วงแต่ละรอบนำภาชนะที่บรรจุสารละลายออกมาตรวจสอบ ปริมาตรถ้าสารละลายมีปริมาตรลดลงให้เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเท่าปริมาตรเริ่มต้น หลังจากนั้นนำสไลด์ออกจากเตาอบไมโครเวฟแล้วทิ้งไว้ให้เย็นนาน 20 นาที

3.2 จากนั้นนำสไลด์ไปแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที

3.3 หยดด้วย H_2O_2 3% ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อกำจัด endogenous peroxidase

3.4 หลังจากนั้นล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.5 หยดด้วย 0.4% casein ใน TBS ให้ท่วมเนื้อเยื่อที่อยู่บนสไลด์ทิ้งไว้ 5 นาที

3.6 หลังจากนั้นล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.7 หยด primary antibody ลงบนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่อยู่บนสไลด์ให้ท่วม ทิ้งไว้ที่ $37^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมงโดยแอนติบอดีแต่ละชนิดเจือจางดังนี้คือ cytokeratin antibody ใน TBS ให้ได้อัตราส่วน 1:50 และ vimentin antibody ใน TBS ให้ได้อัตราส่วน 1:50

3.8 ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.9 หยด 10% normal goat serum ให้ท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 30 นาที

3.10 ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.11 หยด NovoLink™ Polymer Detection system* ให้ท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 30 นาที

3.12 ล้างด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วหยดสารละลาย DAB chromogen/substrate

3.13 ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเกิดได้สีเข้มพอตรวจสอบโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์

3.14 ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำสไลด์ไปแช่ในน้ำประปาไหล 15 นาที

* NovoLink™ Polymer Detection system เป็น Anti-mouse/rabbit IgG -Poly-HRP

* กรณีที่ใช้ระบบการตรวจวัดแบบปราศจากการขยายสัญญาณจะแทนที่ Novolink™ Polymer Detection system ด้วย Goat Anti-mouse IgG HRP 1: 500 ใน TBS

4. การปรับสถานะที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้การใช้เทคนิคมีประสิทธิภาพดีและสะดวกสำหรับงานวินิจฉัยประจำวัน

สถานะต่างๆ ของการทดลองที่ทำการปรับปรุงในการศึกษานี้ ได้แก่ ความเข้มข้นของ แอนติบอดีที่ใช้ ระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน จะทำการประเมินและเปรียบเทียบ ดังนี้

4.1 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ปรับ

หลังจากทำการทดสอบเจือจางแอนติบอดีที่ใช้โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1:50 และ 1: 100 ได้ผลการ ติดสีเข้มชัดเจน จะนำเนื้องอกตัวอย่างแต่ละชนิดทำการเจือจาง primary antibody ไปเรื่อยๆ ที่ความเข้มข้นต่อไปนี้ 1: 100, 1:200, 1:300, 1:400 จนกระทั่งได้ระดับการติดสีที่ไม่สามารถยอมรับได้ แสดงผลการติดสีเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ยอมรับได้ในเนื้องอกแต่ละชนิด ดังตารางที่ 4 และ รูปภาพ 21-91

4.2 ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม primary antibody กับเนื้อเยื่อ

ทำการเปรียบเทียบ สถานะการบ่ม primary antibody กับเนื้อเยื่อที่สองสถานะดังนี้คือ

4.2.1 ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน

4.2.2 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

ผลที่ได้เปรียบเทียบการติดสีและความเข้มของการติดสีดังตารางที่ 5

4.3 เปรียบเทียบระบบการตรวจวัดระหว่าง polymer detection systems กับระบบ indirect

conjugated ที่ปราศจากการขยายสัญญาณ ต่อความเข้มข้นของ primary antibody ที่ระดับต่างๆ ดัง ตารางที่ 6 ภาพที่ 92-95 ทำการบันทึกข้อมูลในแต่ละขั้นตอนสำหรับใช้ปรับปรุงขั้นตอนต่าง ๆ ให้ ได้สถานะที่เหมาะสมและดีที่สุดสำหรับการใช้เทคนิคนี้

5. การอ่านผลการทดลอง

ประเมินผลการย้อมสีโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในเนื้องอกแต่ละชนิดจะถูกประเมินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic interpretation) โดยศึกษาจากรูปแบบและปริมาณการติดสีของ intermediate filament ที่เลือกไว้ภายในไซโตพลาสซึม, การตัดสินใจตัวอย่างแสดงผลเป็นบวกหรือลบ ประเมินจากการเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อที่เป็น positive control และ negative control โดยเนื้อเยื่อที่ใช้เป็น positive control สำหรับ cytokeratin คือผิวหนังปกติของสุนัข ส่วน negative control ใช้เนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนัง และใช้ TBS แทนที่ cytokeratin antibody สำหรับเนื้อเยื่อที่เป็น positive control สำหรับ vimentin คือเนื้อเยื่อจากชิ้นใต้ผิวหนัง ส่วน negative control ใช้เนื้อเยื่อผิวหนังและใช้ TBS แทนที่ cytokeratin antibody

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์เปรียบเทียบ ความจำเพาะ และความไวโดยเทียบกับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาจากผู้เชี่ยวชาญ (Agreement between tests) แล้วนำข้อมูลที่ได้อมาหาค่า K (kappa) (Cohen, 1960) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป Win Episcope 2.0

Value of K	Strength of agreement
< 0.20	Poor
0.21 - 0.40	Fair
0.41 - 0.60	Moderate
0.61 - 0.80	Good
0.81 - 1.00	Very good

ผลและวิจารณ์

ผล

ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3-6 พบมีการข้อมติเซลล์ที่จำเพาะและมีการคิดสีในระดับที่ยอมรับได้และสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มของเนื้องอกตามเซลล์ต้นกำเนิดจากการตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา ($kappa=1$) แต่ความเข้มในการคิดสียังมีความผันแปรในเนื้องอกต่างชนิดตามระดับการเจริญพัฒนาของเซลล์แต่ละชนิด ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 20-91 ซึ่งต้องทำการประเมินต่อไป การใช้เทคนิคการตรวจวัด (detection system) ที่มีความไวสูงในการศึกษานี้มีผลต่อการคิดสีของเนื้องอกได้ชัดเจนและลดการเกิดการคิดสีแบบไม่จำเพาะ (non-specific background) กับเซลล์อื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องในเนื้อเยื่อ การนำเทคนิคการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนกับเนื้อเยื่อสุนัขที่อยู่ในรูปพาราฟินบล็อกพบว่าสามารถได้ผลการข้อมติที่ดี (Haines and Chelack 1991)

ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบการติดสี ปริมาณและความเข้มในการติดของเซลล์เนื้องอกกลุ่มเยื่อบุผิว และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

ชนิดเนื้องอก	แอนติบอดี	ความเข้มขึ้น	ตำแหน่งที่ติดสี	ความเข้มของเซลล์ที่ติดสี ¹	ปริมาณเซลล์เนื้องอกที่ติดสี ²
ของแอนติบอดี					
Epithelial tumors	Cytokeratin				
-Squamous cell carcinoma	(AE1/AE3)	1: 50	Cytoplasm	3	4
-Trichoblastoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Basal cell carcinoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Sebaceous epithelioma			Cytoplasm	3	4
-Sebaceous gland adenocarcinoma		1: 50			
			Cytoplasm	3	4
-Perianal gland adenoma		1: 50			
			Cytoplasm	3	4
Mesenchymal tumors	Vimentin				
-Fibrosarcoma	(clone V9)	1: 50	Cytoplasm	3	4
-Schwannoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Hemangiosarcoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Hemangiopericytoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Melanoma		1: 50	Cytoplasm	3	4
-Liposarcoma		1: 50	Cytoplasm	3	3

¹ ความเข้มของการติดสี: 3 = เข้มมาก, 2 = ปานกลาง, 1 = น้อย, 0 = ไม่ติดสี

² ปริมาณเซลล์เนื้องอกที่ติดสี (คิดเป็นร้อยละ): 4 = มากกว่าร้อยละ 75, 3 = ร้อยละ 51-75, 2 = ร้อยละ 11-50, 1 = ร้อยละ 1-11, 0 = ไม่มีเซลล์ที่ติดสี

ที่มา: Walter (2000)

ตารางที่ 4 แสดงรูปความเข้มในการติดของเซลล์เนื้องอกกลุ่มเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ความเข้มขึ้นต่างๆ

ชนิดเนื้องอก	แอนติบอดี	ความเข้มขึ้นของแอนติบอดี			
		1:50	1:100	1:200	1: 300
Epithelial tumors	Cytokeratin				
-Squamous cell carcinoma	(AE1/AE3)	3	3	2	2
-Trichoblastoma		3	3	2	2
-Basal cell carcinoma		3	3	2	2
-Sebaceous epithelioma		3	3	2	2
-Sebaceous gland adenocarcinoma		3	3	2	2
-Perianal gland adenoma		3	3	2	2
Mesenchymal tumors	Vimentin				
-Fibrosarcoma	(clone V9)	3	3	2	1
-Schwannoma		3	3	2	1
-Hemangiosarcoma		3	3	2	1
-Hemangiopericytoma		3	3	2	1
-Melanoma		3	3	2	1
-Liposarcoma		3	3	2	1

¹ ความเข้มของการติดสี: 3 = เข้มมาก, 2 = ปานกลาง, 1 = น้อย, 0 = ไม่ติดสี

ตารางที่ 5 แสดงการความเข้มของการติดสีเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการบ่ม primary antibody กับเนื้อเยื่อ

ชนิดเนื้องอก	แอนติบอดี	สภาวะที่ใช้ในการบ่ม primary antibodies กับเนื้อเยื่อ	
		ที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน	ที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง
Epithelial tumors	Cytokeratin		
-Squamous cell carcinoma	(AE1/AE3)	3	3
-Trichoblastoma	ที่ความเข้มข้น 1:300	2	2
-Basal cell carcinoma		3	3
-Sebaceous epithelioma		3	3
-Sebaceous gland adenocarcinoma		2	2
-Perianal gland adenoma		2	2
Mesenchymal tumors	Vimentin		
-Fibrosarcoma	(clone V9)	3	3
-Schwannoma	ที่ความเข้มข้น 1:200	3	3
-Hemangiosarcoma		2	2
-Hemangiopericytoma		3	3
-Melanoma		3	3
-Liposarcoma		2	2

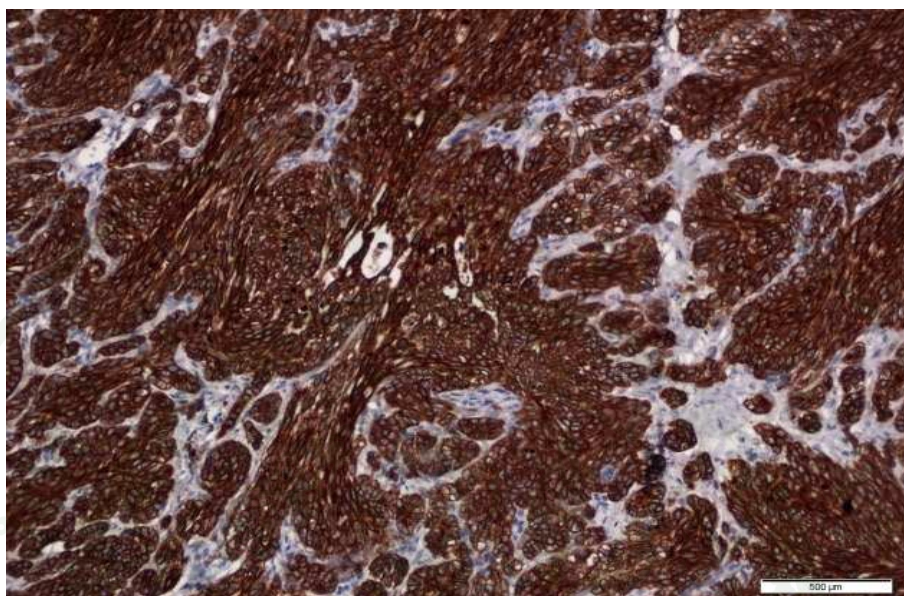
¹ ความเข้มของการติดสี: 3 = เข้มมาก, 2 = ปานกลาง, 1 = น้อย, 0 = ไม่ติดสี

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการใช้ระบบการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นที่ให้ผลการติดสีที่ยอมรับได้

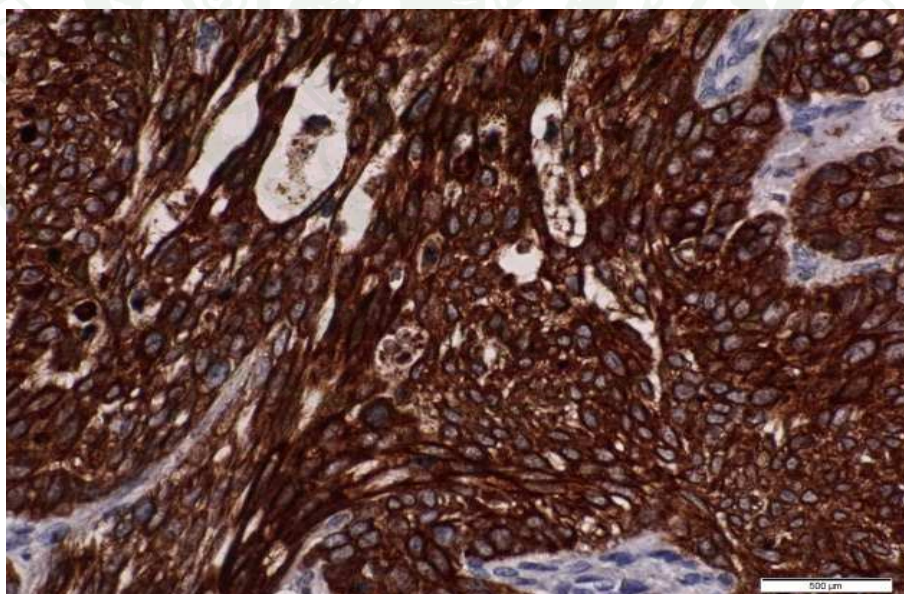
ชนิดเนื้องอก	แอนติบอดี	ความเข้มข้นของแอนติบอดี			
		Polymer Detection System		Indirect Conjugated System	
		1:50	1:200	1:50	1: 200
Epithelial tumors	Cytokeratin				
-Squamous cell carcinoma	(AE1/AE3)	3	3	3	1
-Trichoblastoma		3	3	3	1
-Basal cell carcinoma		3	3	3	1
-Sebaceous epithelioma		3	3	3	1
-Sebaceous gland adenocarcinoma		3	3	3	1
-Perianal gland adenoma		3	3	3	1
Mesenchymal tumors	Vimentin				
-Fibrosarcoma	(clone V9)	3	3	3	1
-Schwannoma		3	3	3	1
-Hemangiosarcoma		3	3	3	1
-Hemangiopericytoma		3	3	3	1
-Melanoma		3	3	3	1
-Liposarcoma		3	3	3	1

¹ ความเข้มของการติดสี: 3 = เข้มมาก, 2 = ปานกลาง, 1 = น้อย, 0 = ไม่ติดสี
 ตรวจสอบระดับความเข้มของการติดสีของการติดสีจากภาพที่ 92-95

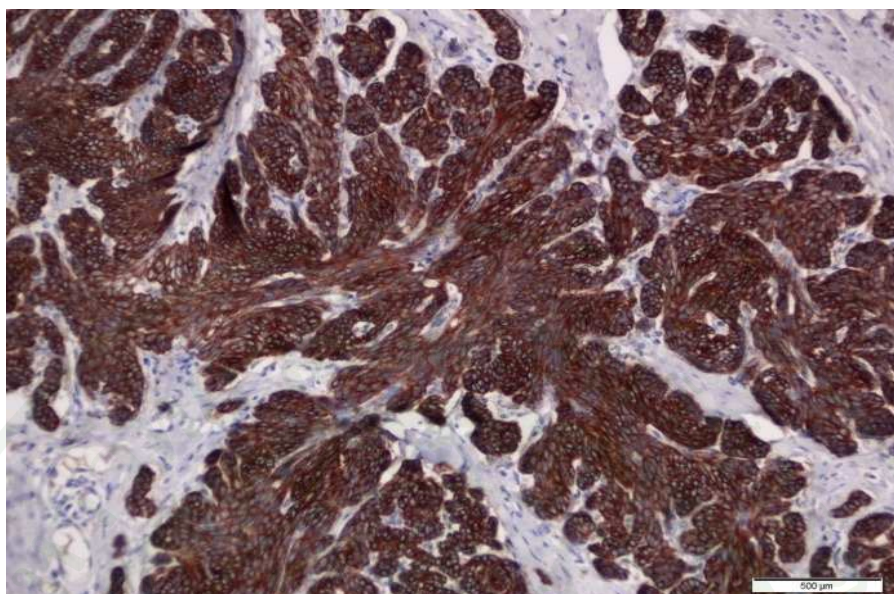
ภาพแสดงการติดสีของเนื้องอกชนิดต่างๆ ในระดับความเข้มข้นของ primary antibodies ที่แตกต่างกัน



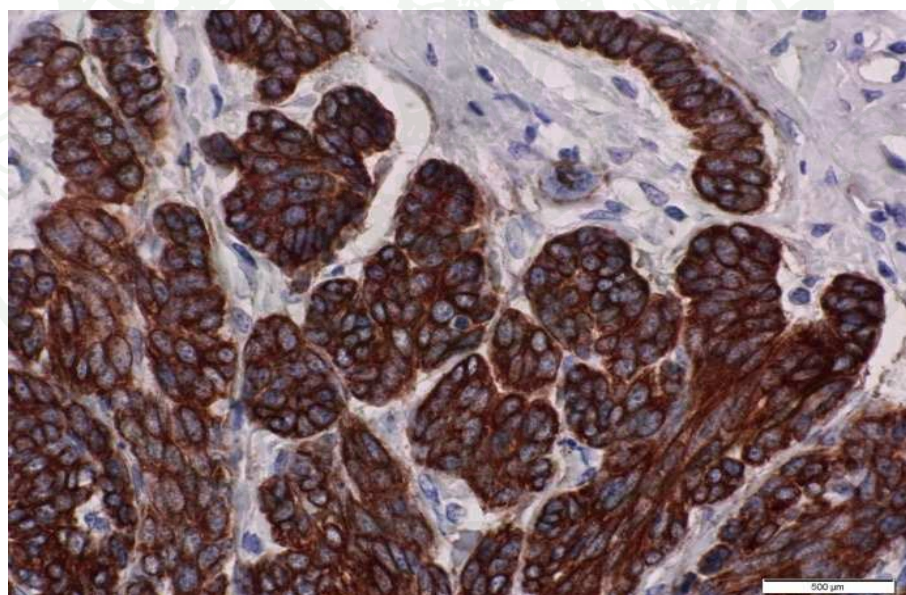
ภาพที่ 20 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



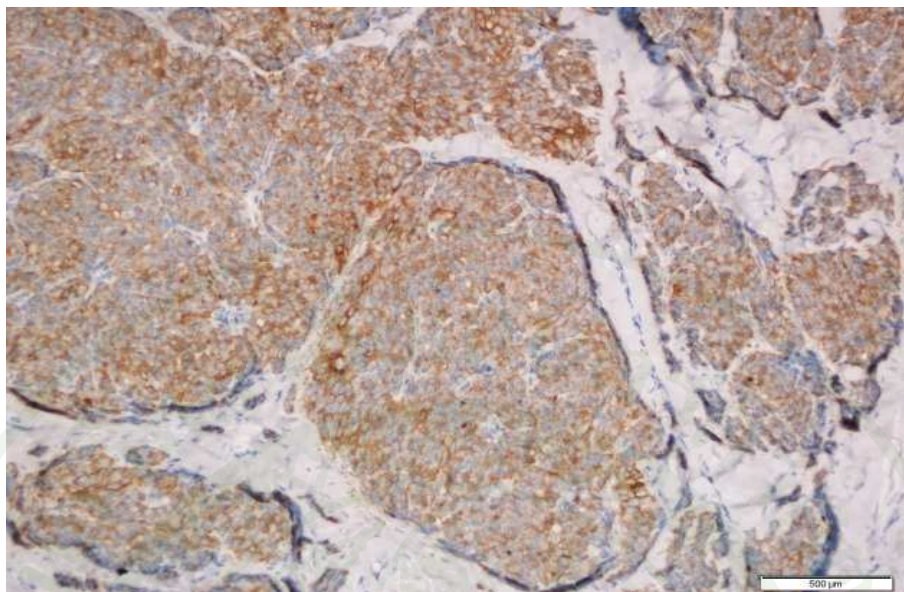
ภาพที่ 21 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



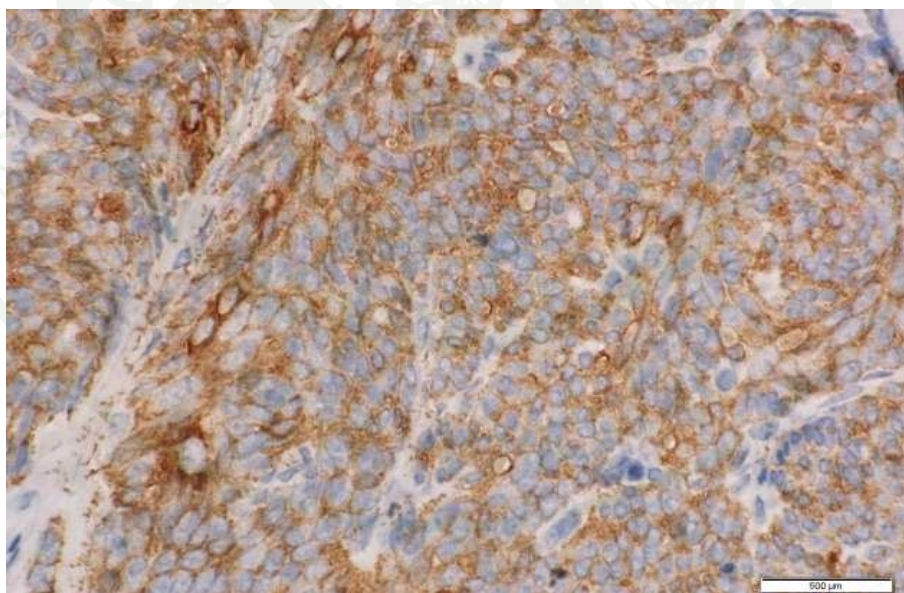
ภาพที่ 22 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



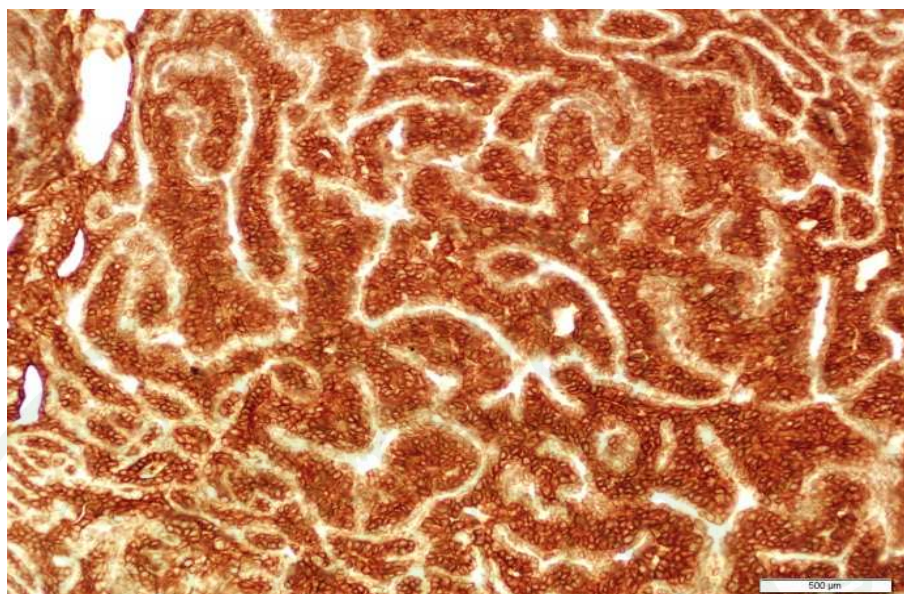
ภาพที่ 23 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



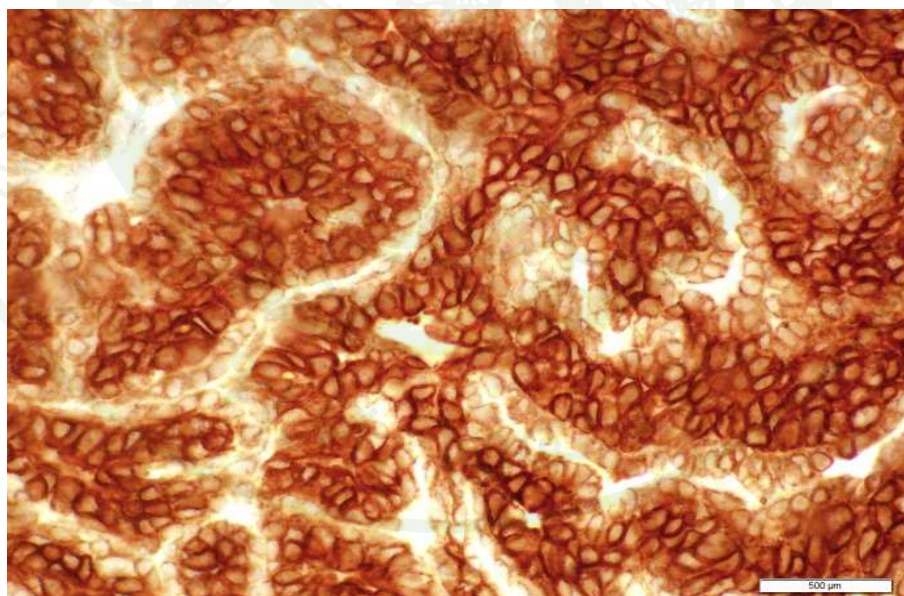
ภาพที่ 24 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:500
Bar = 500 μ m



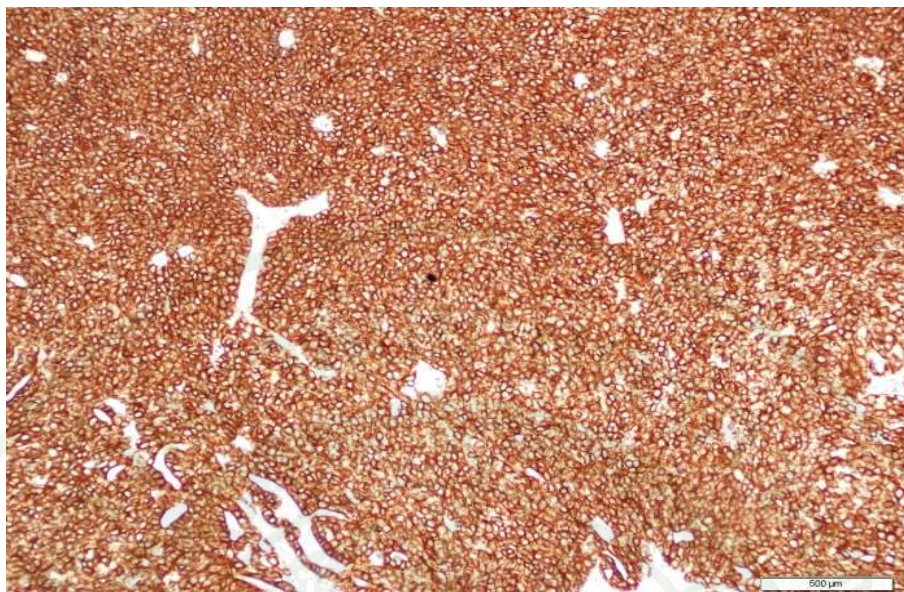
ภาพที่ 25 Basal cell tumor, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:500
Bar = 500 μ m



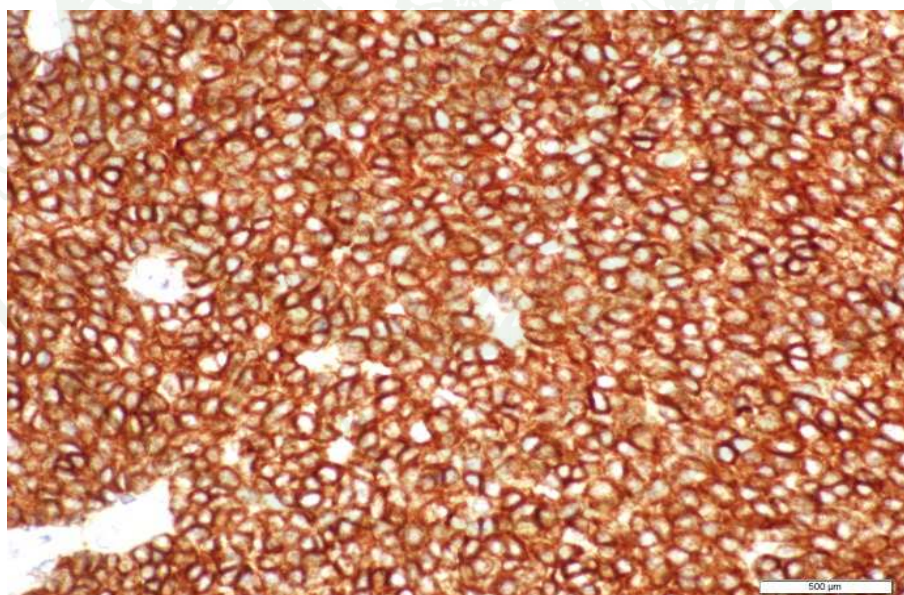
ภาพที่ 26 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:50
Bar = 500 μ m



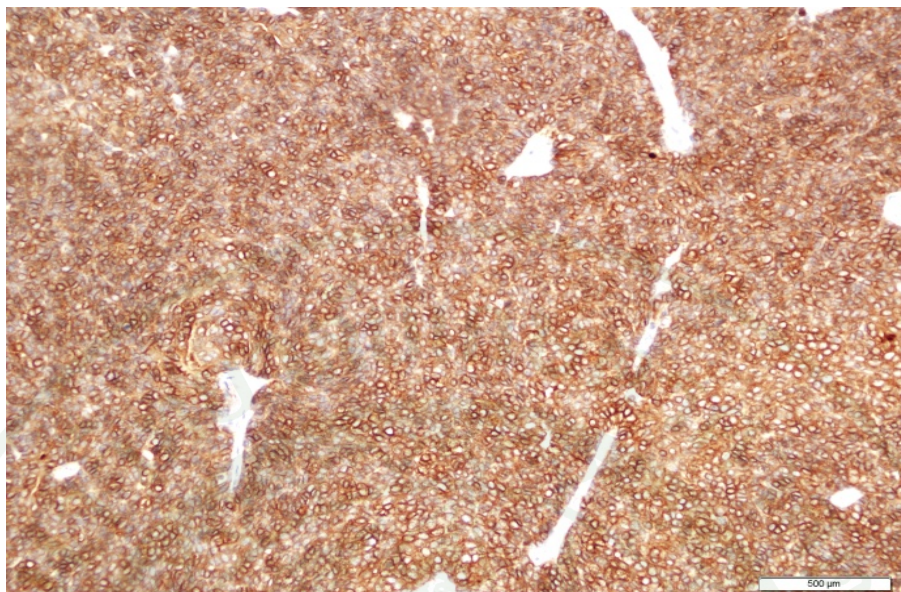
ภาพที่ 27 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:50
Bar = 500 μ m



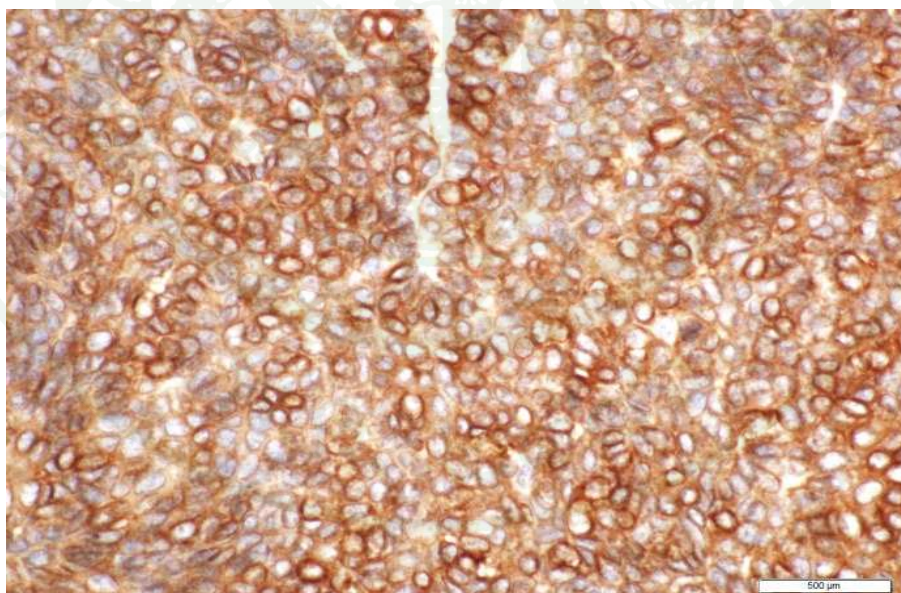
ภาพที่ 28 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:300
Bar = 500 μ m



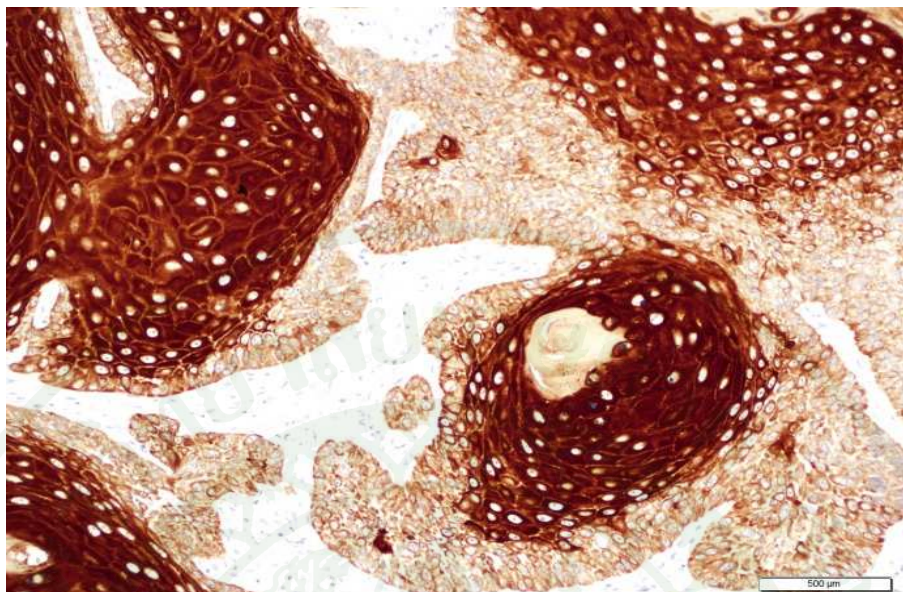
ภาพที่ 29 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:300
Bar = 500 μ m



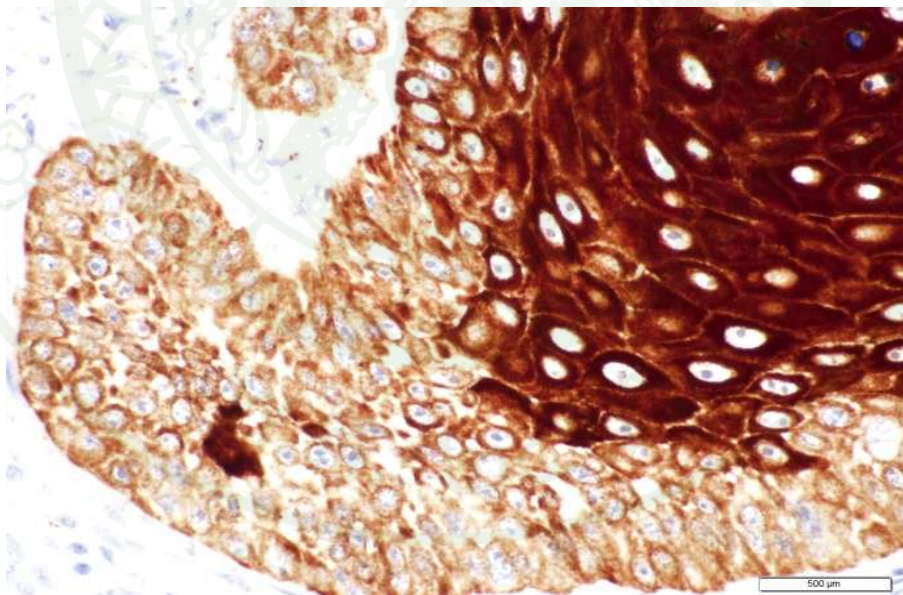
ภาพที่ 30 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:400
Bar = 500 μm



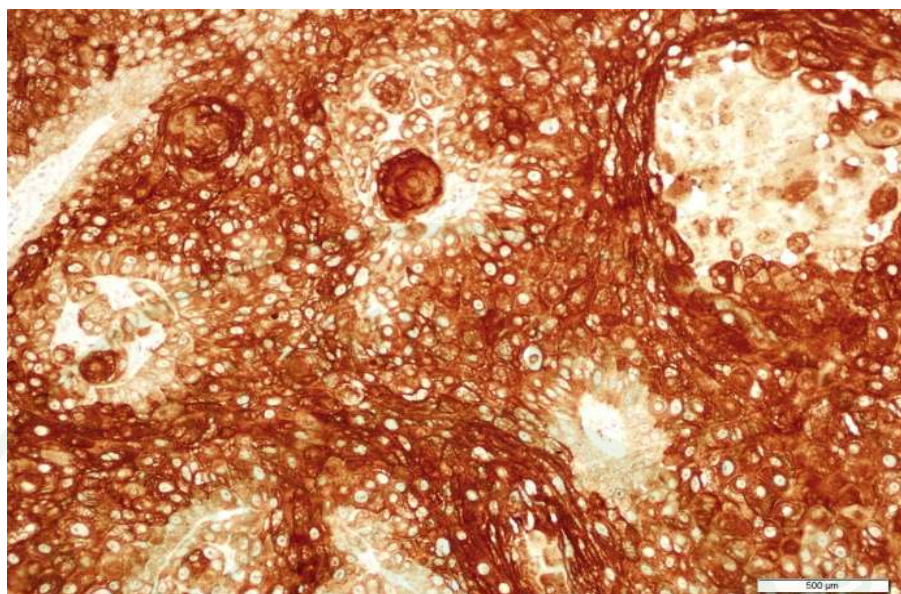
ภาพที่ 31 Basal cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody 1:400
Bar = 500 μm



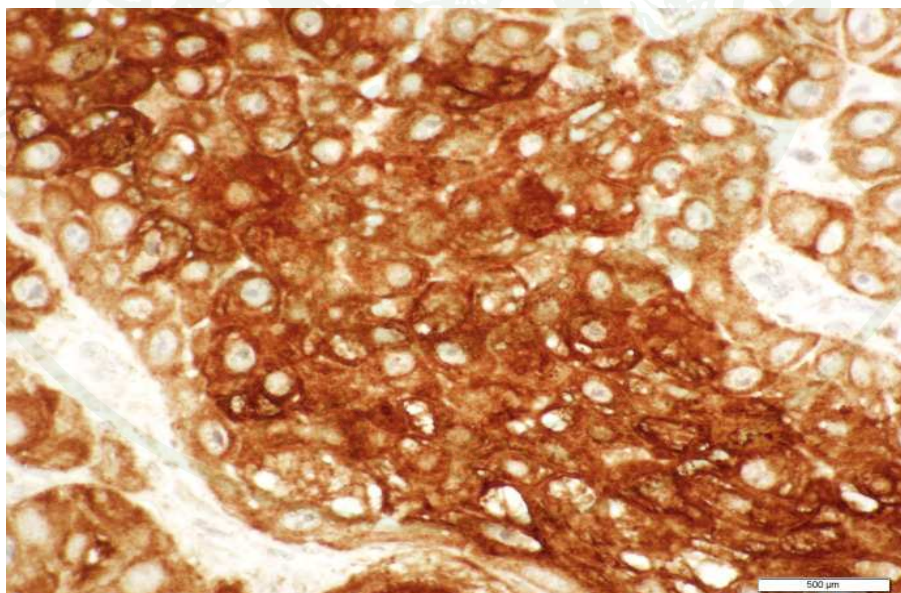
ภาพที่ 32 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50 Bar = 500 μm



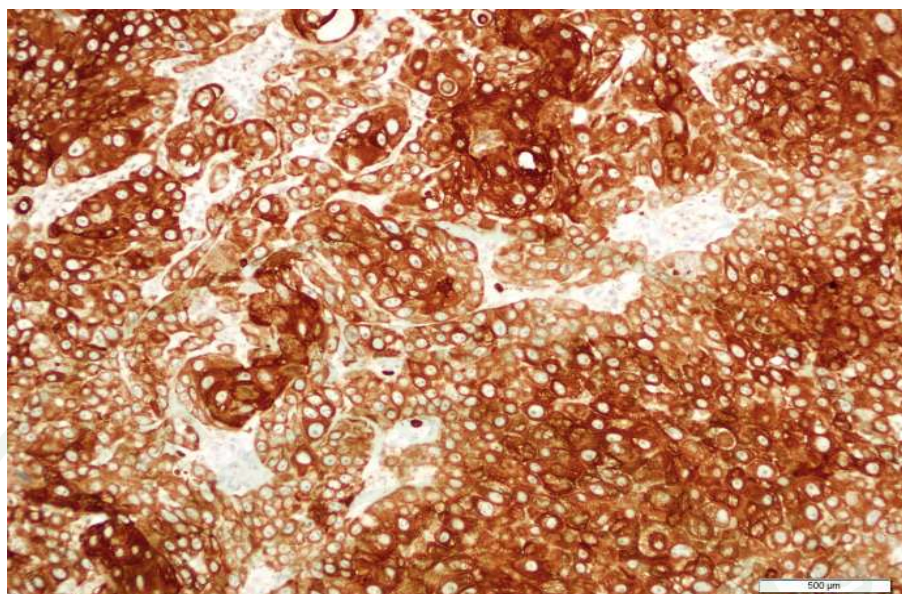
ภาพที่ 33 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50 Bar = 500 μm



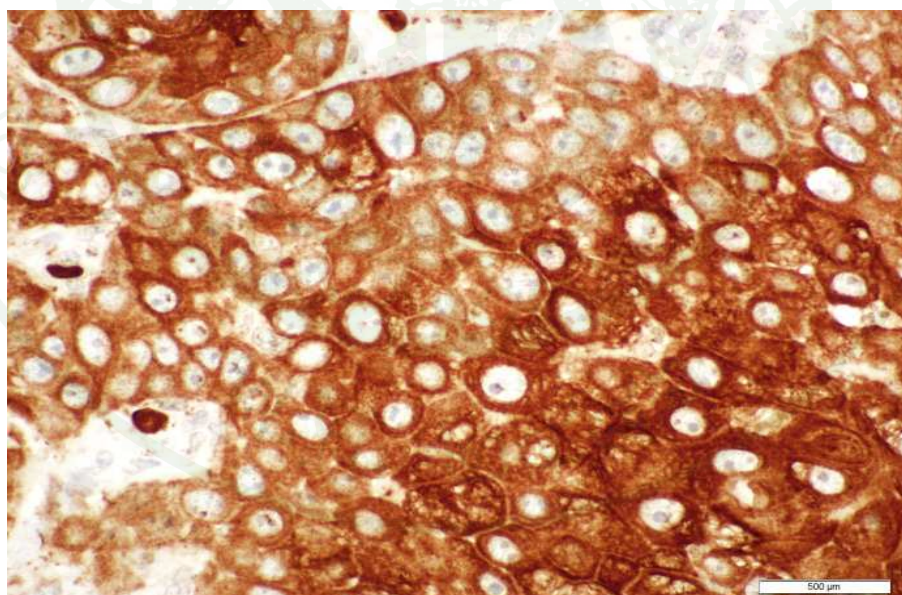
ภาพที่ 34 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200 Bar = 500 μm



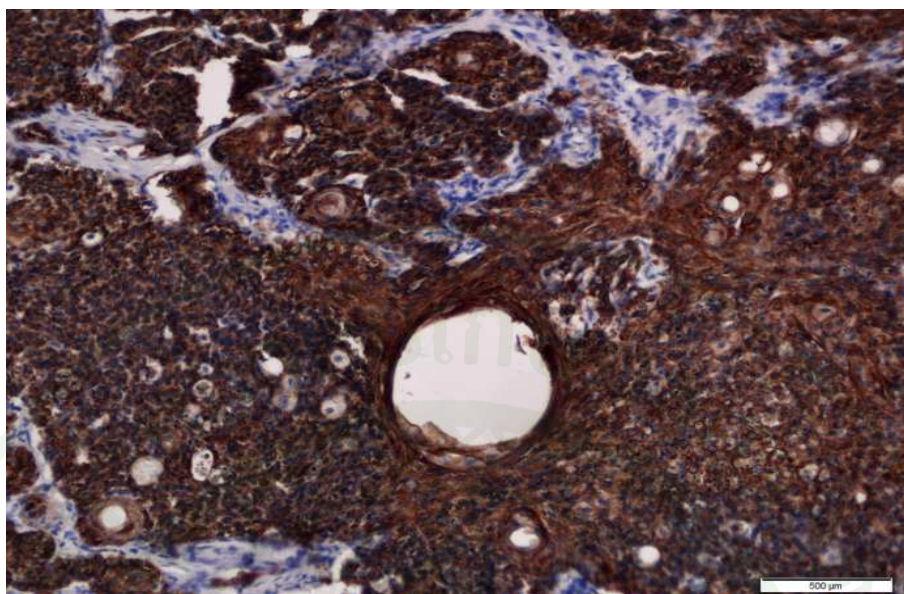
ภาพที่ 35 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200 Bar = 500 μm



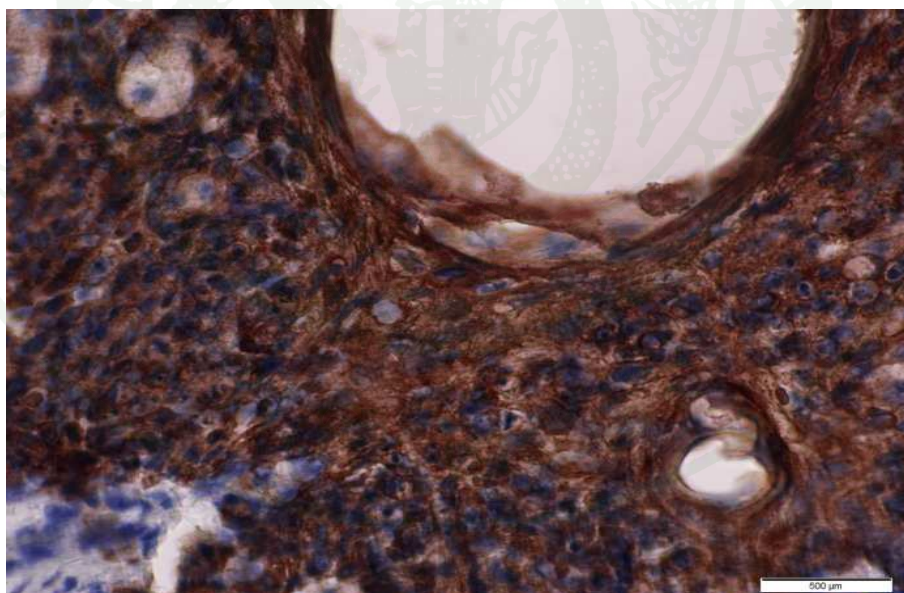
ภาพที่ 36 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300 Bar = 500 μm



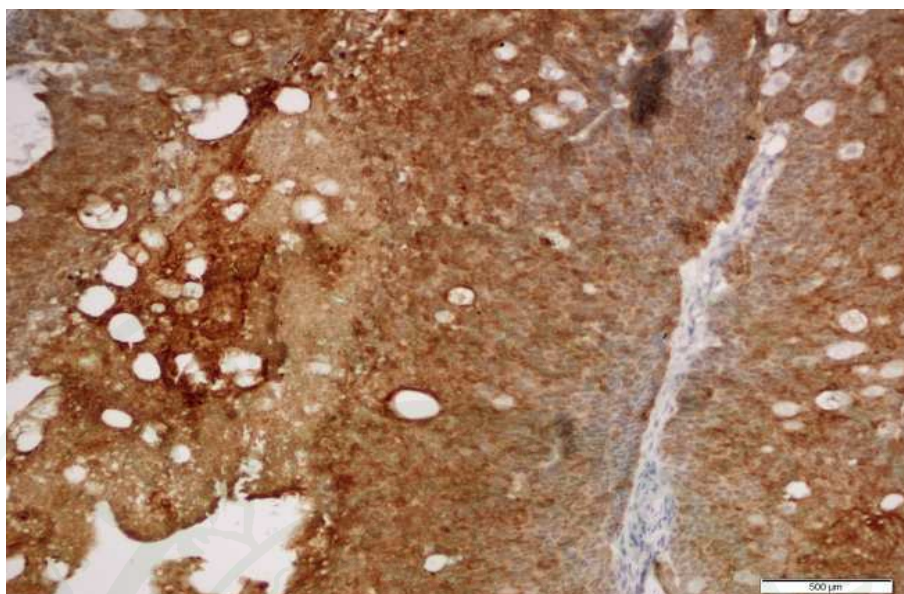
ภาพที่ 37 Squamous cell carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300 Bar = 500 μm



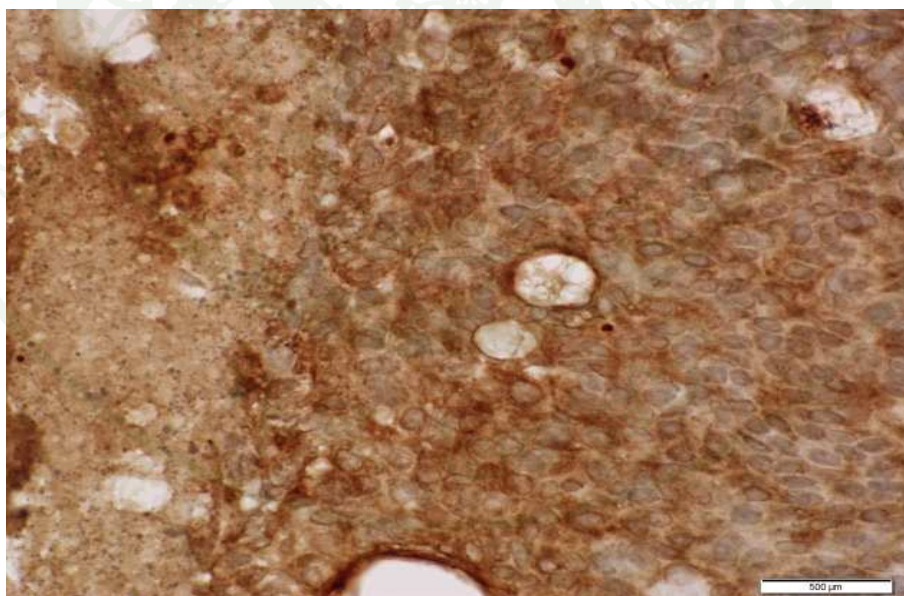
ภาพที่ 38 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



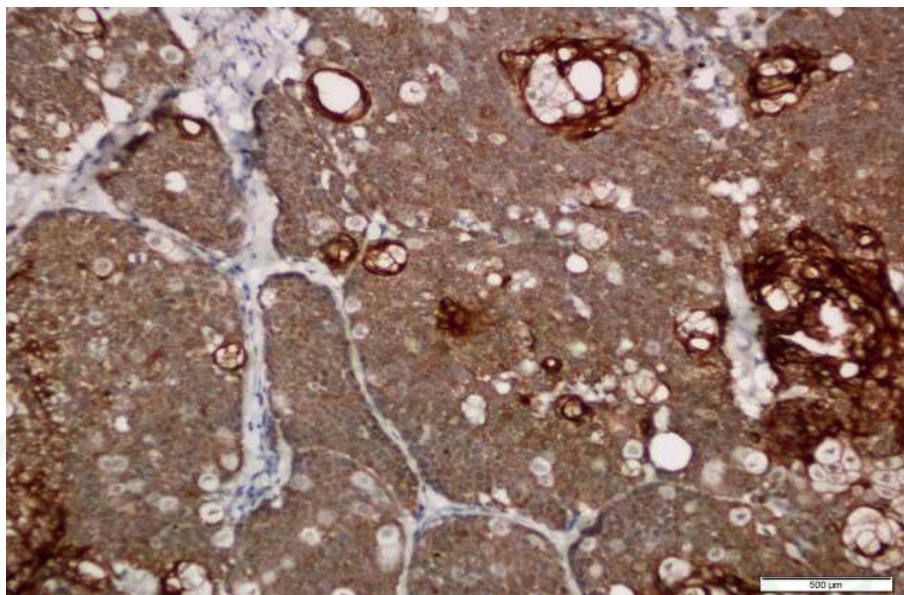
ภาพที่ 39 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



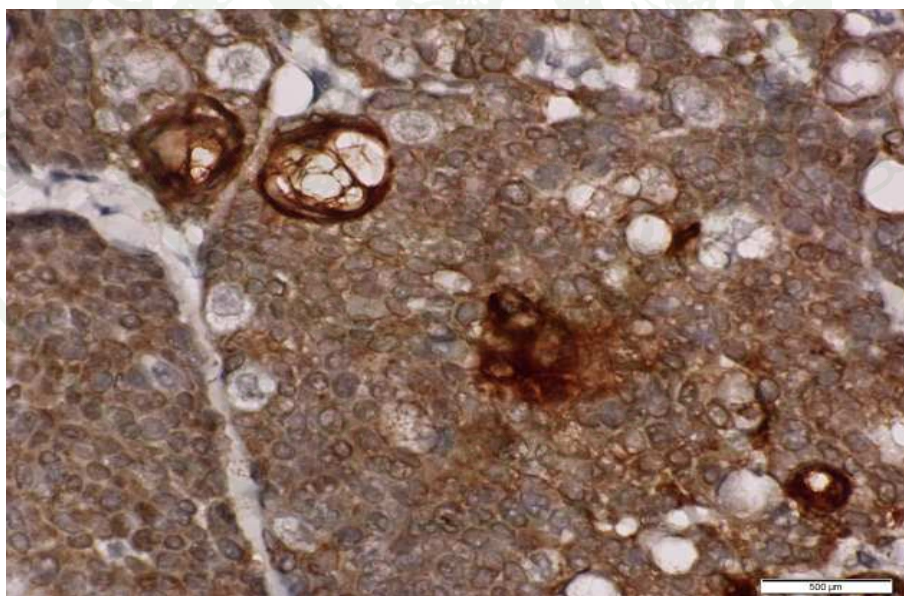
ภาพที่ 40 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μm



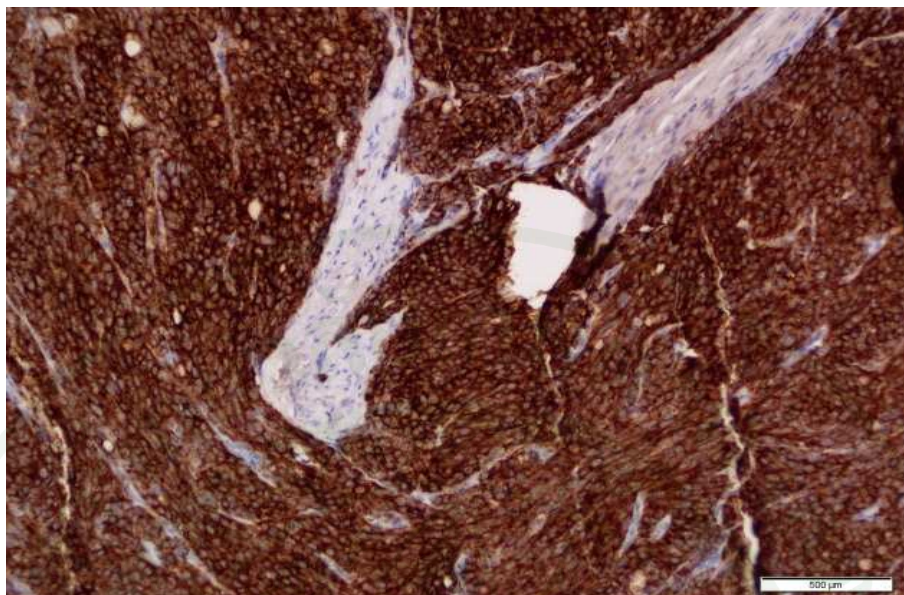
ภาพที่ 41 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μm



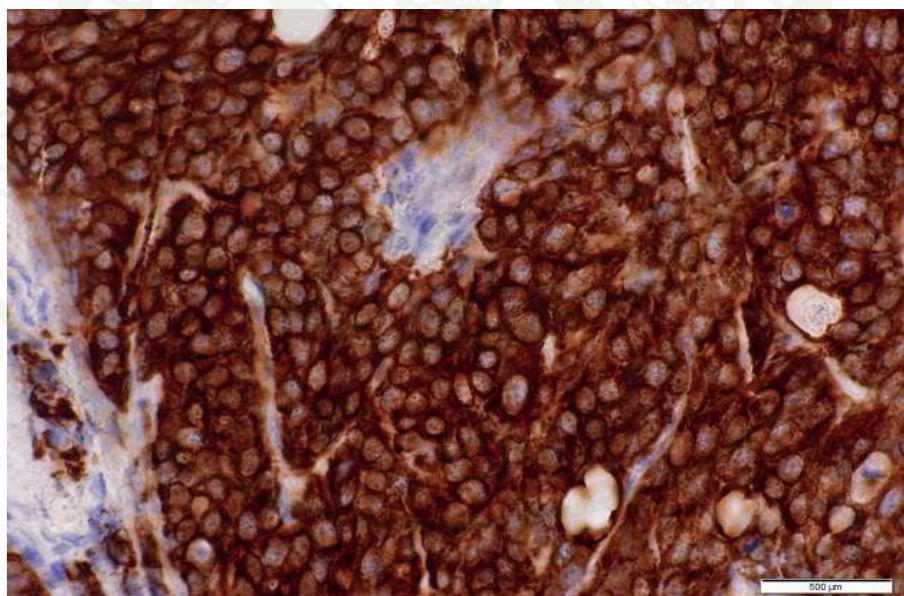
ภาพที่ 42 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



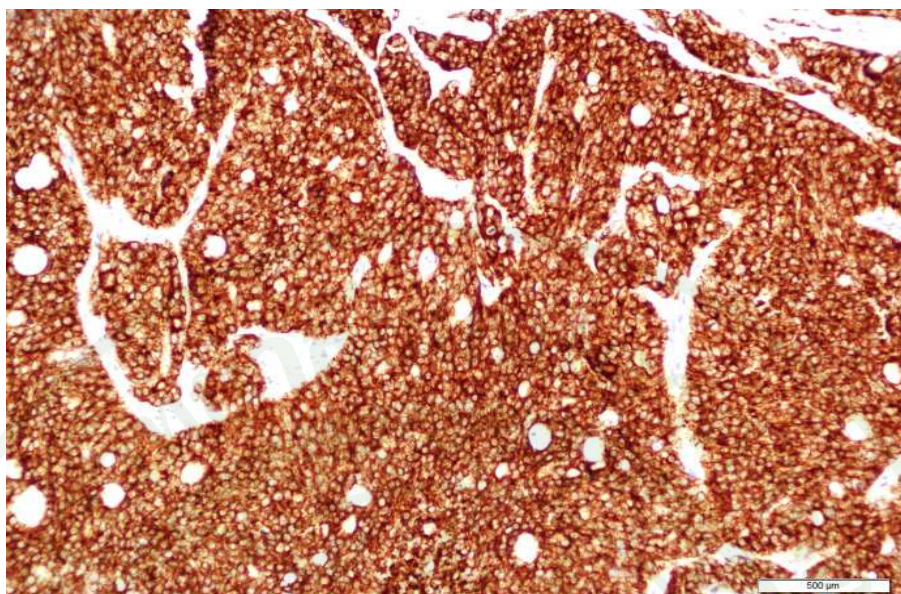
ภาพที่ 43 Sebaceous epithelioma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



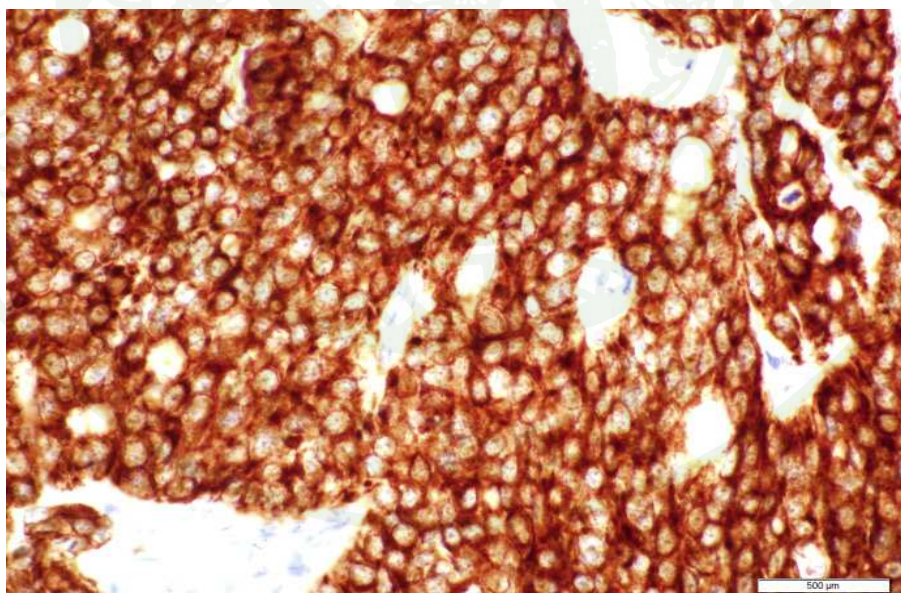
ภาพที่ 44 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



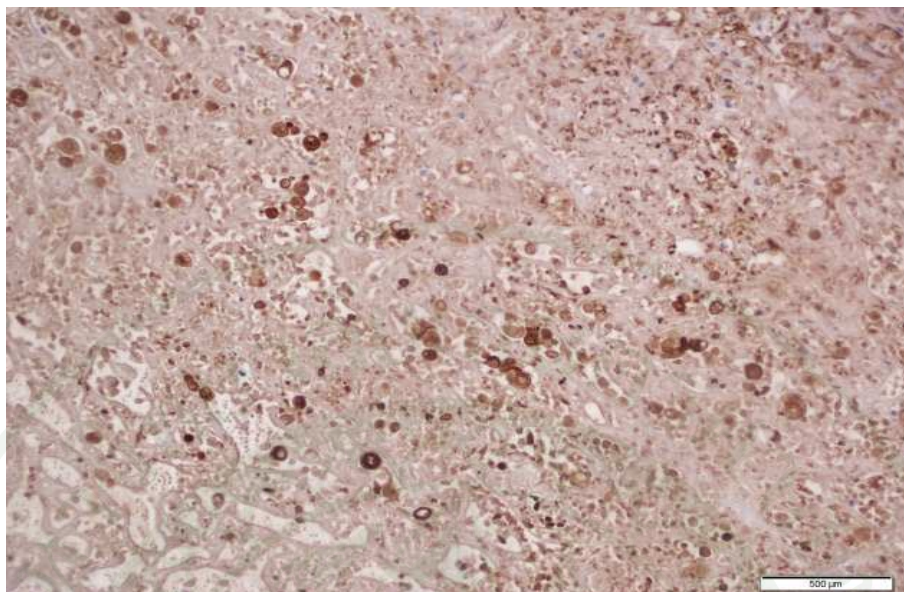
ภาพที่ 45 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



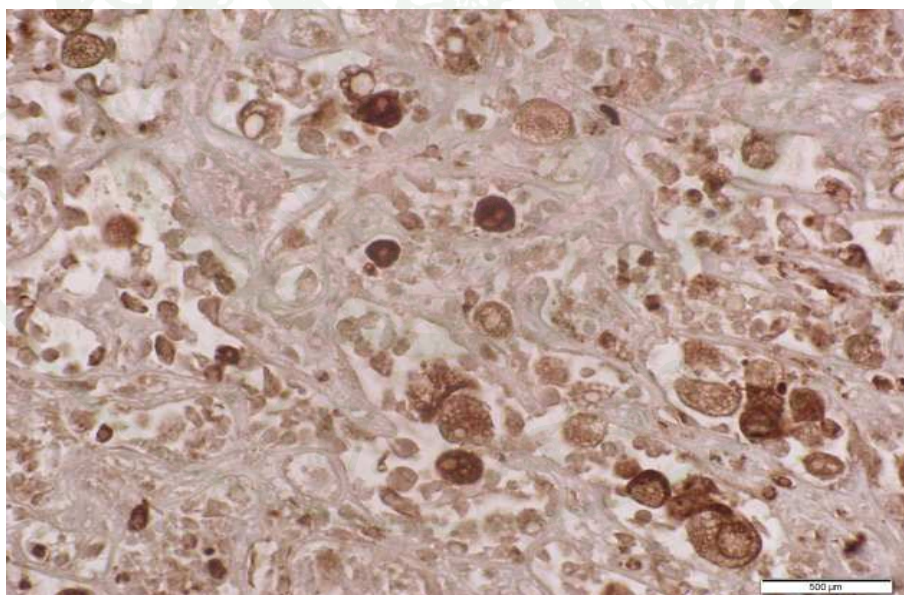
ภาพที่ 46 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



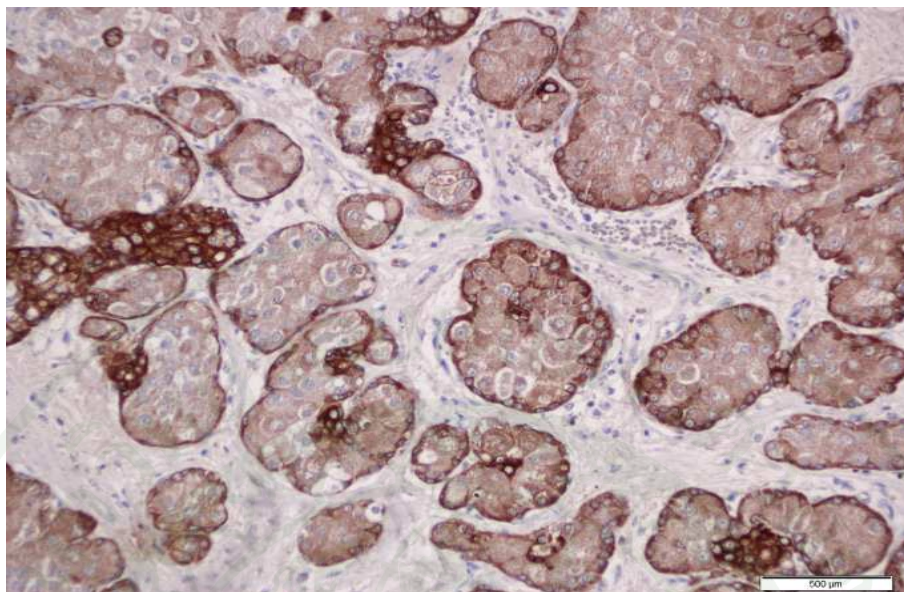
ภาพที่ 47 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



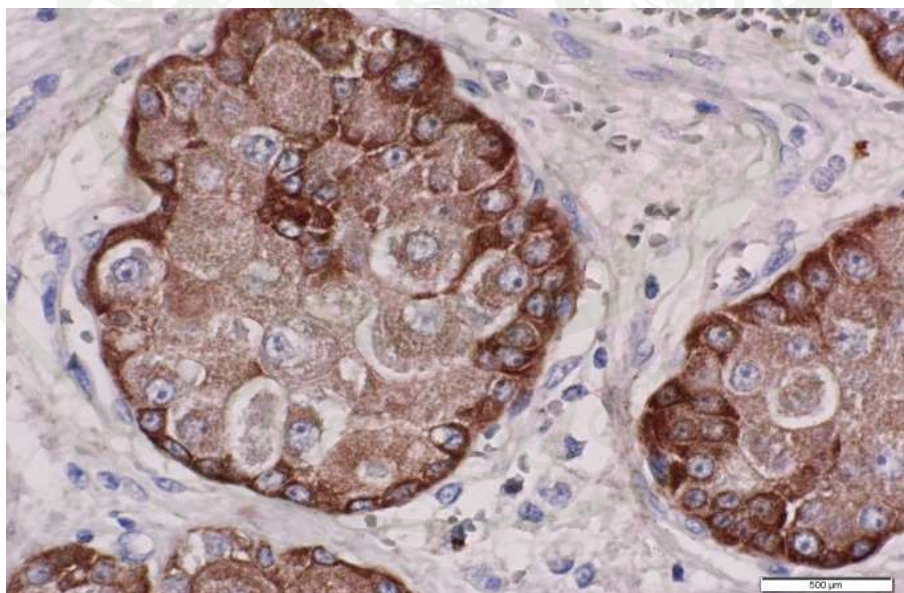
ภาพที่ 48 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m



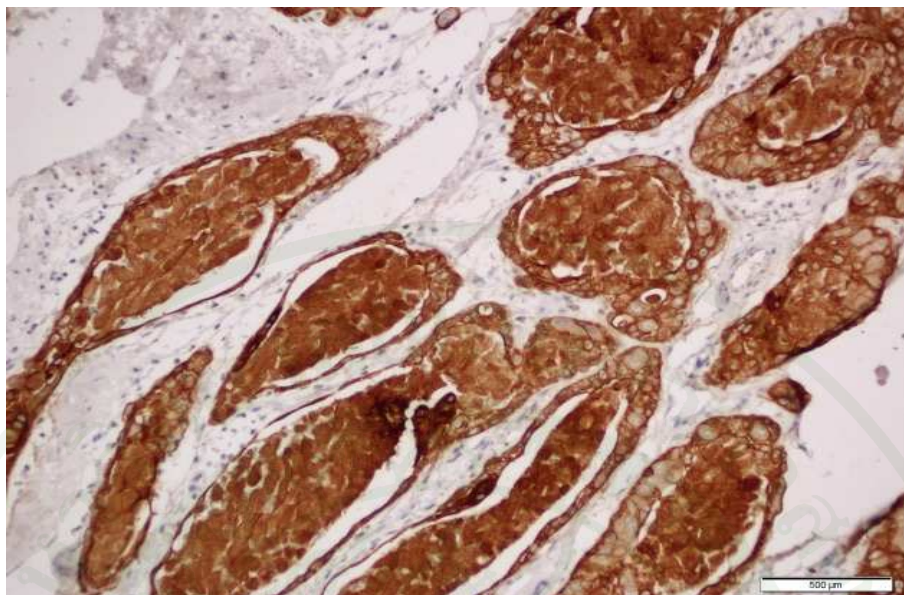
ภาพที่ 49 Sebaceous carcinoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m



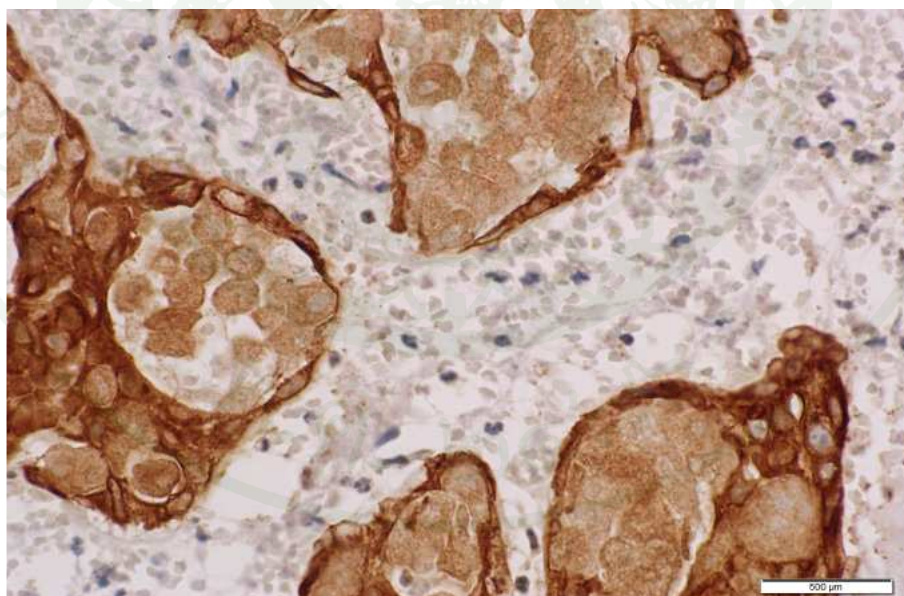
ภาพที่ 50 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



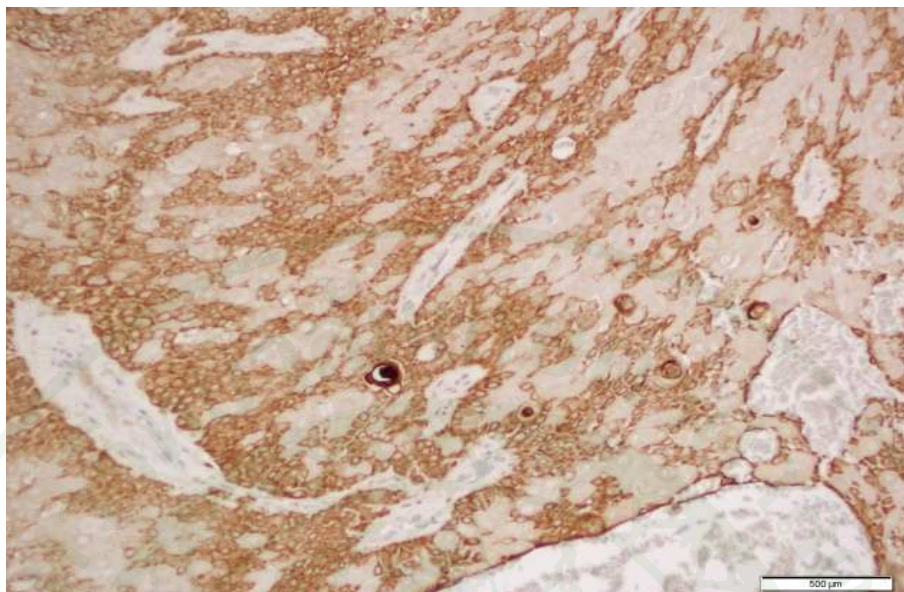
ภาพที่ 51 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



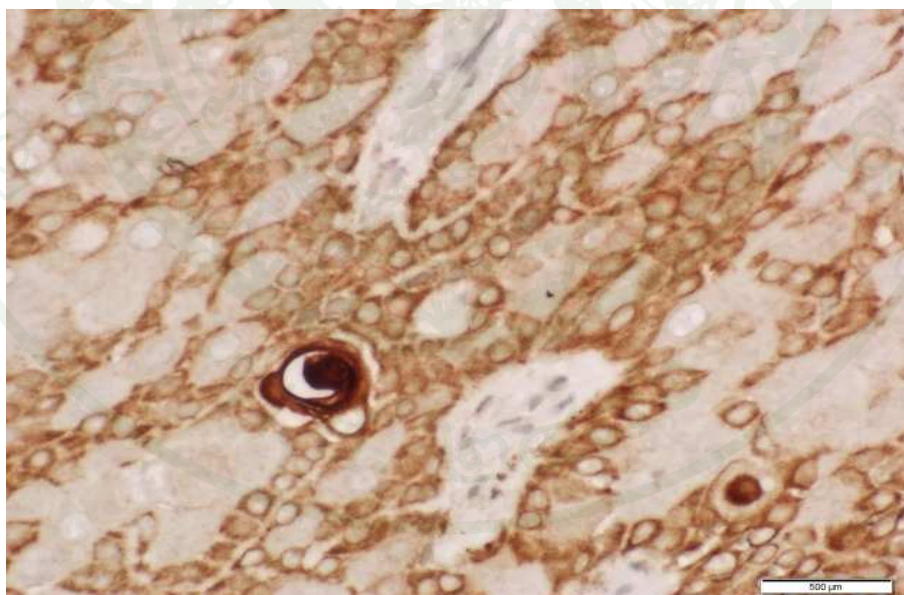
ภาพที่ 52 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



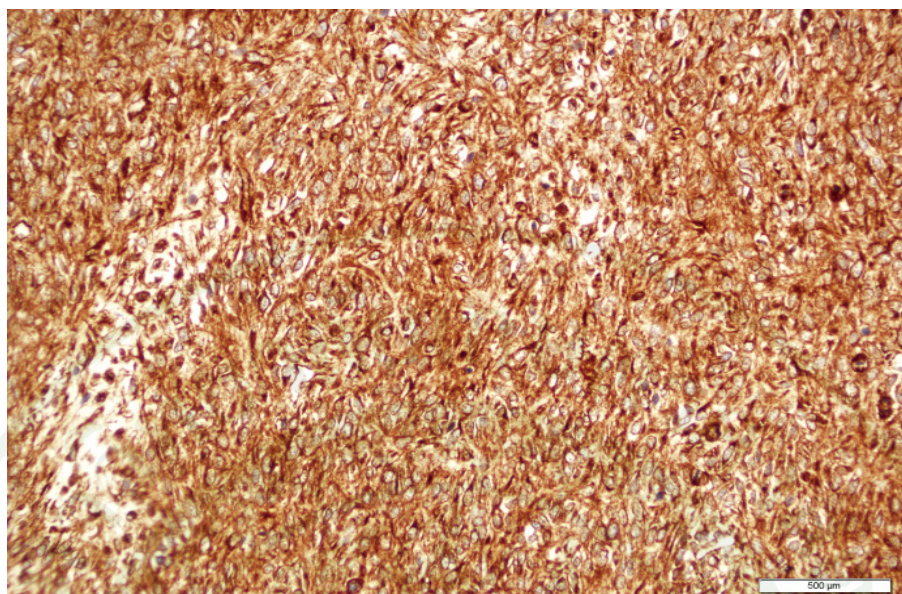
ภาพที่ 53 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody
เป็น 1:300 Bar = 500 μ m



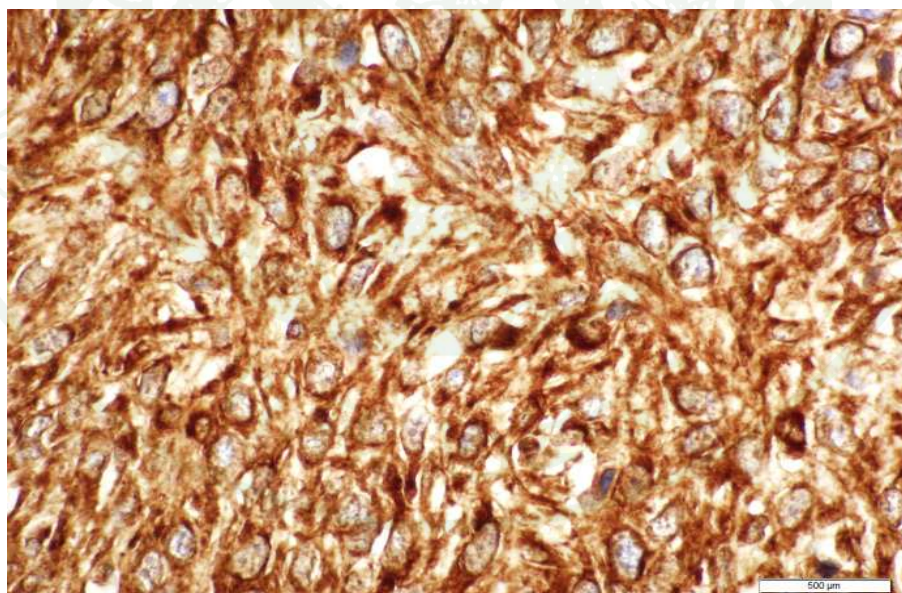
ภาพที่ 54 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400 Bar = 500 μm



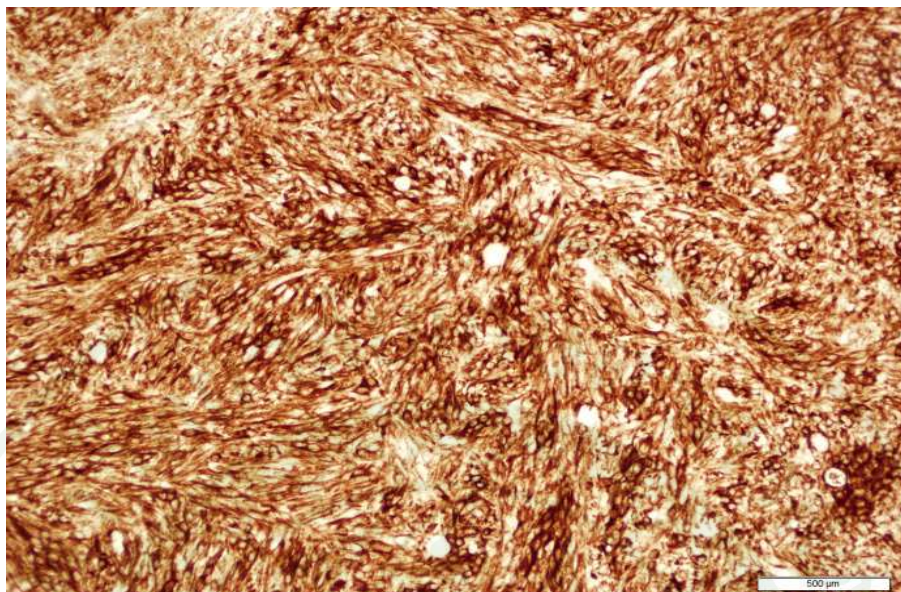
ภาพที่ 55 Perianal gland adenoma, anti-cytokeratin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400 Bar = 500 μm



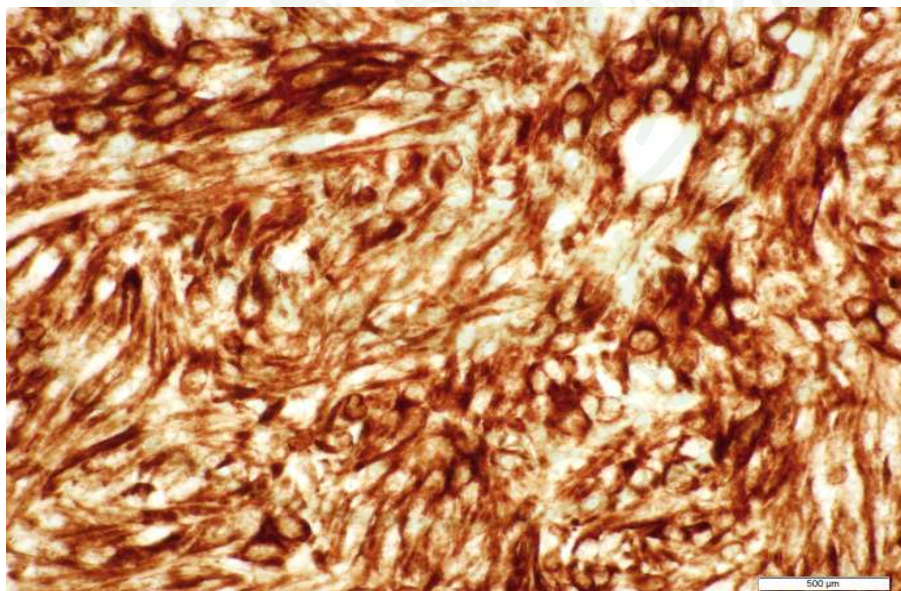
ภาพที่ 56 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



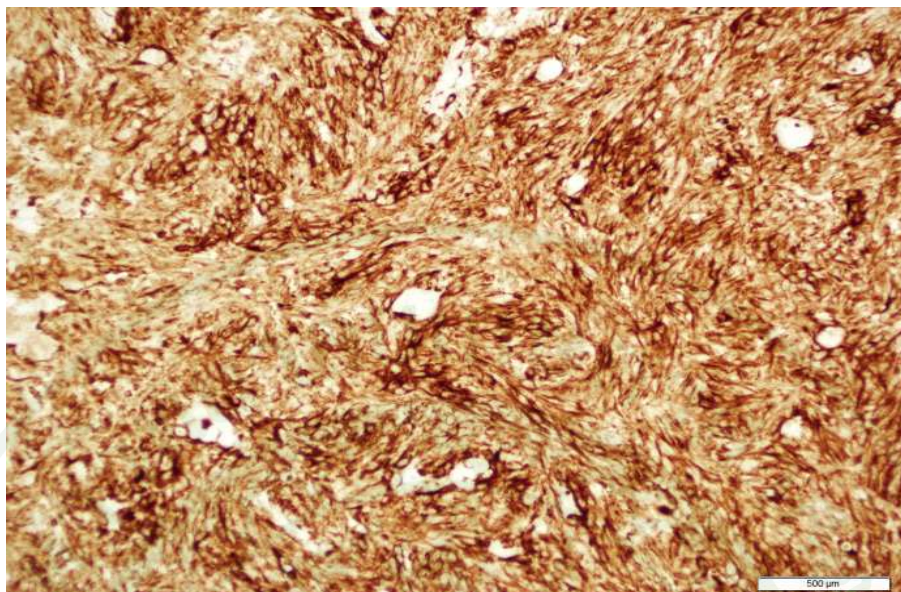
ภาพที่ 57 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



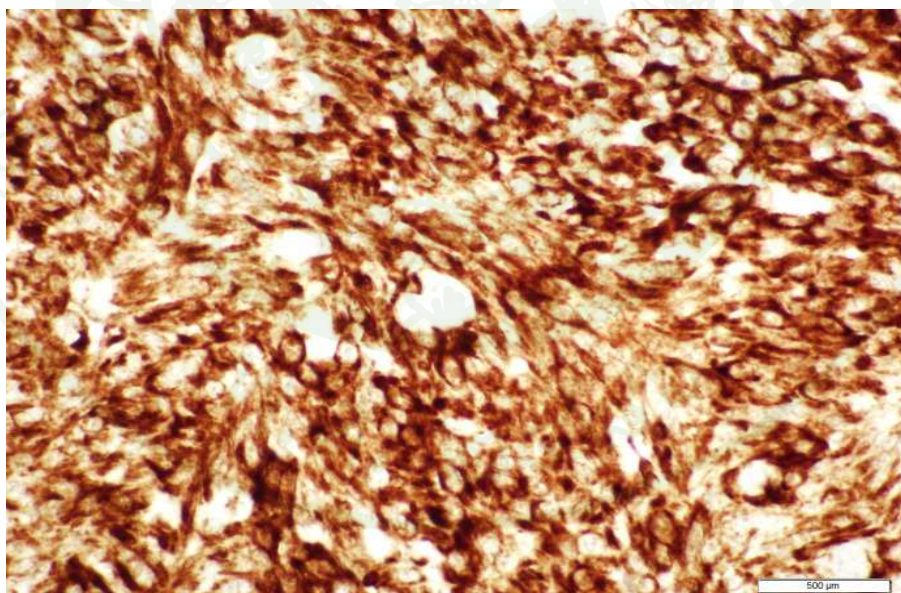
ภาพที่ 58 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μ m



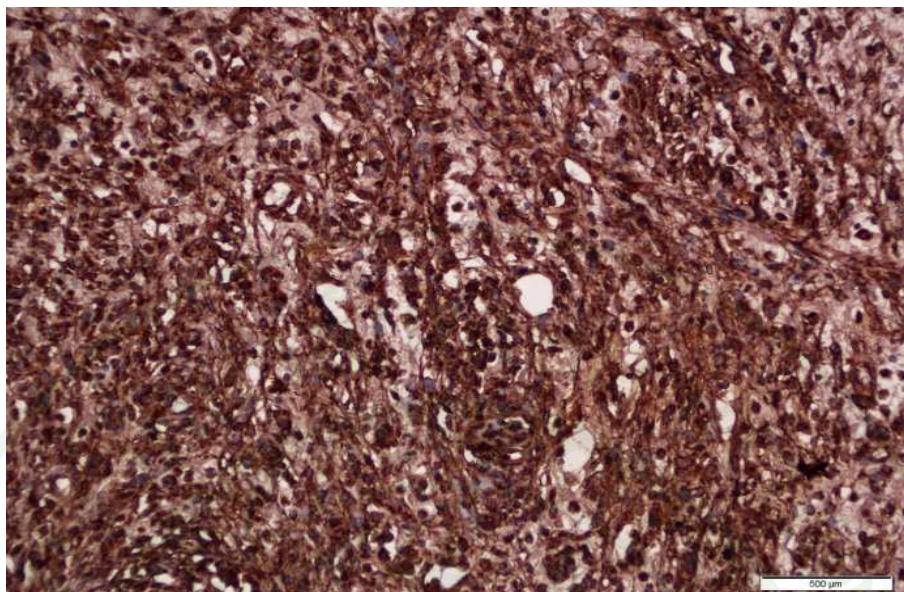
ภาพที่ 59 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μ m



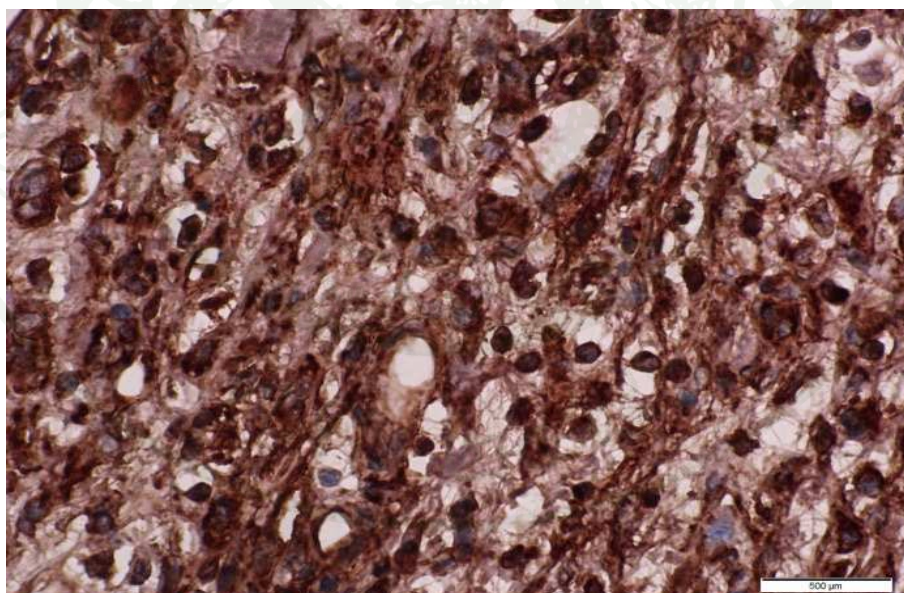
ภาพที่ 60 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody
เป็น 1:300 Bar = 500 μ m



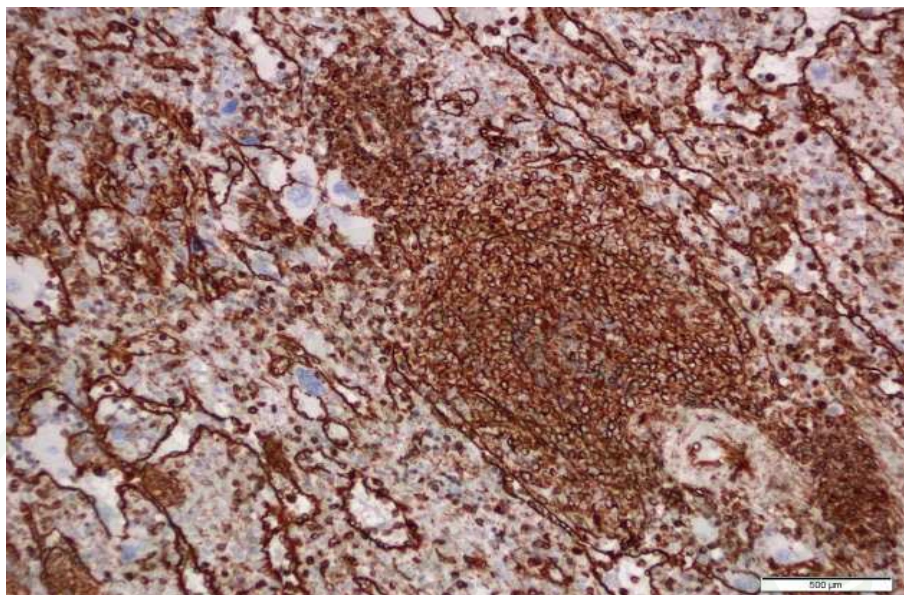
ภาพที่ 61 Fibrosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



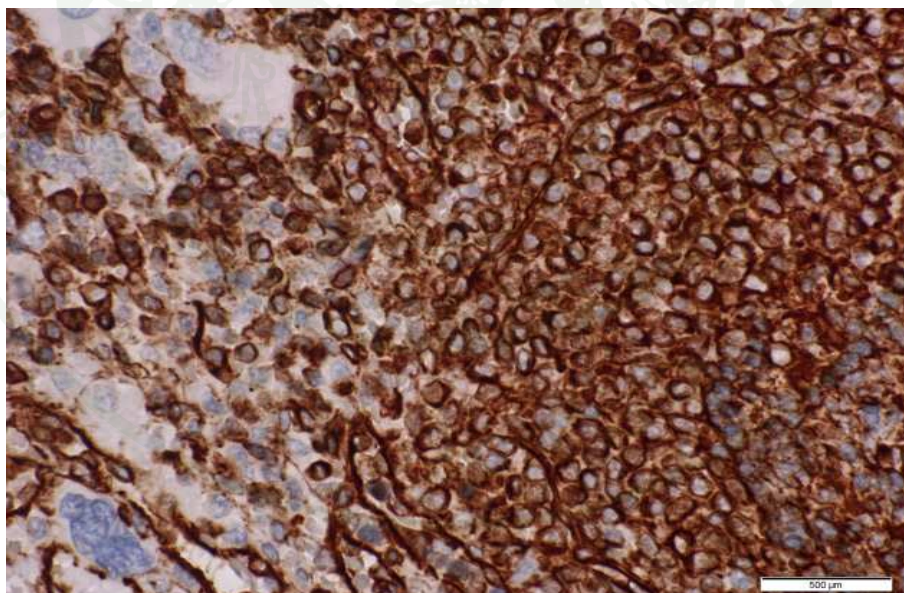
ภาพที่ 62 Hemangiosarcoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



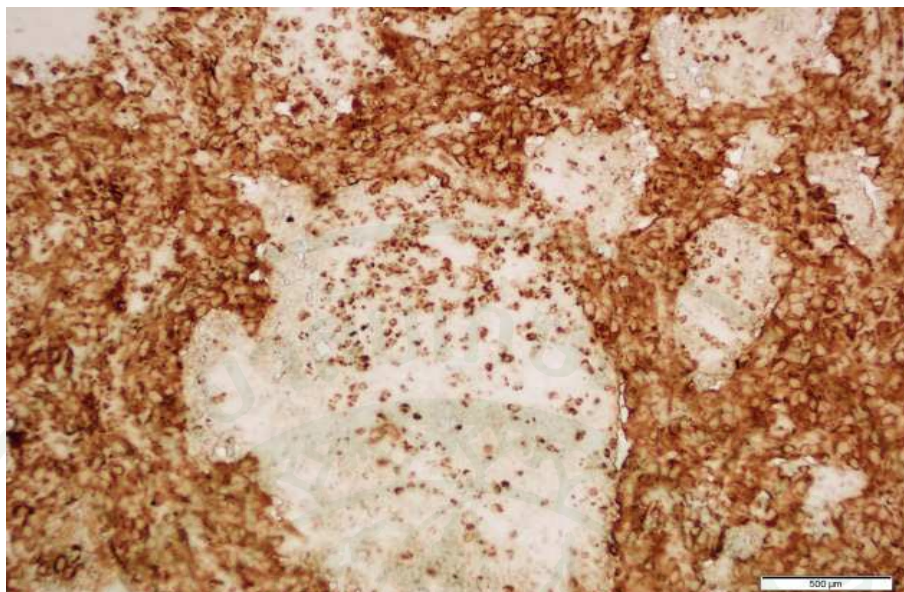
ภาพที่ 63 Hemangiosarcoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



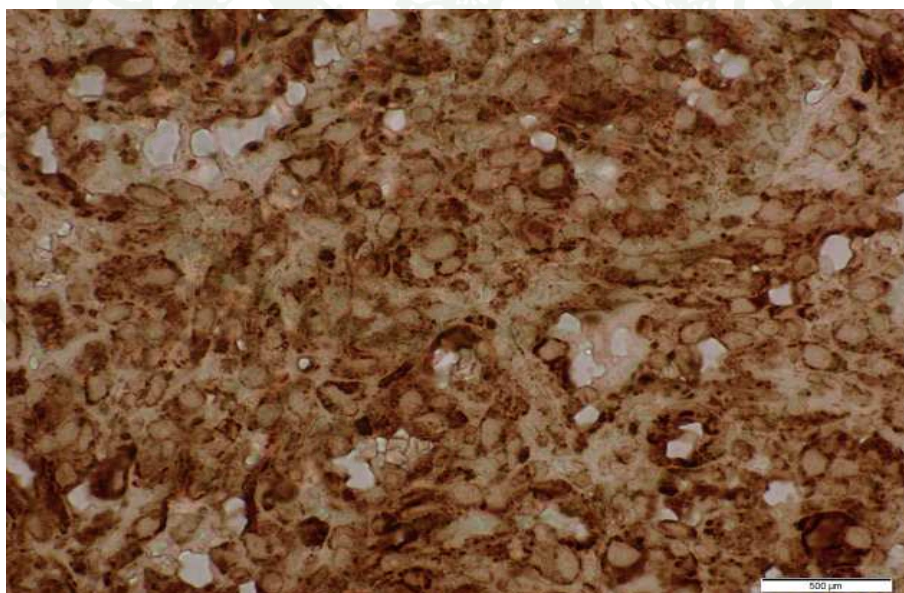
ภาพที่ 64 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



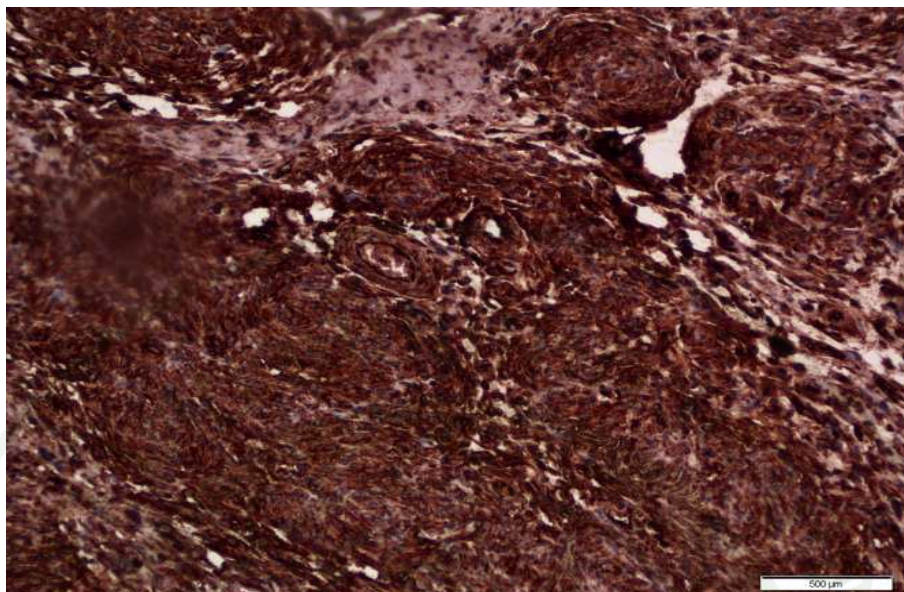
ภาพที่ 65 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



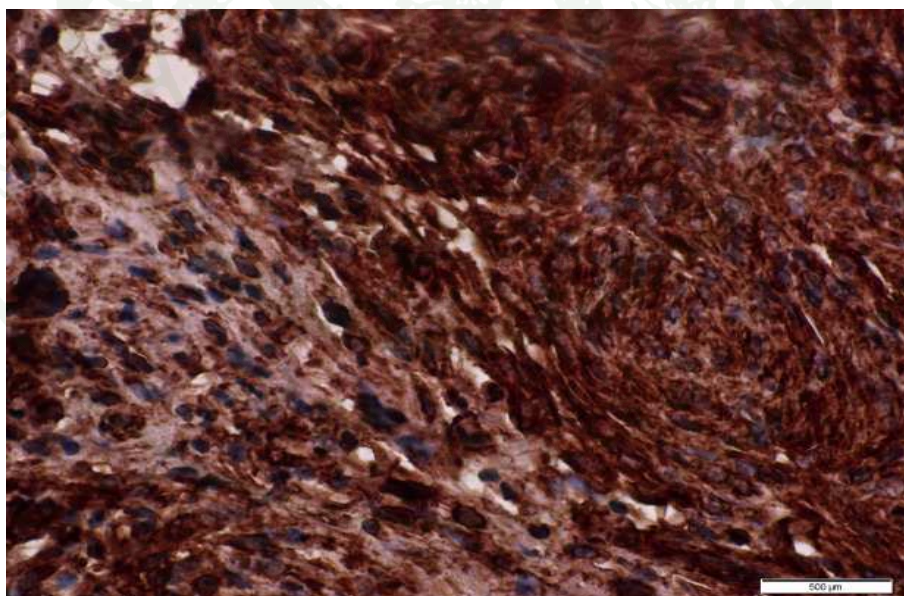
ภาพที่ 66 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m



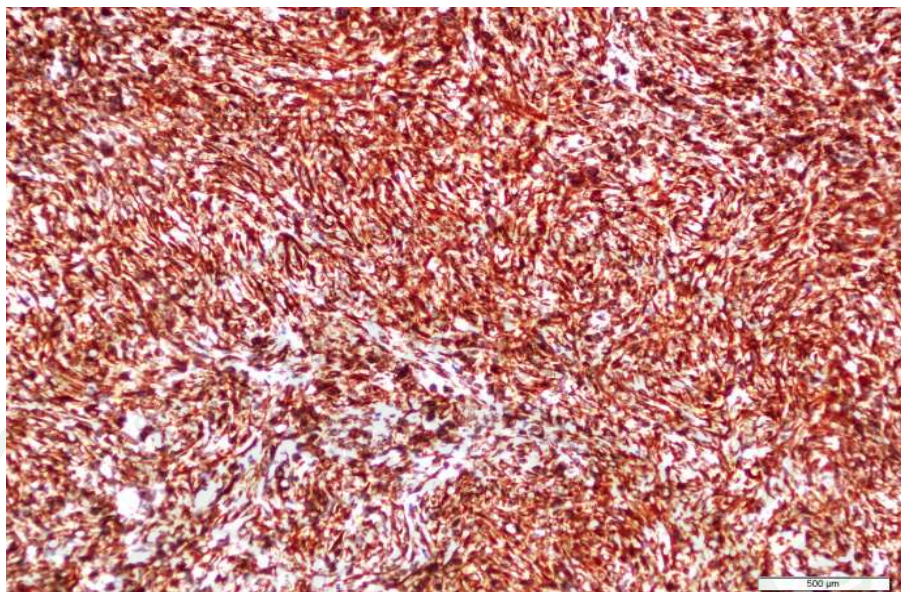
ภาพที่ 67 Hemangiosarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m



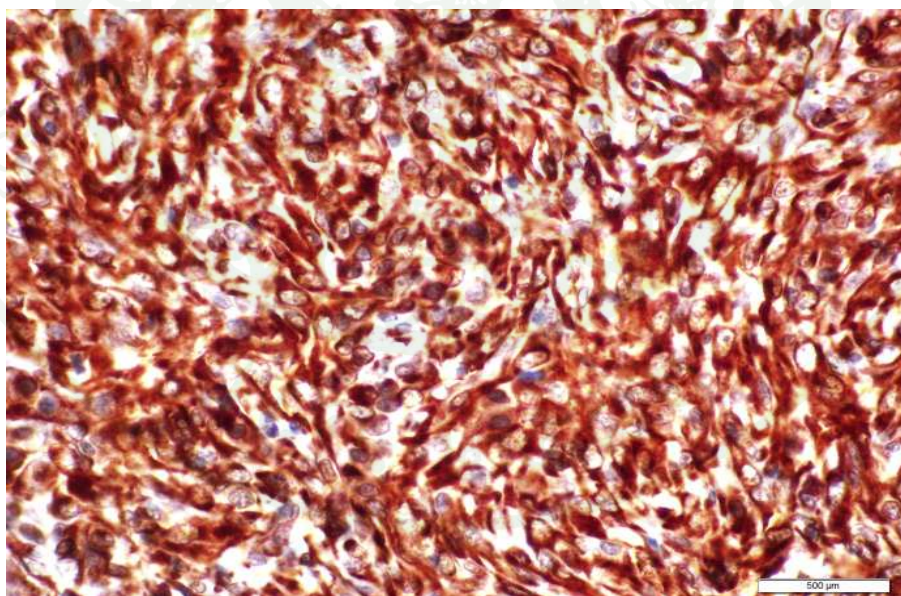
ภาพที่ 68 Hemangiopericytoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



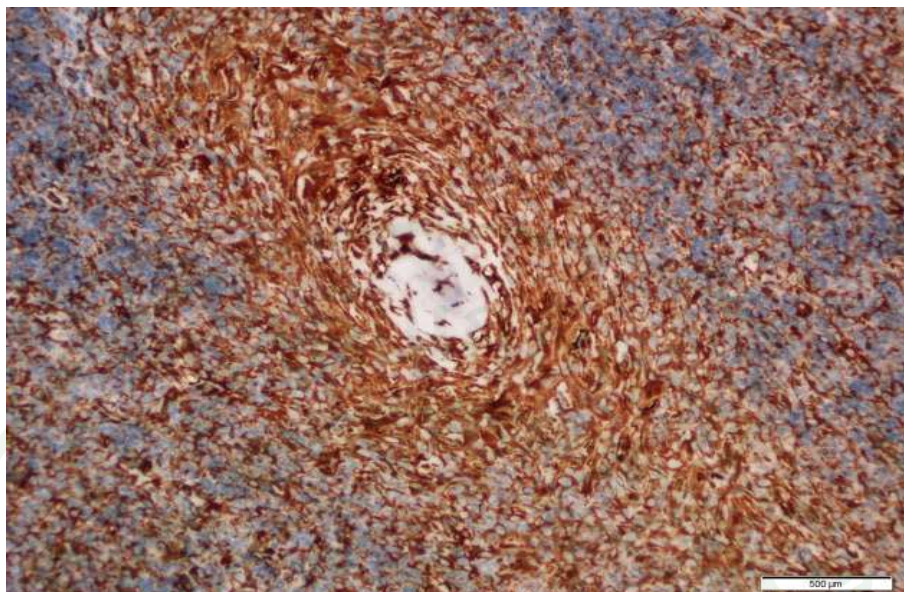
ภาพที่ 69 Hemangiopericytoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



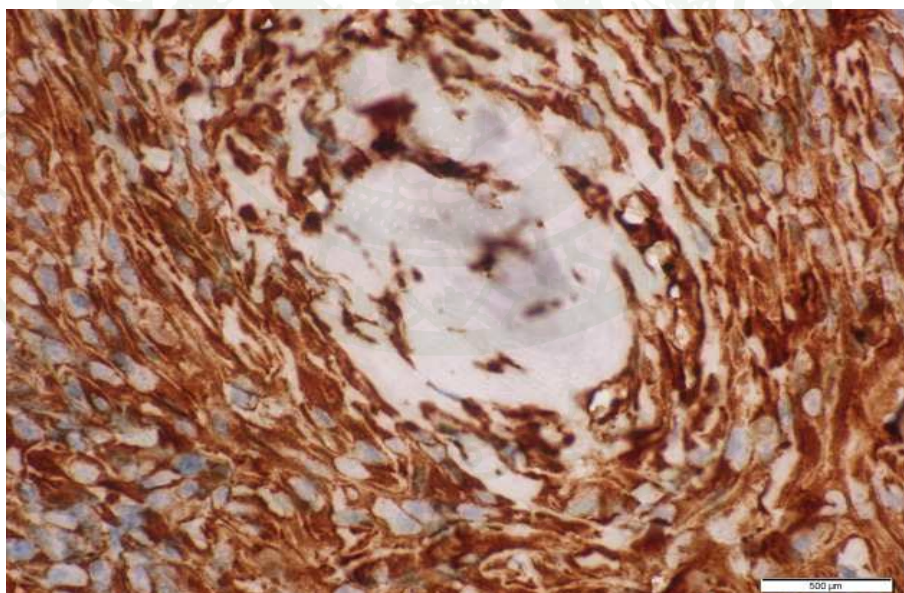
ภาพที่ 70 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μm



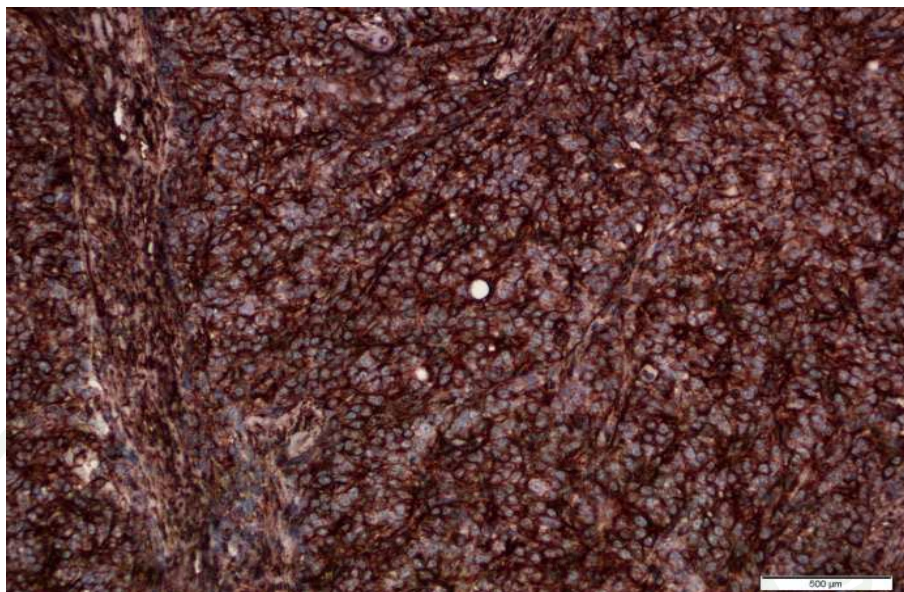
ภาพที่ 71 Hemangiopericytoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200
Bar = 500 μm



ภาพที่ 72 Hemangiopericytoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m

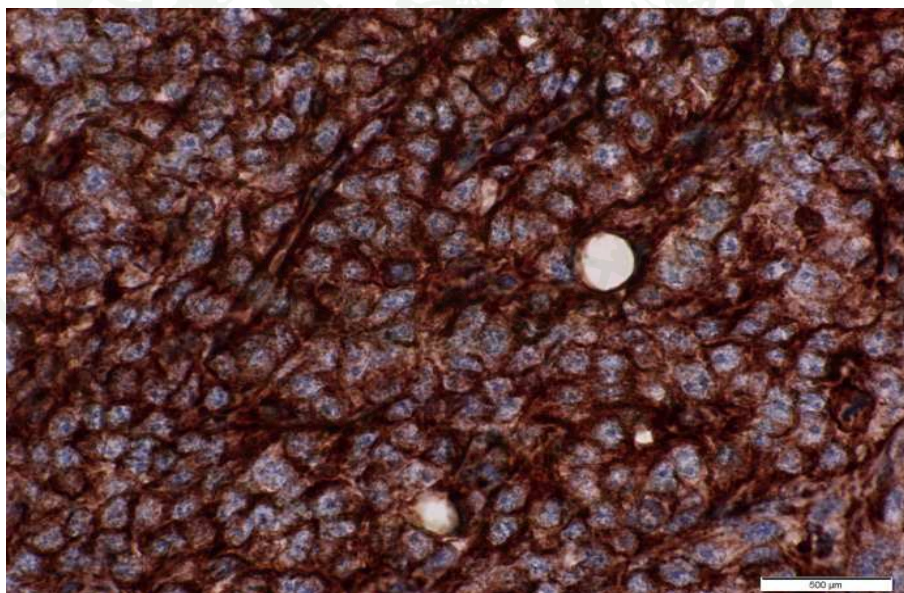


ภาพที่ 73 Hemangiopericytoma, anti-vimentinความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



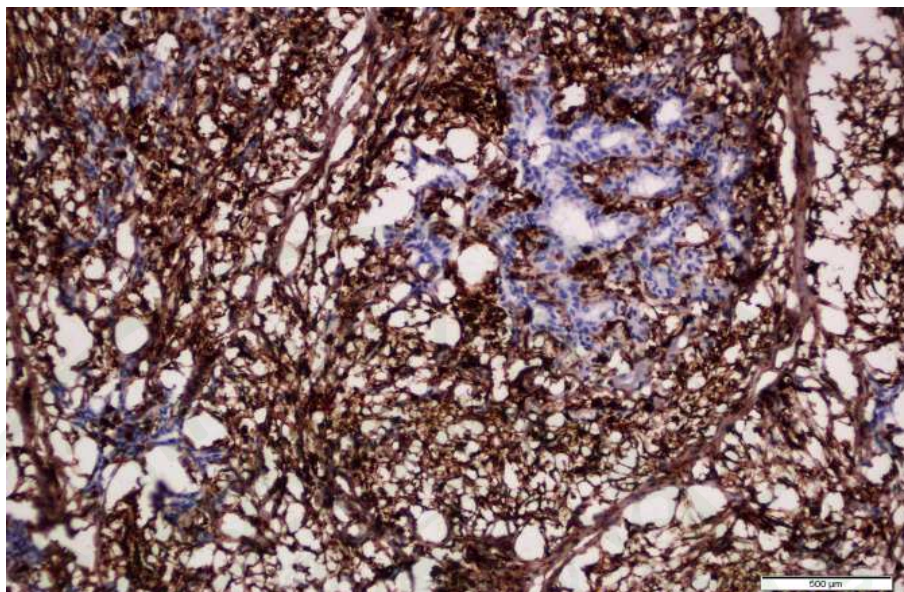
ภาพที่ 74 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50

Bar = 500 μ m



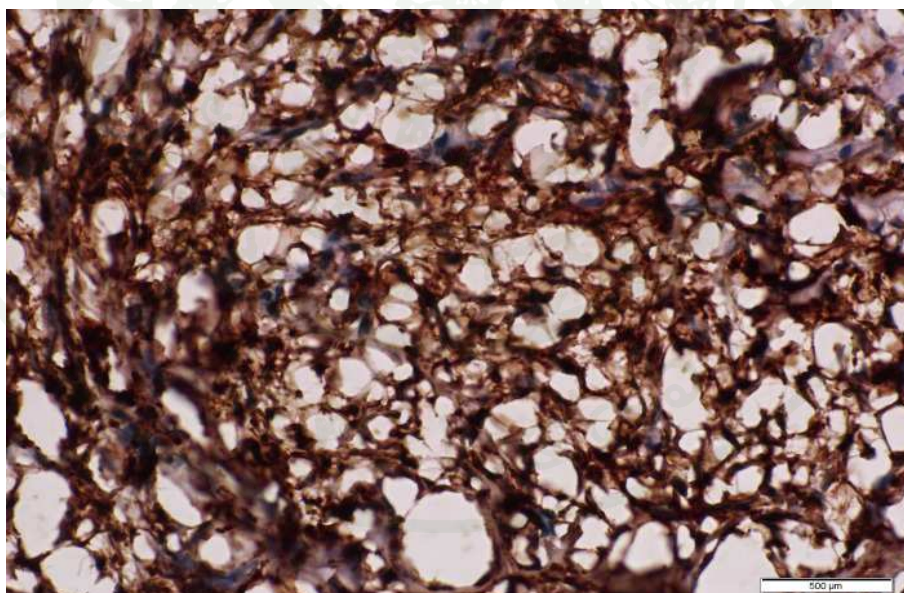
ภาพที่ 75 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50

Bar = 500 μ m



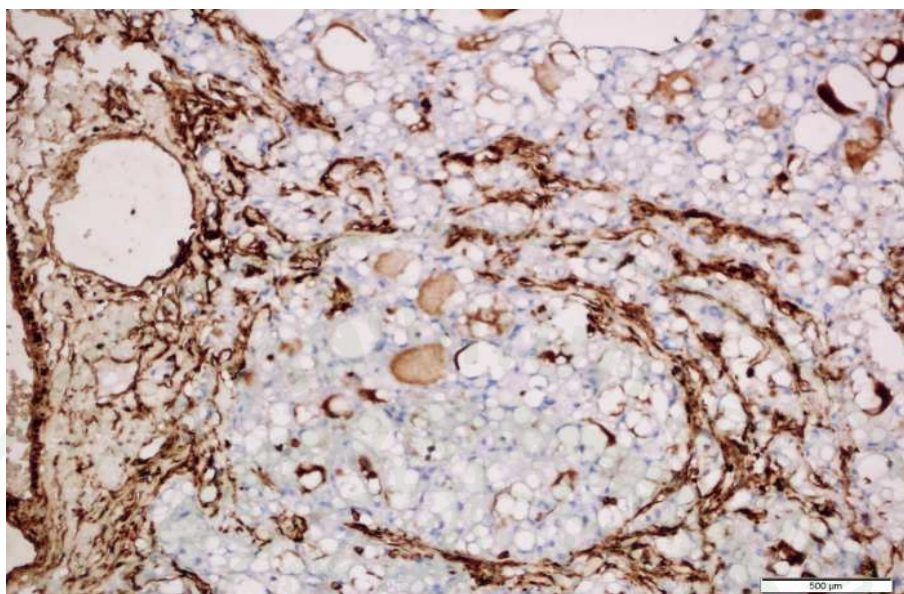
ภาพที่ 76 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200

Bar = 500 μ m

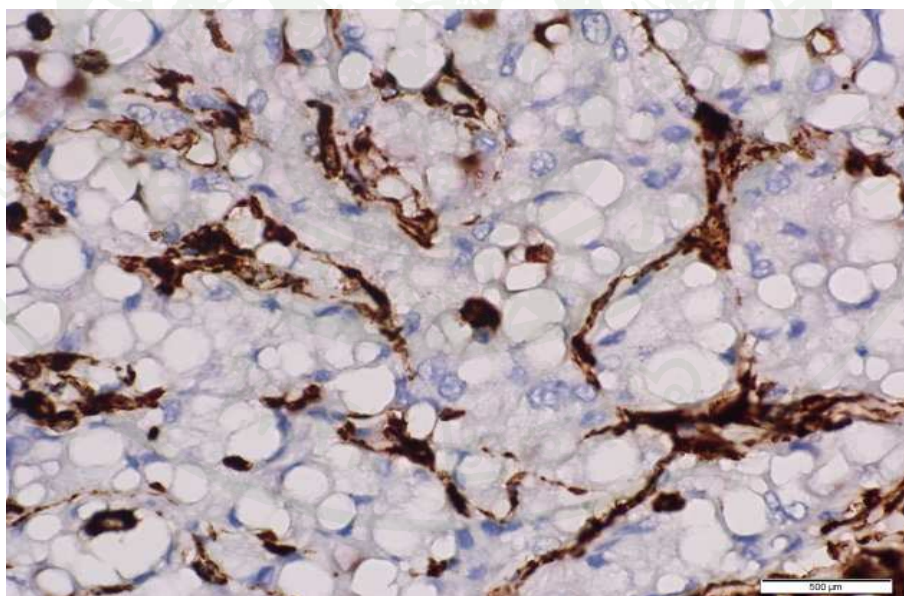


ภาพที่ 77 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200

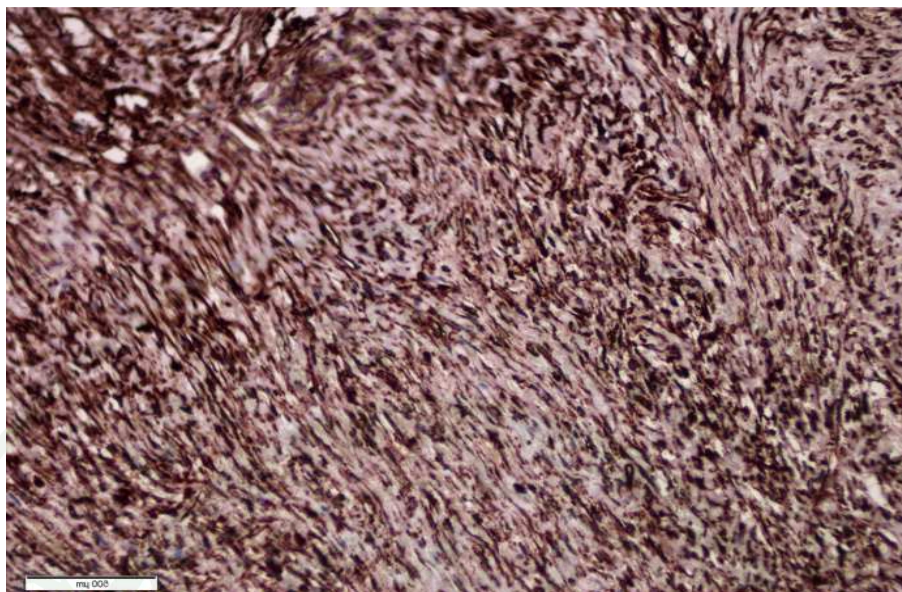
Bar = 500 μ m



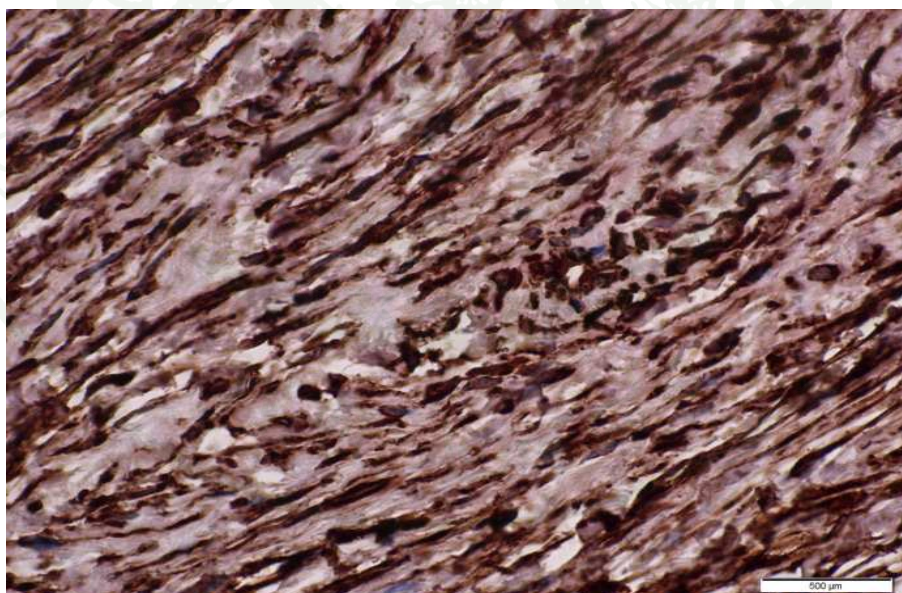
ภาพที่ 78 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



ภาพที่ 79 Liposarcoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



ภาพที่ 80 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



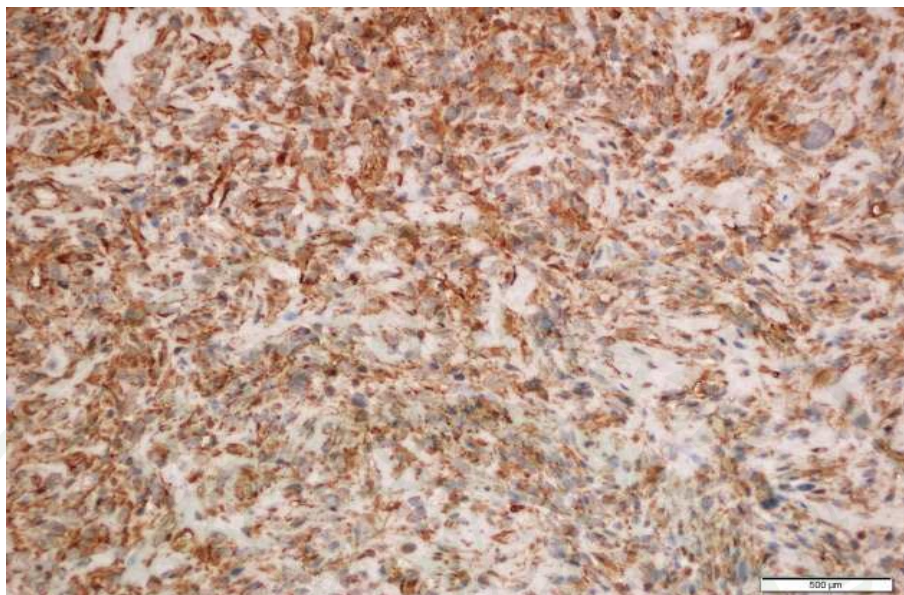
ภาพที่ 81 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50
Bar = 500 μ m



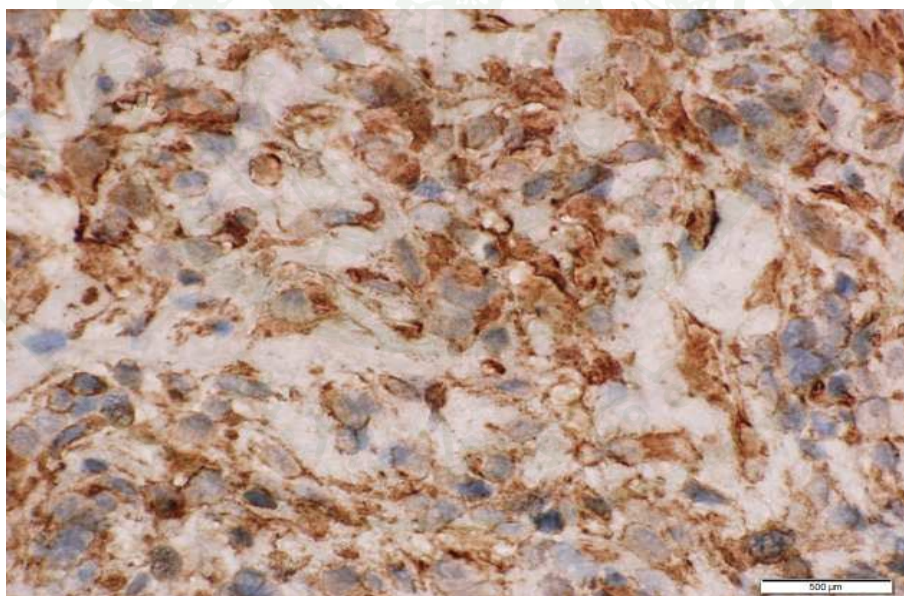
ภาพที่ 82 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



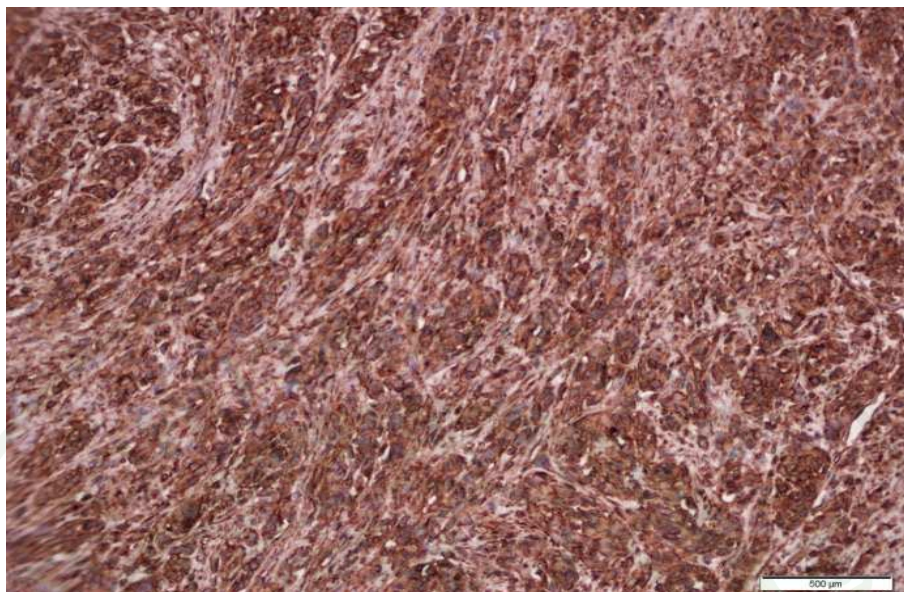
ภาพที่ 83 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μ m



ภาพที่ 84 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m

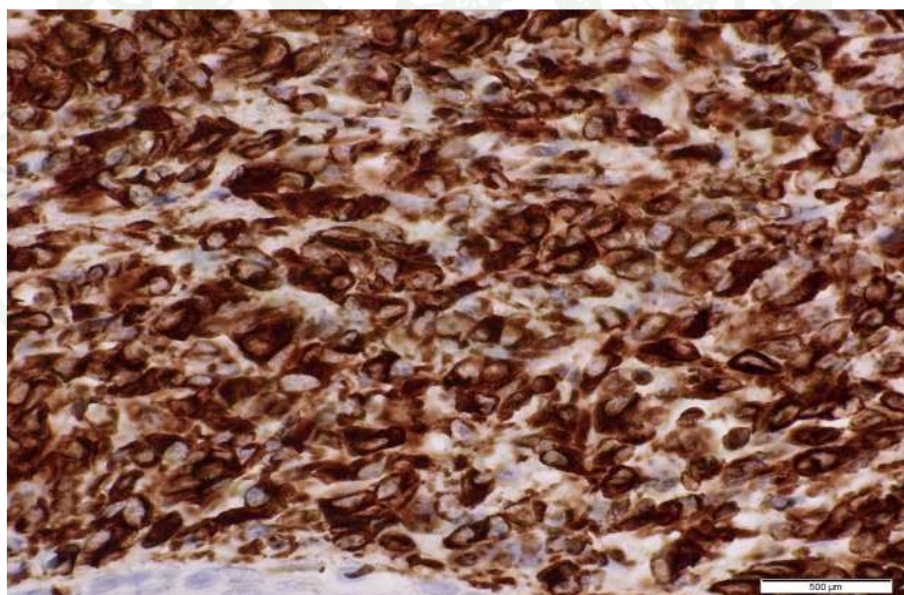


ภาพที่ 85 Schwannoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:400
Bar = 500 μ m



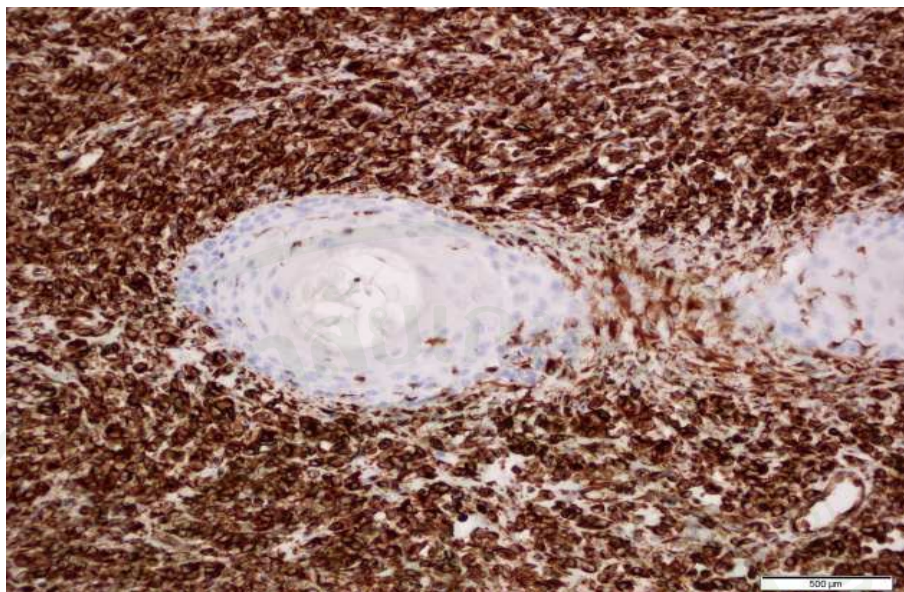
ภาพที่ 86 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50

Bar = 500 μ m



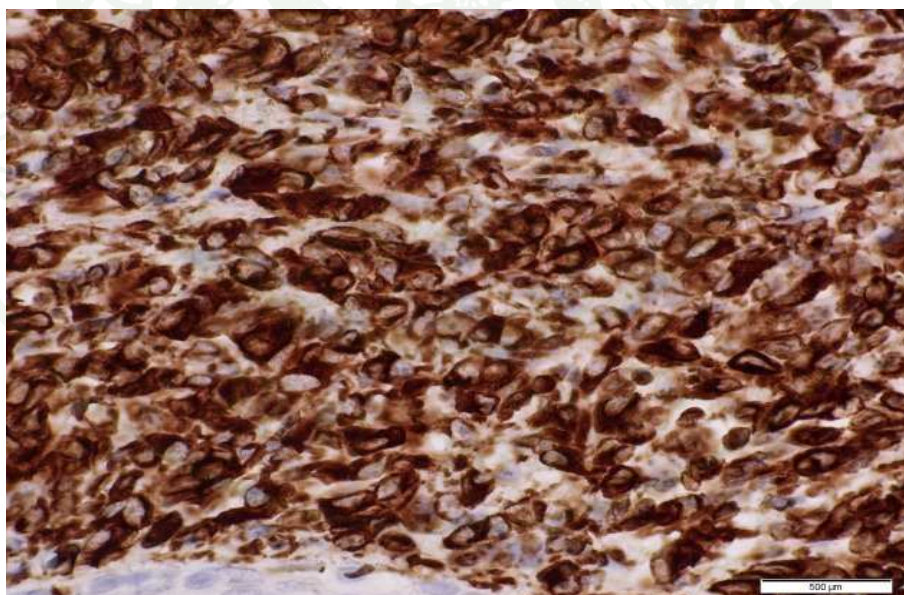
ภาพที่ 87 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:50

Bar = 500 μ m



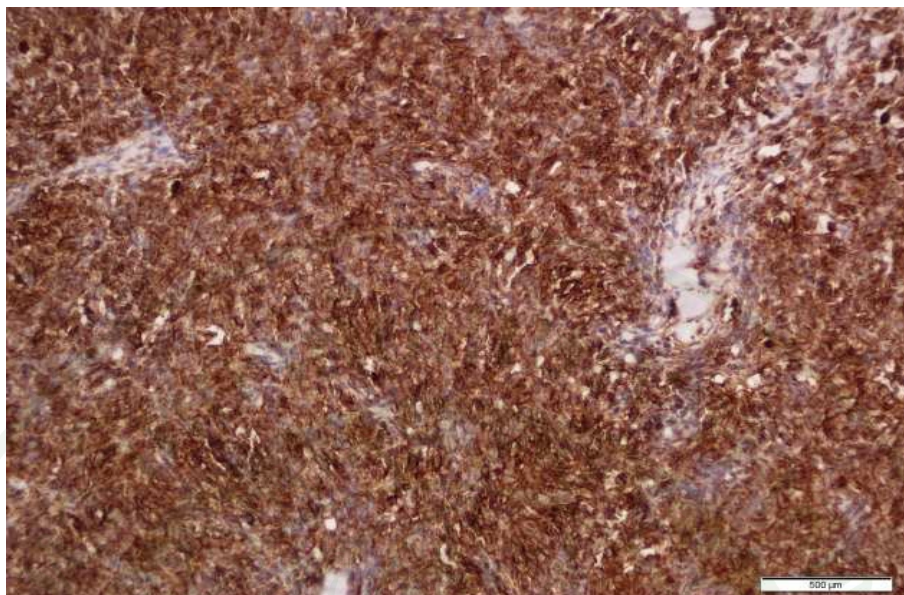
ภาพที่ 88 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200

Bar = 500 μ m

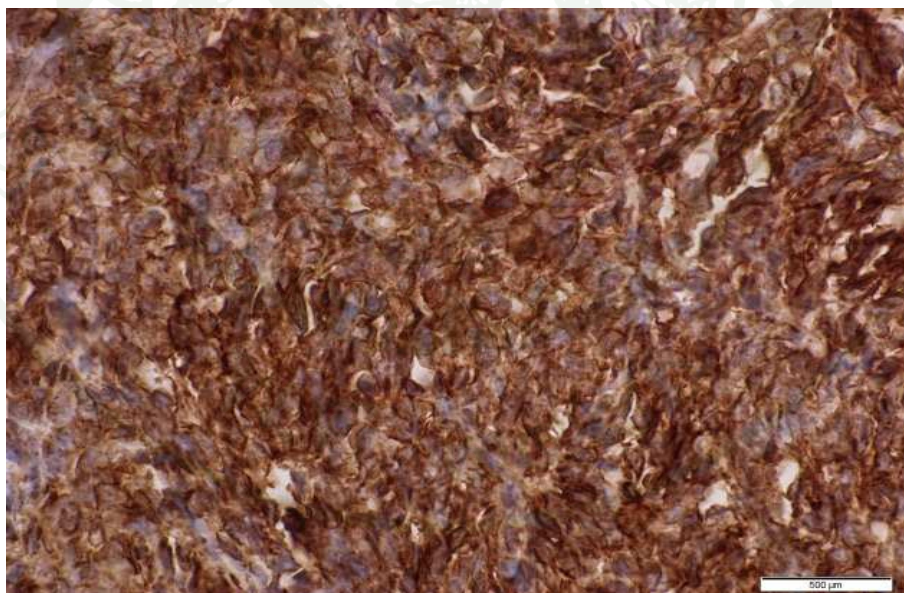


ภาพที่ 89 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:200

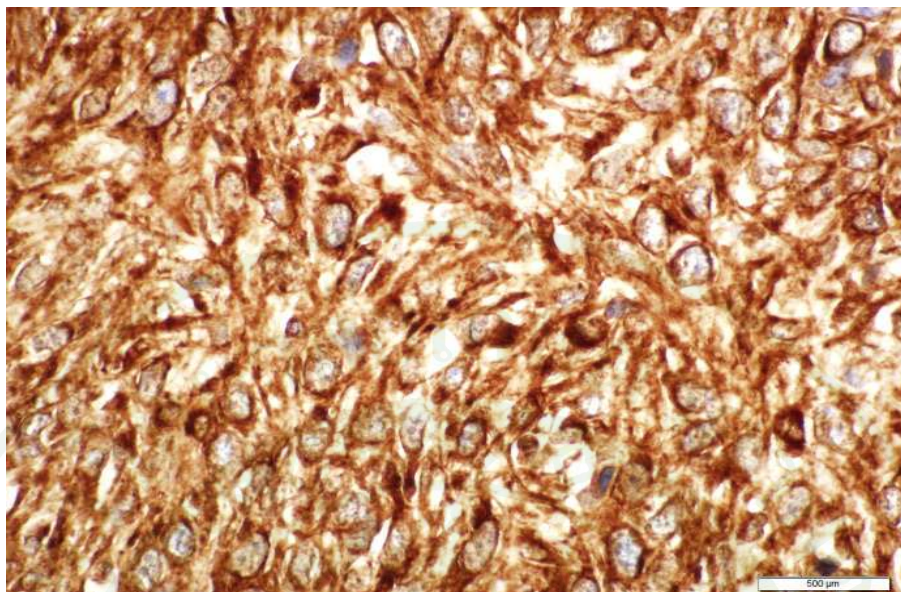
Bar = 500 μ m



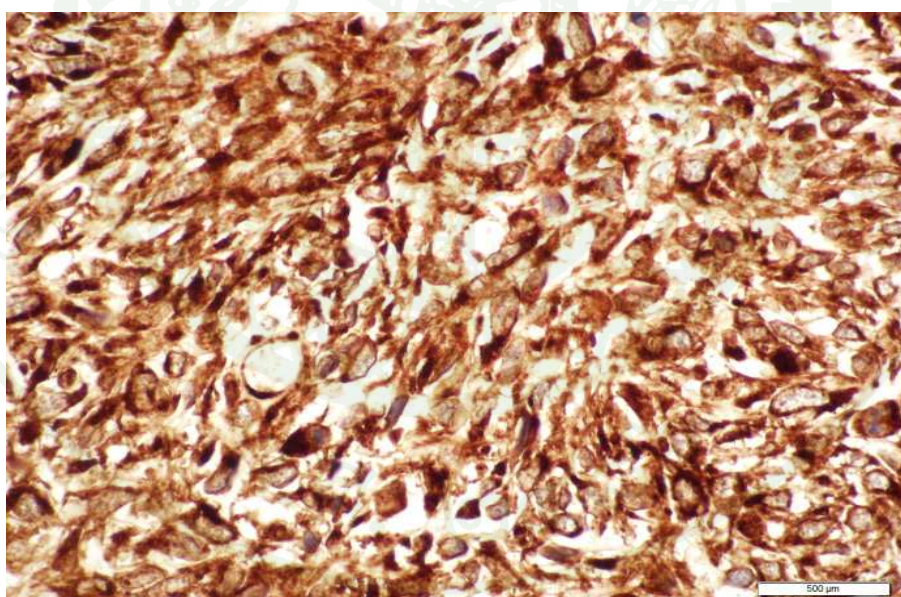
ภาพที่ 90 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



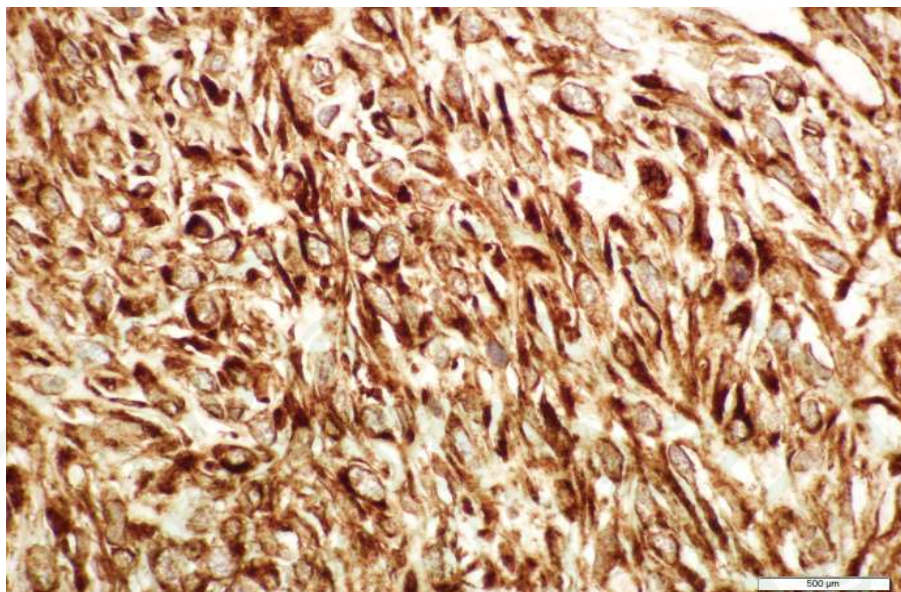
ภาพที่ 91 Melanoma, anti-vimentin ความเข้มข้นของ primary antibody เป็น 1:300
Bar = 500 μm



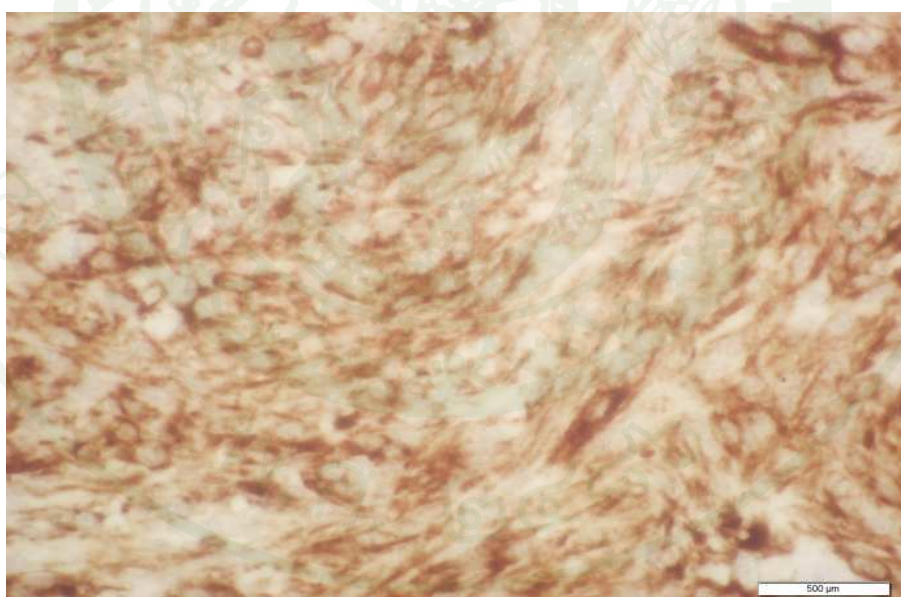
ภาพที่ 92 Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Polymer Detection System Bar = 500 μ m



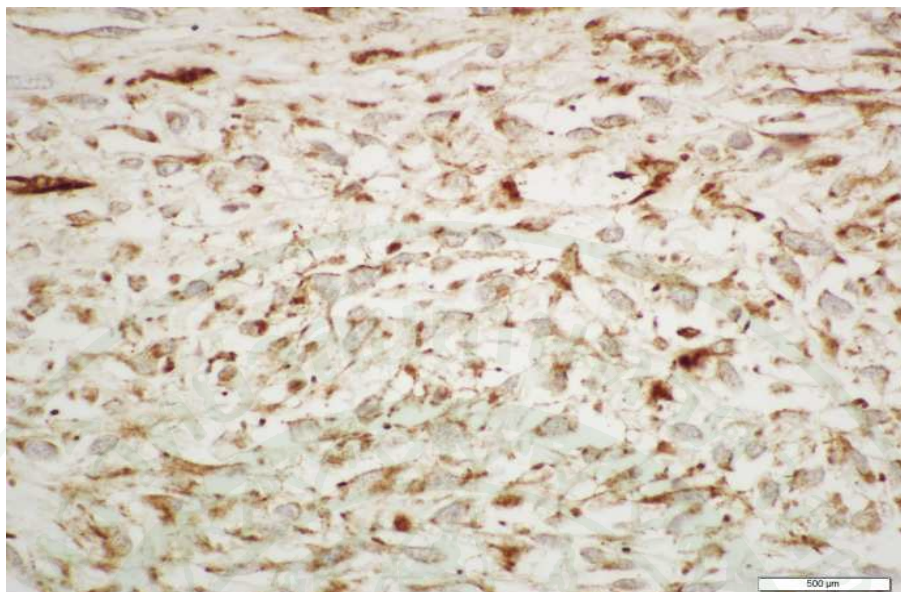
ภาพที่ 93 Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:300) Polymer Detection System Bar = 500 μ m



ภาพที่ 94 Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Normal Detection System Bar = 500 μ m



ภาพที่ 95 Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:200) Normal Detection System Bar = 500 μ m



ภาพที่ 96 Fibrosarcoma, anti-vimentin (1:50) Not AR Polymer Detection System Bar = 500 μ m



ภาพที่ 97 Fibrosarcoma, No primary antibody Polymer Detection System Bar = 500 μ m

วิจารณ์

ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบสภาวะที่ศึกษาปรับปรุงเทคนิค อิมมูโนฮิสโตเคมีในขั้นตอนต่างๆ ในเนื้องอกแต่ละชนิดพบมีการย้อมติดเซลล์ที่จำเพาะและมีการติดสีในระดับที่ยอมรับได้สำหรับทั้ง การใช้แอนติบอดีชนิด cytokeratin ต่อเนื้องอกทุกชนิดในกลุ่ม epithelial tumors ที่นำมาศึกษา และ vimentin ต่อเนื้องอกทุกชนิดในกลุ่ม mesenchymal tumors แต่ความเข้มในการติดสียังมีความผันแปรในเนื้องอกต่างชนิดที่เจริญจากเซลล์ต้นกำเนิดต่างชนิดกัน เช่นเซลล์ pericyte (Perez *et al.*, 1996) lipocyte (Wang *et al.*, 2005) fibroblast (Vascellari *et al.*, 2003) schwann cells (Viott *et al.*, 2008) melanocyte (Maliver *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2001) และ endothelial cell (Sabattini and Bettini, 2009) การใช้ระดับความเข้มข้นที่เคยมีรายงานในเนื้องอกแต่ละชนิดและระบบที่ใช้ยังมีความหลากหลายไม่มีรูปแบบชัดเจน นอกจากนั้นระดับการเจริญพัฒนาของเซลล์แต่ละชนิดก็มีผลต่อการติดสี ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 3.1.1-3.12.6 ซึ่งต้องมีการประเมินการใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจำเพาะต่อเนื้องอกแต่ละชนิดเพิ่มเติมต่อไปเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดความเข้มในการติดสีในระดับที่ยอมรับได้สำหรับการวินิจฉัยในงานประจำวัน แม้ว่าจะได้ระดับความเข้มข้นที่ยอมรับได้สำหรับ vimentin ในเนื้องอกกลุ่ม mesenchymal tumors ทุกชนิดอยู่ที่ 1:200 แต่เนื้องอกบางชนิดเช่น fibrosarcoma สามารถเจือจางได้ถึง 1:400 ส่วนระดับความเข้มข้นของ cytokeratin ที่ใช้ในเนื้องอกกลุ่ม epithelial tumors นั้นในเนื้องอกแต่ละชนิดก็ได้ผลการย้อมแตกต่างกัน ดังนั้นในการประยุกต์ใช้ในงานวินิจฉัยประจำวัน ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเนื้องอกแต่ละชนิดควรใช้ในระดับที่เชื่อมั่นจะให้ผลความเข้มของการติดสีที่ยอมรับได้ โดยความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิด cytokeratin สำหรับเนื้องอกในกลุ่ม epithelial tumors นี้เนื้องอกทุกชนิดที่นำมาศึกษามีระดับความเข้มข้นที่ยอมรับได้อยู่ที่ 1: 300 แม้ว่าเนื้องอกบางชนิดเช่น squamous cell carcinoma สามารถปรับใช้ได้ถึงระดับ 1:500 แต่ได้ผลการติดสีในระดับความเข้มที่ไม่สามารถยอมรับได้ในเนื้องอกชนิด perianal gland adenoma เมื่อใช้ความเข้มข้นดังกล่าว จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแม้เนื้องอกจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่ความเข้มข้นของ primary antibody ที่ใช้อาจไม่เท่ากันได้ จากการศึกษาก่อนหน้านี้สำหรับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในเนื้องอกชนิดต่างๆ ที่นำมาศึกษาต้องใช้ความเข้มข้นสูง (1: 50) เป็นเหตุให้สิ้นเปลืองแอนติบอดี (Ruiz *et al.*, 2005) อีกปัจจัยที่สำคัญในการศึกษานี้คือเทคนิคการทำการเปิดปฏิกิริยาโดยใช้การให้ความร้อนเนื้อเยื่อที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์โดยใช้เตาไมโครเวฟ เพื่อทดแทนการใช้เอนไซม์ที่มีรายงานการสำหรับแอนติบอดีต่อ vimentin (Vilches-Moure and Ramos-Vara, 2005) และ cytokeratin (Walter, 2000) ที่นำมาศึกษา เพื่อตรวจหาแอนติเจนอยู่ในเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในรูปพาราฟินบล็อก ซึ่งเป็นเทคนิคที่สะดวกประหยัดและใช้ได้ผลดีกับเนื้อเยื่อสุญญและสามารถควบคุม

ได้ง่ายกว่าการใช้แอนไชม์ที่ควบคุมได้ยากและมีผลต่อโครงสร้างของเนื้อเยื่อในกรณีใช้ระยะเวลาในการย้อมที่ไม่เหมาะสม (Pileri *et al.*, 1997) และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของแอนไชม์แต่ละชนิดและต้องคำนึงถึงการศึกษา beforehand ของแอนติเจนที่สนใจเนื่องจากแอนติเจนบางชนิดเหมาะสมกับการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนด้วยแอนไชม์เท่านั้น (Vilches-Moure and Ramos-Vara, 2005) แต่ทั้งนี้เทคนิคการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนที่เหมาะสมต้องใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจวัด (detection system) ที่มีความไวสูงเพื่อให้เกิดผลดีที่สุด

การศึกษานี้เลือกใช้ ระบบขยายสัญญาณแบบ polymer detection system (Novolink TM polymer detection system) ที่มีความสะดวกมีผลการติดสีของเนื้ออกได้ชัดเจนและช่วยลดการเกิด การติดสีแบบไม่จำเพาะ (non-specific background) กับเซลล์อื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องในเนื้อเยื่อ อาจต้องเปรียบเทียบระบบเดียวกันนี้กับผู้ผลิตรายอื่นเช่น Envision TM(Dako), ImmPRESS TM ต่อไป เนื่องจากการศึกษาที่มีรายงานเปรียบเทียบการใช้ในทางสัตวแพทย์ยังน้อยและแม้ว่าจะเป็นระบบที่ใช้หลักการเดียวกันแต่ก็พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละผู้ผลิต (Ramos-Vara and Miller, 2006) สำหรับการศึกษานี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบระบบการตรวจวัดโดยใช้ระบบการตรวจวัดแบบ Polymer Detection System กับระบบ Indirect conjugated ธรรมดาที่ปราศจากการขยายสัญญาณ โดยใช้สภาวะในการทำเทคนิคแบบเดียวกันเปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วนที่เป็น secondary antibody ที่ติดแอนไชม์ไว้โดยตรง กับ secondary antibody ที่ติดกับสาย polymer ที่มีแอนไชม์ จำนวนหลายโมเลกุลติดอยู่ พบว่าที่ความเข้มข้น 1:50 แทบไม่พบความแตกต่างระหว่างทั้งสองระบบ แต่เมื่อเจือจาง primary antibody เพิ่มขึ้นพบว่าผลการติดสีของระบบที่ไม่มีตัวช่วยขยายสัญญาณ ติดสีลดลงอย่างชัดเจนที่ระดับความเข้มข้น 1:200 ในขณะที่เนื้อเยื่อที่ใช้ระบบการตรวจวัด Polymer Detection System สามารถคงระดับความเข้มที่ใกล้เคียงกันระหว่างการใส่ primary antibody ที่ความเข้มข้น 1:50 และ 1:300 ในเนื้ออกบางชนิดเช่น Squamous cell carcinoma ที่ใช้ Anti-cytokeratin เป็น primary antibody

ในส่วนของสภาวะที่ใช้ในการบ่ม primary antibody ที่ทดสอบความแตกต่างในแอนติบอดีทั้งสองชนิดได้ทำการเปรียบเทียบสองสภาวะที่เคยมีรายงานการใช้อยู่ได้แก่ ระยะเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างระยะเวลานานข้ามคืนและ 1 ชั่วโมงที่ 4°C และ 37°C ตามลำดับ ดังนั้นในการปฏิบัติงานประจำวันสามารถปรับระยะเวลาที่ใช้ในการทำเทคนิคได้ตามความเหมาะสมเพื่อความสะดวกได้ สำหรับแอนติบอดีชนิด cytokeratin และ vimentin ร่วมกับระบบการตรวจวัดแบบ Polymer Detection system แต่กรณีที่จะใช้แอนติบอดีชนิดอื่นนอกเหนือจากที่ศึกษาอาจต้องพิจารณาจากสภาวะที่มีรายงานว่าใช้ได้ดีและ

ทดลองเปลี่ยนแปลงให้เกิดความเหมาะสมต่อไป สำหรับการขัดขวางโปรตีนไม่จำเพาะที่อยู่ในเนื้อเยื่อการทดลองนี้เลือกใช้ casein 0.4% w/v ซึ่งใช้ได้ดีไม่พบปัญหาการยึดติดพื้นหลังไม่จำเพาะ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 0.5% bovine serum albumin แล้วพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันและมีราคาถูกดังนั้นจึงเลือกใช้ casein เป็นตัวขัดขวางโปรตีนที่ไม่จำเพาะในการศึกษานี้แต่ในกรณีที่ต้องการใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาแอนติเจนบางชนิดการใช้ casein อาจไม่เหมาะสมจึงควรพิจารณากรณีเกิดปัญหาการติดพื้นหลังไม่จำเพาะโดยทดลองใช้สารที่ใช้ขัดขวางโปรตีนที่ไม่จำเพาะให้เหมาะสมอาจทำการเปรียบเทียบการใช้ casein และสารอื่นๆ เนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อของเนื้องอกที่อยู่บริเวณผิวหนังจึงพบปัญหาเกี่ยวกับเอนไซม์ภายในเนื้อเยื่อที่มีผลรบกวนระบบการตรวจวัดที่ใช้น้อยแต่ก็มีขั้นตอนการขัดขวางเอนไซม์ภายในเนื้อเยื่อที่เหมาะสมกับระบบตรวจวัดที่ใช้ซึ่งไม่ยุ่งยากและใช้เวลาไม่นานเท่าการกำจัดเอนไซม์ในเนื้อเยื่อชนิดอื่น

การศึกษานี้สามารถใช้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์แต่ต้องมีการปรับปรุงระบบข้อมูลในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้เกิดมาตรฐานและต้องมีการการควบคุมคุณภาพในแต่ละขั้นตอนอย่างเหมาะสมต่อไป เพื่อให้สามารถใช้เทคนิคนี้มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นเทคนิคที่ช่วยในการวินิจฉัยเนื้องอกในสุนัข โดยสามารถประยุกต์ใช้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการทางแพทย์ที่มีรายงานว่าเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อสุนัข โดยแปลผลที่ได้เปรียบเทียบกับ control ที่เหมาะสม นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมกัน เช่นการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน และการระบบการตรวจวัดที่มีการขยายสัญญาณ สามารถใช้เทคนิคนี้กับเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในรูปพาราฟินบล็อก สามารถใช้สำหรับการศึกษาย้อนหลังเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมเนื้องอกที่สนใจในภายหลังได้ สามารถช่วยลดปริมาณการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ ช่วยในการลดต้นทุนเหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยประจำวัน แต่ต้องคำนึงถึงผลที่ได้ในเนื้องอกแต่ละชนิดที่มีการแสดงออกของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาไม่แน่นอนแม้จะเป็นเนื้องอกในกลุ่มเดียวกันแต่เซลล์ต้นกำเนิดต่างกัน หรือระดับการเจริญพัฒนาของเซลล์เนื้องอก การศึกษานี้สามารถใช้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับห้องปฏิบัติการทางสัตวแพทย์ แต่ต้องมีการปรับปรุงระบบข้อมูลในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้เกิดมาตรฐานและต้องมีการควบคุมคุณภาพในแต่ละขั้นตอนอย่างเหมาะสมต่อไป เพื่อให้เทคนิคนี้มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นเทคนิคหลายขั้นตอน ที่ผ่านมามีการศึกษาปรับปรุงขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อให้การใช้เทคนิคมีความไวและความจำเพาะดีที่สุด ได้มีความพยายามกำหนดมาตรฐานของขั้นตอนต่างๆ สำหรับการใช้เทคนิคนี้ในทางสัตวแพทย์โดยได้รวบรวมปัญหาที่พบได้บ่อยในการใช้เทคนิคนี้และข้อเสนอแนะในแต่ละขั้นตอนเพื่อให้มีหลักการดำเนินการในการแก้ปัญหาไปในแนวทางเดียวกันโดยปัญหาสำคัญที่ควรให้ความสนใจเกี่ยวกับการใช้เทคนิคนี้ มีดังนี้

1. การบันทึกข้อมูลในแต่ละขั้นตอนควรทำเป็นตารางข้อมูลในแต่ละขั้นตอน (Review assay logs/datasheets/checklists) ให้แน่ใจว่าไม่มีขั้นตอนที่ขาดหายไปและในทุกขั้นตอนทำตามลำดับอย่างถูกต้อง โดยข้อมูลหลักที่ควรมีในตารางตรวจสอบมีดังต่อไปนี้

1.1 สภาวะที่ใช้ในการบ่ม primary antibody incubation time และอุณหภูมิที่เหมาะสม

1.2 ตรวจเช็คขั้นตอนการทำการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจน ที่ใช้ว่าเหมาะสมและบันทึกข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นต่อไป

- 1.3 ตรวจสอบระบบ Detection system ที่ใช้ว่าเหมาะสมกับ primary antibody
- 1.4 ต้องตรวจเช็ควันหมดอายุของสารเคมีและแอนติบอดีและต้องมีการเก็บรักษาอย่างเหมาะสมตามที่ผู้ผลิตแนะนำที่มากับบรรจุภัณฑ์
- 1.5 ตรวจเช็ค primary antibody ที่ใช้ว่ามีความเข้มข้นที่เหมาะสม
- 1.6 ตรวจสอบขั้นตอนการเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ และคุณภาพของสารเคมีที่เกี่ยวข้อง
- 1.7 ตรวจสอบการเตรียม substrate-chromogen ที่ใช้ว่าถูกต้องและเหมาะสม
- 1.8 ระวังไม่ให้ สไลด์แห้งในระหว่างขั้นตอนต่างๆ
- 1.9 ตรวจสอบค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เกี่ยวข้อง

2. การใช้ positive control และ negative control ที่เหมาะสมมีความจำเป็นเนื่องจากบางครั้งเนื้อเยื่อนำมาทดสอบอาจไม่ทราบประวัติสำคัญบางประการ เช่นระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาในฟอร์มาลิน อายุการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในรูปพาราฟินบล็อก ซึ่งมีผลต่อ immunoreactivity ทั้งสิ้น การมี positive control และ negative control ที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดความเชื่อมั่นในการแปลผลที่ได้เพิ่มขึ้นหรือสามารถช่วยประเมินว่าเกิดความผิดพลาดขึ้นในขั้นตอนใด ถ้าเป็นไปได้เนื้อเยื่อ control ควรอยู่แผ่นเดียวกันกับเนื้อเยื่อที่ใช้ทดสอบเพื่อให้มั่นใจว่าอยู่ในสภาวะขั้นตอนเดียวกัน และภายในชิ้นเนื้อเยื่อนำมาทดสอบ ควรมีเนื้อเยื่อส่วนปกติและเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถใช้สำหรับเป็น internal control ได้ ซึ่งการใช้เทคนิคนี้ในเนื้องอก อาจมีปัญหาน้อยกว่าการใช้ในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ เนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการตรวจหาอาจมีอยู่ในเนื้อเยื่อปกติ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงแอนติเจนที่ตรวจหานั้นพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อปกติและเนื้องอก สำหรับกรณีที่จะตรวจหาแอนติเจนบางชนิดที่พบเฉพาะในเนื้องอกนั้นต้องใช้เนื้อเยื่อ control ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละกรณีไป

Control ที่เหมาะสมสำหรับเนื้องอกเป็นทางเดียวที่ช่วยยืนยันการมีแอนติเจน นอกจากนั้นผลลบที่ได้สำหรับมาร์กเกอร์เนื้องอกไม่สามารถ rule out เนื้องอกเฉพาะได้เนื่องจากเซลล์มาร์กเกอร์ที่สนใจอาจไม่มีการแสดงออกในกลุ่มของเซลล์ที่มีการเจริญพัฒนาไม่ดี

Control สำหรับมาร์กเกอร์เนื้องอกที่เหมาะสมตามหลักการประกอบด้วยเนื้อเยื่อเนื้องอกที่สนใจ ซึ่งจะมีการแสดงออกของแอนติเจนที่สนใจที่ระดับความเข้มต่างๆ เนื้อเยื่อ control สำหรับมาร์กเกอร์เนื้องอกต้องเป็นเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดเดียวกับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบ การตรวจสอบแอนติเจนในเนื้องอกบางชนิดในสัตว์แต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน

Negative tissue control หมายถึงเนื้อเยื่อที่ทราบแน่นอนว่าไม่มีแอนติเจนที่สนใจตรวจหา ทั้ง positive และเนื้อเยื่อที่เตรียมเองในสถานะเดียวกันกับที่ใช้กับเนื้อเยื่อนำมาตรวจ โดยเฉพาะแอนติเจนที่อยู่ในเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ เนื้อเยื่อที่ใช้เป็น positive control จะมีบริเวณที่แสดงออกของแอนติเจนจำเพาะในปริมาณต่างๆ ในทางปฏิบัติจะใช้เนื้อเยื่อที่เป็น control เพียงสไลด์เดียว เนื่องจากในชิ้นเนื้อเยื่อในตำแหน่งที่เหมาะสมจะพบมีทั้งเซลล์ที่เป็น positive และ negative

นอกจากนั้น control ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อนำมาตรวจสอบเองเช่น การใช้เซลล์บุหลอดเลือดปกติที่อยู่ภายในตัวอย่างที่นำมาตรวจเป็น Internal positive controls สำหรับแอนติบอดีชนิด vimentin ซึ่ง control ชนิดนี้จะไม่มีความผันแปรระหว่าง control tissue กับเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ สำหรับการ negative antibody control ที่ใช้สำหรับยืนยันความจำเพาะของ test และช่วยประเมินระดับของการติดสีแบบไม่จำเพาะโดยการไม่ใช้ primary antibody โดยในการศึกษานี้เลือกใช้สารละลาย TBS บัฟเฟอร์ทดแทนซึ่งผลที่ได้จะช่วยประเมินระดับของการเกิดปฏิกิริยาข้ามของ primary antibody และระดับการเกิดการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีตัวที่สองที่มีฉลากติดอยู่ ถ้าใช้วิธีนี้ควรทำ controls ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนในวิธีการเปิดปฏิกิริยาแอนติเจนและเมื่อเปลี่ยนระบบการตรวจวัดที่ใช้ (Ramos *et al.*, 2008)

3. สำหรับปัญหาการศึกษาย้อนหลังในการใช้ เนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในรูป พาราฟินบล็อก กรณีที่เนื้อเยื่อเก็บไว้นานเกินไปอาจพบปัญหาการติดสีไม่ดี อาจต้องทำการเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ control ที่ตัดใหม่

4. ปัญหาการติดสีพื้นหลัง (Background staining) อาจต้องประเมินความเป็นไปได้ตั้งแต่ขั้นตอนก่อนทำการย้อม (Prestaining problems) เนื่องจากการตรึงเนื้อเยื่อไม่เพียงพอ เนื้อเยื่อที่ตรวจมีส่วนของเนื้อตาย เนื้อเยื่อแห้งในระหว่างการทำ หรือตัดเนื้อเยื่อหนาเกินไป การใช้ความร้อนสูงเกินไปหรือยาวนานเกินไป อาจต้องทำการประเมินสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแอนติเจนที่ใช้ซ้ำในเนื้องอกแต่ละชนิด การขัดขวางโปรตีนอื่นที่ไม่จำเพาะภายในเนื้อเยื่อไม่ดีพอหรือทำการขัดขวางเอนไซม์ภายในเซลล์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่ใช้ในระบบการตรวจวัดไม่เหมาะสมอาจต้องแก้ไขโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการขัดขวางโปรตีนที่ไม่จำเพาะ หรือเปลี่ยนชนิดสารที่ใช้ขัดขวาง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ไชยยันต์ เกษรคอกบัว. 2551. เอกสารประกอบการบรรยายเรื่อง “เนื้องอกที่พบบ่อยในสัตว์เล็ก”.
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อนุเทพ รังสีพัฒน์, บุญมี สัตยญสุจจารี, เล็ก อัสวพลังชัย, อัจฉริยา ไสละสุต, รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุ
เวช และ คมกฤษ เทียนคำ. 2546. เนื้องอกของสุนัขในเขตกรุงเทพมหานคร. **เวชสารสัตว
แพทย์** 33(1): 59-66.
- Baez, J. L., M. J. Hendrick, F. S. Shofer, C. Goldkamp and K. U. Sorenmo. 2004. Liposarcomas
in dogs: 56 cases (1989-2000). **J Am Vet Med Assoc.** 224: 887-891.
- Bancroft, J. D. and M. Gamble. 2008. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 6th ed.
Churchill Livingstone, Inc., Edinburgh.
- Barrett, A. W., S. Selvarajah, S. Franey, K. A. Wills and B. K. Berkovitz. 1998. Interspecies
variations in oral epithelial cytokeratin expression. **J Anat.** 193: 185-193.
- Cattoretti, G., S. Pilleri, C. Parravicini, M. H. Becker, S. Poggi, C. Bifulco, G. Key, L. D'Amato,
E. Sabattini and E. Feudale. 1993. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-
embedded tissue sections. **J Pathol.** 171: 83-98.
- Cohen, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological
Measurement.** 20: 37-46.
- D'Amico, F., E. Skarmoutsou and F. Stivala. 2009. State of the art in antigen retrieval for
immunohistochemistry. **J Immunol Methods.** 341: 1-18.

- Dahl, D., D. C. Rueger, A. Bignami, K. Weber and M. Osborn. 1981. Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. **Eur J Cell Biol.** 24: 191-196.
- Dubey, M., S. Hoda, W. K. Chan, A. Pimenta, D. D. Ortiz and T. B. Shea. 2004. Reexpression of vimentin in differentiated neuroblastoma cells enhances elongation of axonal neurites. **J Neurosci Res.** 78: 245-249.
- Duquette, R. A., A. Shmygol, C. Vaillant, A. Mobasher, M. Pope, T. Burdyga and S. Wray. 2005. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? **Biol Reprod.** 72: 276-283.
- Fraenkel-conrat, H., B.A. Brandon and S. Olcott. 1947. The reaction of formaldehyde with proteins; participation of indole groups; gramicidin. **J Biol Chem.** 168: 99-118.
- Folpe, A. L. and K. Cooper. 2007. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. **Arch Pathol Lab Med.** 131: 1517-1524.
- Goldschmidt, M. H. and F. S. Shofer. 1992. **Skin Tumors of the Dog and Cat.** Pergamon Press, Inc., Oxford.
- Goldschmidt, M. H. and M. J. Hendrick. 2002. Tumors in the skin and soft tissues. **In** D. J. Meuten, ed. **Tumors in Domestic Animals.** 4th ed. Iowa State Press, Blackwell Publishing Company, Ames, Iowa. 64-67.
- Grizzle, W. E., J. L. Fredenburgh and R. B. Myers. 2008. Fixation of Tissues. **In** Bancroft, J. D. and M. Gamble, ed. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 6th ed. Churchill Livingstone, Inc., Edinburgh.
- Gross, T., P. T. Ihrke, E. J. Walder and V. K. Affolter. 2005. **Skin diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis.** 2nd ed. Blackwell Science, Inc., Oxford.

- Haines, D. M. and B. J. Chelack. 1991. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. **J Vet Diagn Invest.** 3:101-112.
- Jackson, B. W., C. Grund, E. Schmid, K. Burki, W. W. Franke and K. Illmensee. 1980. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. **Differentiation.** 17: 161-179.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik. 2005. **Immuno Biology: the Immune System in Health and Disease.** 6th ed. Garland Science Publishing, New York.
- Key, M. 2006. **Immunohistochemical Staining Methods.** 4th ed. Dako, Carpinteria, California.
- Koenig, A., J. Wojcieszyn, B. R. Weeks and J. F. Modiano. 2001. Expression of S100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. **Vet Pathol.** 38: 427-435.
- Kierszenbaum, A. L. 2007. **Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology.** 2nd ed. Mosby, Inc., Philadelphia.
- Maliver, P., M. Estrada, M. Lagdic, M. Mialot, S. Manin and J. J. Fontaine. 2004. An osteoid variant of cutaneous melanoma in a dog detected by S100 and melan a markers. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.** 51: 413-415.
- Mazzei, M., F. Millanta, S. Citi, D. Lorenzi and A. Poli. 2002. Haemangiopericytoma: histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis. **Vet Dermatol.** 13: 15-21.
- Moisan, E. and D. GIRARD. 2006. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. **J Leukoc Biol.** 79: 489-498.

- Paulin, D., N. Forest and J. Perreau. 1980. Cytoskeletal proteins used as marker of differentiation in mouse terato; carcinoma cells. **J Mol Biol.** 144: 95-101.
- Perez, J., M. J. Bautista, E. Rollon, F. C. Delara, L. Carrasco and J. Martindelasmulas. 1996. Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. **Vet Pathol.** 33: 391-397.
- Pileri, S. A., G. Roncador, C. Ceccarelli, M. Piccioli, A. Briskomatis, E. Sabattini, S. Ascani, D. Santini, P. P. Piccaluga, O. Leone, S. Damiani, C. Ercolessi, F. Sandri, F. Pieri, L. Leoncini and B. Falini. 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. **J Pathol.** 183: 116-123.
- Ramos-Vara, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol.** 42: 405-426.
- Ramos-Vara, J. A. and M. A. Miller. 2006. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+ and ImmPRESS. **J Microsc.** 224: 135-139.
- Ramos-Vara, J. A., M. Kiupel, T. Baszler, L. Bliven, B. Brodersen, B. Chelack, S. Czub, F. Delpiero, S. Dial, E. J. Ehrhart, T. Graham, L. Manning, D. Paulsen, V. E. Valli and K. West. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diagn Invest.** 20: 393-413.
- Renshaw, S. 2007. **Immunohistochemistry.** Scion Publishing Ltd, Broxham.
- Ruiz, F.S., A. C. Alessi, C. A. Chagas, G. A. Pinto and J. Vassallo. 2005. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **J Bras Pathol Med Lab.** 41:263-70.

- Sabattini, S. and G. Bettini. 2009. An immunohistochemical analysis of canine haemangioma and haemangiosarcoma. **J Comp Pathol.** 140: 158-168.
- Schnitzer, J., W. W. Franke and M. Schachner. 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. **J Cell Biol.** 90: 435-447.
- Schultheiss, P. C. 2004. A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. **J Vet Diagn Invest.** 16: 522-526.
- Shi, S., R. J. Cote and C. R. Taylor. 1997. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present and Future. **J Histochem & Cytochem.** 45: 327-343.
- Spencer, L. T. and J. D. Bancroft. 2008. Tissue Processing. **In** Bancroft, J. D. and M. Gamble, ed. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 6th ed. Churchill Livingstone, Inc., Edinburgh.
- Spiegelman, B. M. and S. R. Farmer. 1982. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. **Cell.** 29: 53-60.
- Tapscott, S. J., G. S. Bennett, Y. Toyama, F. Kleinbart and H. Holtzer. 1981. Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord. **Dev Biol.** 86: 40-54.
- Thomas, P. A., D. A. Kirschmann, J. R. Cerhan, R. Folberg, E. A. Seftor, T. A. Sellers and M. J. Hendrix. 1999. Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. **Clin Cancer Res.** 5: 2698-2703.

- Vascellari, M., E. Melchiotti, M. A. Bozza and F. Mutinelli. 2003. Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.** 50: 286-291.
- Vilches-Moure, J. G. and J. A. Ramos-Vara. 2005. Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues. **J Vet Diagn Invest.** 17: 346-350.
- Viott, A. M., A.T. Ramos, A. Mazzanti, G. D. Kommers and D. L. Grace. 2008. Schwannoma with bone differentiation in a dog. **Braz J Vet Pathol.** 1(2): 52 – 55.
- Virgintino, D., E. Maiorano, M. Bertossi, L. Pollice, G. Ambrosi and L. Roncali. 1993. Vimentin and GFAP-immunoreactivity in developing and mature neural microvessels. Study in the chicken tectum and cerebellum. **Eur J Histochem.** 37: 353-362.
- Vos, J. H., T. S. Vanden Ingh, F. C. Ramakers, M. Deneijs, F. N. Vanmil and D. Ivanyi. 1992. Keratin and vimentin distribution patterns in the epithelial structures of the canine anal region. **Anat Rec.** 234: 391-398.
- Walter, J. 2000. A cytokeratin profile of canine epithelial skin tumours. **J Comp Pathol.** 122:278-287
- Wang, F. I., S. L. Liang, H. L. Eng, C. R. Jeng and V. F. Pang. 2005. Disseminated liposarcoma in a dog. **J Vet Diagn Invest.** 17: 291-294.
- Weiss S. W. and J. R. Goldblum. 2001. **Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors.** Mosby, Inc., St. Louis.

Withrow, S.J. and D.M. Vail. 2007. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**.
4th ed. Saunders Elsevier, Inc., St. Louis, Mo.

Yen, S. H. and K. L. Fields. 1981. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. **J Cell Biol.** 88: 115-126.

Young, C., M. Y. Lin, P. J. Wang and Y. Z. Shen. 1994. Immunocytochemical studies on desmin and vimentin in neuromuscular disorders. **J Formos Med Assoc.** 93: 829-835.

Ziller, C., E. Dupin, P. Brazeau, D. Paulin and N. M. Le Douarin. 1983. Early segregation of a neuronal precursor cell line in the neural crest as revealed by culture in a chemically defined medium. **Cell.** 32: 627-638.



การเตรียมสารเคมีและสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

1. Washing buffer

1.1 10x Tris buffer saline (TBS)

NaCl 85 กรัม

TRIS (Hydroxymethyl) aminomethane 60.5 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.6 โดยใช้สารละลาย HCl 37%

เตรียมให้เป็น 1x TBS โดยใช้ 10x TBS 100 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นปริมาณ 900 มิลลิลิตร

1.2 10x Phosphate buffer saline (PBS)

Na₂HPO₄ 11.5 กรัม

KH₂PO₄ 2 กรัม

NaCl 80 กรัม

KCl 2 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.6

เตรียมให้เป็น 1x PBS โดยใช้ 10 x PBS 100 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นปริมาณ 900 มิลลิลิตร

2. Non-specific protein blocking solution

2.1 0.4% Casein in TBS

Casein 0.4 กรัม

1xTBS 100 มิลลิลิตร

2.2 1% Bovine serum albumin

Bovine serum albumin 1 กรัม

1xTBS 100 มิลลิลิตร

3. Post primary blocking

Normal goat serum 10%

Normal goat serum 10 มิลลิลิตร

1xTBS 90 มิลลิลิตร

4. Antigen Retrieval Solution

4.1 Citrate buffer pH 6 (สูตรที่ 1)

Citric acid (anhydrous) 21 กรัม

น้ำกลั่น 10 ลิตร

ปรับให้ได้ pH 6 โดยใช้ 10 N NaOH (conc. NaOH)

4.2 Citrate buffer pH 6 (สูตร 2)

Tri-sodium citrate (dehydrate) 2.94 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ปรับให้ได้ pH 6 โดยใช้ 1 N NaOH

4.3 Trypsin solution

4.3.1 Trypsin stock solution (0.5% ในน้ำกลั่น)

Trypsin 50 มิลลิกรัม

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

สารละลายเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

4.3.2 Calcium Chloride stock solution (1%)

Calcium chloride 0.1 กรัม

น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

สารละลายเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4.3.3 Trypsin working solution (0.05%)

Trypsin stock solution (0.5%) 1 มิลลิลิตร

Calcium chloride stock solution 1% 1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร

ปรับให้ได้ pH 7.8 โดยใช้ 1 N NaOH

สารละลาย Trysin working solution เก็บรักษาไว้ที่ 4°C ได้นาน 1 เดือน หรือเก็บไว้ที่ -20°C (Peter and Blythe, 2008)

1. การเตรียมสารละลายสับสเตรท 3'3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB)

5.1 DAB ชนิดเม็ด

DAB tablet 10 มิลลิกรัม

1xTBS (pH 7.6) 10 มิลลิลิตร

3% H_2O_2 400 ไมโครลิตร

5.2 DAB ๑นค้๑น้ำ (DAB chromogen solution)

1.74% w/v DAB in stabilizer solution	50 ไมโครลิตร
NovoLink™ DAB Substrate Buffer	1 มิลลิลิตร

2. Endogenous enzyme blocking solution

กรณค้๑ใช้เอนไซม์๑นค้๑ Horseradish peroxidase จะใช้ 3% H_2O_2 เป็นตัว๑ด๑วางเอนไซม์ ๑นในเชลล์ โดย 3% H_2O_2 สามารถนํ๑มาเจือจางให้๑ได้๑๑๑ส่วนที่๑เหมาะสมกับ๑เนื้อเยื่อที่๑ทดสอบโดยเจือจางกับ 1xTBS ใช้ใน๑ช่วง 0.1%-3% H_2O_2 ๑ร๑บเวลาที่๑หยุด๑งไว้บน๑เนื้อเยื่อให้๑เหมาะสมกับ๑ชนิด๑เนื้อเยื่อ

3. การเคลือบแผ่นสไลด์ (Coated slide) สำหรับใช้ใน๑เทคนิค๑อิมมูโนฮิสโตเคมี

7.1 อุปกรณ์และสารเคมี

7.1.1 แผ่นสไลด์๑สะอาด

7.1.2 95% Ethanol

7.1.3 100% Ethanol

7.1.4 สารที่๑ใช้เคลือบแผ่นสไลด์ APES (3-Aminopropyl- Triethoxy –Silane) sigma

7.2 ๑วิธีการ

7.2.1 ล้างแผ่นสไลด์ให้๑สะอาดด้วยสาร๑ประเภท๑ผงซักฟอก เช็ดให้๑แห้ง

7.2.2 แช่แผ่นสไลด์ใน 95% ethanol นาน 1 ชั่วโมง นํ๑มาเช็ดให้๑แห้ง

7.2.3 จุ่มสไลด์ใน 2% APES ใน Absolute Ethanol นาน 5 นาที

7.2.4 นํ๑าแผ่นสไลด์ไป จุ่มล้างใน๑น้ำกลั่นและ๑งให้๑แห้งเก็บ๑ใส่๑กล่อง (Renshaw, 2007)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวจิราภรณ์ ศรีทัน
 เกิดวันที่ 25 ธันวาคม 2523
 สถานที่เกิด อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่
 ประวัติการศึกษา สพ.บ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน -
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ รางวัลการนำเสนอปัญหาพิเศษดีเด่น ประจำปี 2548
 เรื่องความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคและเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดเนื้องอก
 อักเสบในโคนมที่เลี้ยงในเขตจังหวัดราชบุรี นครปฐมและกาญจนบุรี
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ -