รายงานผลการวิจัย
เงินทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2536

เรื่อง

การศึกษาลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในคน และในเซลล์เนื้องอกที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกายด้วยกล้องจุลทรรศน์

โดย

สมพร สวัสดิสรรพ์
วินัย ศิริจิตร
วัชรี จังศิริวัฒนธำรง
วิจิตรา วิพิศมากูล

2541

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่อไปนี้

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2536

ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือในด้านการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา

ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในด้านเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น

การศึกษาลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในคนและในเซลล์เนื้องอกที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกายด้วยกล้องจุลทรรศน์

สมพร สวัสดิสรรพ์
วินัย ศิริจิตร
วัชรี จังศิริวัฒนธำรง
วิจิตรา วิพิศมากูล

ตุลาคม 2541

บทคัดย่อ

เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาเป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายที่มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟัน เนื้องอกชนิดนี้พบได้บ่อยในกระดูกขากรรไกร อุบัติการของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในประชากรไทยสูงกว่าที่มีรายงานในเชื้อชาติอื่นมาก จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติและลักษณะโดยละเอียดของเนื้องอกนี้ในผู้ป่วยชาวไทย โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น และรวมถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการศึกษา จากการศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมามีการสร้างโปรทีนไซโตเคอราตินชนิดน้ำหนักโมเลกุลสูง ไซโตเคอราตินชนิด 19 และไวเมนทิน แสดงให้เห็นว่าเซลล์เนื้องอกเป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างโปรทีนเฉพาะตัว ลักษณะโดยละเอียดของเนื้องอกเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นพบว่าเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาประกอบด้วยเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์และเซลล์คล้ายสเต็ลเลท เซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะโครงสร้างภายในเซลล์จัดเป็นพวกเอ็พพิธีเลียมชนิดที่มีการเรียงตัวหลายชั้น กลุ่มเซลล์เนื้องอกถูกล้อมรอบด้วยเบสเมนท์เมมเบรนที่มีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้องอก ส่วนที่เป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ของเนื้องอกเหล่านี้สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการโดยคงลักษณะของการเป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ได้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ หลังจากนั้นถูกแทนที่ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์

Human ameloblastoma: Light microscopical, ultrastructural and in vitro studies

Somporn Swasdison

Vinai Sirichitra

Vacharee Changsirivatanathamrong

Vichittra Vipismakul

October 1998

Abstract

Ameloblastoma is a benign tumor of odontogenic origin, commonly found in the jaw bones. The occurrent rate of this tumor in Thai population is much higher than previously reported in the other races. The objective of this study was investigation of the tumor cells from Thai patients by using immunohistochemical and transmission electron microscopic techniques. In addition, cell culture of the tumor was performed as a study model for the tumor cells. The result showed that, immunohistochemically, ameloblastoma cells synthesized high molecular weight cytokeratin, cytokeratin 19 and vimentin. The result suggested these tumor cells were epithelial cells with distinct intracellular proteins. Microscopically, ameloblastoma comprised of ameloblast-like and stellate-like cells. These two types of cells had ultrastructural characteristics of stratified epithelium. The tumor cells were surrounded by different patterns of basement membrane in different types of ameloblastoma. By using cell culture technique, the clone of epithelial tumor cells was successfully established and maintained for a short time, then the cells were replaced by fibroblasts.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iv
รายการภาพประกอบ	vi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	2
การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	2
การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชัน.	5
การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ	6
ผลการวิจัย	7
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมา	7
การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	8
การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชัน.	8
การศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ	9
การอภิปรายผล	10
สรุปผล	13
เอกสารอ้างอิง	14

รายการภาพประกอบ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสงแสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาจากผู้ป่วย	17-18
ภาพที่ 2	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสงแสดงลักษณะการติดสีของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาจากผู้ป่วยเมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	19-20
ภาพที่ 3	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นแสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลอคูลาร์จากผู้ป่วย	21-22
ภาพที่ 4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นแสดงลักษณะของเซลล์คล้ายสเต็ลเลทจากเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์จากผู้ป่วย	23-24
ภาพที่ 5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นแสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดเพล็กซิฟอร์มจากผู้ป่วย	25-26
ภาพที่ 6	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแสดงลักษณะของเซลล์ที่คืบคลานออกจากชิ้นเนื้องอกที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	27-28
ภาพที่ 7	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแสดงลักษณะของเซลล์รุ่นที่ 3 ของการทำซับคัลเจอร์	29-30

บทนำ

ในการเกิดฟันตามธรรมชาตินั้น มีกระบวนการที่สำคัญคือ การเปลี่ยนสภาพไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) ของเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างฟัน (tooth-forming cells) และกระบวนการสร้างฟัน (odontogenesis) กระบวนการทั้งสองนี้จะเกิดขึ้นได้ต้องมีปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างฟันสำคัญสองชนิดคือ อมีโลบลาสต์ (ameloblast) และโอดอนโตบลาสต์ (odontoblast) อมีโลบลาสต์จัดเป็นพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ (epithelial cell) ที่มีการเปลี่ยนสภาพมาจากเซลล์ในอวัยวะเคลือบฟัน (enamel organ) โดยปกติอมีโลบลาสต์มีหน้าที่สร้างโปรทีนเนื้อพื้นของเคลือบฟัน (enamel) ส่วนโอดอนโตบลาสต์เป็นพวกเอ็คโตมีเซ็นไคมัลเซลล์ (ectomesenchymal cells) ที่มีการเปลี่ยนสภาพมาจากเซลล์ในเดนทัลปาปิลลา (dental papilla) และทำหน้าที่สร้างโปรทีนเนื้อพื้นของเนื้อฟัน (dentin)[1] นอกจากปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดแล้ว เมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ก็มีอิทธิพลต่อการสร้างฟันด้วย (รวบรวมโดย Brand and Isselhard, 1990 [2]) ความผิดปกติที่เกิดกับเซลล์หรือเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับพัฒนาการ (development) ของฟันที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ กัน[3] ความผิดปกติในการเจริญเติบโตของอมีโลบลาสต์ทำให้เกิดเนื้องอกในกระดูกขากรรไกรได้หลายชนิด ทั้งที่เกิดร่วมกับความผิดปกติของเซลล์ชนิดอื่นหรือเกิดกับเซลล์อมีโลบลาสต์ชนิดเดียว เช่น อมีโลบลาสติกไฟโบรมา (ameloblastic fibroma), อมีโลบลาสติกไฟโบรโอดอนโตมา (ameloblastic fibroodontoma), โอดอนโตมา (odontoma), อดีโนมาตอยโอดอนโตเจนนิกทูเมอร์ (adenomatoid odontogenic tumor) แต่ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ เนื้องอกอมีโลบลาสโตมา (ameloblastoma)[1]

อมีโลบลาสโตมาเป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายที่พบได้บ่อยในขากรรไกร มีจุดกำเนิดมาจากเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟัน เช่น เอ็พพิธิเลียลเซลล์ที่ตกค้างอยู่ในขากรรไกร (epithelial rest) เอ็พพิธีเลียลเซลล์ในอวัยวะเคลือบฟัน หรือเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่บุผนังของถุงน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถุงน้ำชนิดเดนติเจอรัส (dentigerous cyst)(เรียบเรียงโดย Shafer et al., 1983 [4]) เนื้องอกชนิดนี้เกิดได้ทั้งในกระดูก (intrabony ameloblastoma) และในเนื้อเยื่ออ่อน (peripheral ameloblastoma) โดยมากมักพบในกระดูกขากรรไกรและพบร่วมกับการเกิดถุงน้ำเดนติเจอรัส เนื้องอกชนิดนี้พบได้ประมาณ 1% ของถุงน้ำและเนื้องอกของขากรรไกรในประชากรของสหรัฐอเมริกาและยุโรป พบได้เท่ากันในเพศหญิงและชาย[4,5] แม้ว่าจะมีบางรายงานกล่าวว่าพบได้ในเพศหญิงมากกว่าเพศชายเล็กน้อย[6] อมีโลบลาสโตมาพบได้ในช่วงอายุตั้งแต่เด็กจนถึงวัยสูงอายุ โดยส่วนใหญ่พบมากในช่วงอายุ 20-40 ปี[4-6] ส่วนในประเทศไทยจากสถิติของภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีอัตราการเกิดสูงกว่า คือพบได้ประมาณ

6% ของถุงน้ำและเนื้องอกของกระดูกขากรรไกร พบได้เท่ากันในเพศหญิงและชาย ช่วงอายุประมาณ 20-30 ปี[7] จากรายงานผู้ป่วยส่วนใหญ่ในทุกเชื้อชาติ พบว่าไม่น้อยกว่า 80 % ของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในกระดูกเกิดกับกระดูกขากรรไกรล่าง และส่วนใหญ่พบที่บริเวณฟันกรามถึงกระดูกเรมัส (ramus)[4-8] เนื้องอกนี้เมื่อเกิดในกระดูกจะทำให้เกิดการทำลายกระดูกอย่างช้า ๆ ผู้ป่วยมีอาการบวมแข็ง ส่วนใหญ่ไม่มีอาการเจ็บปวดใด ๆ แม้ว่าอมีโลบลาสโตมาจัดเป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง แต่เนื้องอกชนิดนี้ก็มีพฤติกรรมค่อนข้างรุนแรงเนื่องจากเซลล์เนื้องอกมีการเจริญแทรกแซงเข้าไปในกระดูกใกล้เคียง นอกจากนี้มีรายงานว่าเนื้องอกชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อร้ายที่ลุกลามและแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ปอด และกระดูกส่วนอื่นได้[4]

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของอมีโลบลาสโตมาคล้ายกับอวัยวะเคลือบฟัน กล่าวคือประกอบไปด้วย เซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์ (ameloblast-like cells) และเซลล์ที่คล้ายกับสเต็ลเลทเซลล์ (stellate-like cells) เนื้องอกนี้แบ่งออกได้เป็นหลายชนิด (type) เช่น ชนิดฟอลลิคูลาร์ (follicular type) ชนิดเพล็กซิฟอร์ม (plexiform type) ชนิดอะแคนโธมาตัส (acanthomatous type) ชนิดแกรนูลาร์เซลล์ (granular cell type) และ ชนิดเดสโมพลาสติค (desmoplastic type) ซึ่งการแบ่งชนิดเช่นนี้ แบ่งตามลักษณะการเรียงตัวและชนิดของเซลล์ที่ประกอบกันขึ้นเป็นเนื้องอกนั้น ๆ[4]

การรักษาเนื้องอกอมีโลบลาสโตมามักใช้วิธีการทางศัลยกรรมคือตัดหรือควักออกให้หมด และเมื่อรักษาแล้วจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องติดตามผลการรักษาต่ออีกเป็นเวลานาน ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการกลับเป็นใหม่ของโรค (recurrence rate) สูงถึง 50-90% ขึ้นกับวิธีการรักษา[5,9] เชื่อกันว่าแต่ละชนิดของอมีโลบลาสโตมามีพฤติกรรมการแทรกแซงกระดูกโดยเซลล์เนื้องอกได้ในความรุนแรงแตกต่างกัน[10,11] แต่ความเชื่อนี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์อย่างแน่ชัด ซึ่งพฤติกรรมของอมีโลบลาส-โตมาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปบ้างอาจขึ้นกับชนิดและคุณสมบัติของเซลล์ที่ประกอบกันขึ้นเป็นเนื้องอก เซลล์เหล่านี้มีโครงสร้างโปรตีนภายในเซลล์และล้อมรอบด้วยเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่แตกต่างกัน[12-17]

ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์อมีโลบลาสโตมาในห้องปฏิบัติการนั้น มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกต่าง ๆ กัน เช่นเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้องอกในจานเพาะเลี้ยงเซลล์[16,18] เพาะเลี้ยงเซลล์ในคอลลาเจนเมทริกซ์[19,20] โดยการศึกษาส่วนใหญ่มุ่งในแง่การหาแบบจำลองในการศึกษา (study model) ของเซลล์อมีโลบลาสโตมาเพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของเซลล์เนื้องอกและอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของเซลล์เนื้องอกและเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฟัน

ในการวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาคุณสมบัติและลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาด้วยวิธีการทางกล้องจุลทรรศน์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยข้อมูลที่ได้รับจะใช้เป็นข้อมูล

พื้นฐานสำหรับประชากรไทยในการศึกษาเปรียบเทียบกับคุณสมบัติและลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาที่มีการศึกษาวิจัยมาแล้วในประชากรเชื้อชาติอื่น

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาที่ได้จากผู้ป่วยไทย โดยใช้วิธีการวิจัย 3 วิธีร่วมกัน คือ (1) การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemical study) เพื่อศึกษาชนิดของโปรทีนภายในเซลล์เนื้องอก (2) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น (transmission electron microscopy) เพื่อศึกษาส่วนประกอบภายในและลักษณะโดยละเอียดของเซลล์เนื้องอก (3) การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกจากผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการ (cell culture) เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงให้ได้เฉพาะเซลล์เนื้องอกสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป แต่ละวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้จะได้กล่าวถึงวิธีการดำเนินงานในรายละเอียดต่อไป

เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในการศึกษานี้เป็นเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์ม ได้รับจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาทางศัลยกรรมที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยไม่จำกัดจำนวน อายุ และเพศของผู้ป่วย ทั้งนี้เนื่องจากการมีข้อจำกัดในการเลือกชิ้นเนื้องอกที่สามารถนำมาใช้ศึกษาได้อย่างเหมาะสม ผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการตรวจวินิจฉัยโรคก่อนการผ่าตัดรักษาด้วยการตรวจทางคลินิก และการตรวจชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา (biopsy) ที่ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื้องอกที่ได้รับจากห้องผ่าตัด ถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ส่วนแรกสำหรับการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ส่วนที่ 2 สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น ส่วนที่ 3 สำหรับตรวจดูปริมาณของเซลล์โดยดูจากเนื้อเยื่อบางที่ใช้วิธีการตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแช่แข็ง (frozen section) ในทันทีที่ได้รับชิ้นเนื้องอกจากห้องผ่าตัด ชิ้นเนื้องอกที่มีเซลล์เนื้องอกปริมาณมากพอจึงนำมาใช้ศึกษาต่อไป และส่วนที่ 4 สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีนี้คือชิ้นเนื้องอกที่ผ่านการแช่น้ำยารักษาสภาพฟอร์มาลินบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 4% (neutral formalin buffer) และฝังในพาราฟิน (paraffin) ตัดชิ้นเนื้องอกในพาราฟินให้ได้ความหนา 6 ไมครอน วางลงบนแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการฉาบด้วยสารโพลี-แอล-ไลซีน (poly-L-lysine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารยึด (adhesive) อบชิ้นเนื้อบนสไลด์แก้วที่

อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดน้ำและให้ชิ้นเนื้อติดแน่นบนแผ่นสไลด์ แช่แผ่นสไลด์แก้วที่มีชิ้นเนื้อบางในไซลีน (xylene) เพื่อกำจัดพาราฟินในเนื้อเยื่อก่อนที่จะทำการย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ส่วนการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกเป็นการย้อมสีตัวอย่างเนื้องอกด้วยสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (hematoxylin & eosin) ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานและจะไม่กล่าวถึงวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อในรายงานนี้

เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อบางบนแผ่นสไลด์แก้วแล้ว ทำการย้อมตัวอย่างเนื้องอกตามขั้นตอนดังนี้

1. ย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ทริพซิน ความเข้มข้น 0.03% (trypsin) หรือ เอนไซม์โปรทีเอส ความเข้มข้น 0.025% (protease) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยทริสบัฟเฟอร์เซลายน์ (Tris buffer saline ;TBS)
2. กำจัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่มีในเซลล์ด้วยการแช่ในไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ความเข้มข้น 3% (hydrogen peroxide) เป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วย TBS
3. แช่เนื้อเยื่อในซีรั่มอัลบุมิน ความเข้มข้น 1% (serum albumin) ใน TBS เป็นเวลา 20 นาที เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาแบบไม่เฉพาะเจาะจง (block nonspecific reaction) ของแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อที่จะเกิดขึ้นในขั้นตอนต่อไป
4. ใส่แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรทีนที่ต้องการศึกษาภายในเซลล์ ให้เนื้อเยื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเป็นเวลา 30-60 นาทีขึ้นกับแอนติบอดีแต่ละชนิด ล้างออกด้วย TBS แอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่แอนติบอดีที่เฉพาะต่อไซโต-เคอราตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (CK HMW), ไซโตเคอราติน 19 (CK19), ไวเมนทิน (vimentin), เดสมิน (desmin) และ เอส-100 โปรทีน (S-100 protein)
5. ใส่แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่เฉพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยแอนติบอดีทุติยภูมินี้ติดฉลากด้วย biotin (biotinylated secondary antibody) ให้แอนติบอดีทุติยภูมิทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปฐมภูมิ เป็นเวลา 60 นาที ล้างออกด้วย TBS แอนติบอดีปฐมภูมิและแอนติบอดีทุติยภูมิเป็นผลิตภัณฑ์จาก บริษัท Dakopatt ประเทศเดนมาร์ก ความเข้มข้นในการใช้งานของแอนติบอดีได้มีระบุไว้แล้วในเอกสารคู่มือของแอนติบอดีแต่ละชนิด
6. ใส่น้ำยาสเตร็พอะวิดิน (strepavidin) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสลงบนเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วย TBS
7. ใส่ซับสเตรท (substrate) คือ 3, 3-ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตราไฮโดรคลอไรด์ (3,3-diamino benzidine tetrahydrochloride; DAB) ลงบนเนื้อเยื่อและปล่อยให้สารนี้ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อไม่เกิน 20 นาที สังเกตดูสีที่เปลี่ยนแปลงไป

8. หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการล้างน้ำปริมาณมาก
9. ย้อมสีทับ (counter stain) ด้วยสีฮีมาท็อกไซลิน
10. แช่ชิ้นเนื้อที่ย้อมแล้วในไซลีน ก่อนที่จะปิดทับชิ้นเนื้อด้วยแผ่นแก้วปิด (cover slips)
11. ศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง
12. ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมคือเนื้อเยื่อเหงือกปกติที่มีเอ็พพิธีเลียลเซลล์และเนื้อเยื่อยึดต่อ กลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกับกลุ่มทดลอง ส่วนกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อเดียวกับกลุ่มทดลองผลบวกและผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง ยกเว้นแต่เนื้อเยื่อในกลุ่มนี้ไม่ได้รับการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปฐมภูมิ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชัน

เมื่อได้รับตัวอย่างชิ้นเนื้องอก ล้างชิ้นเนื้องอกด้วยนอร์มัลเซลายน์ (normal saline) ตัดชิ้นเนื้องอกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ชิ้นเนื้องอกในน้ำยารักษาสภาพกลูตาร์อัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2% (glutaraldehyde) ใน 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer pH 7.2; PB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PB จากนั้นแช่ในออสเมียมเตตรอกไซด์ ความเข้มข้น 1% (osmium tetroxide) ใน PB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PB อีกครั้งก่อนทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยเอธิลแอลกอฮอล (ethyl alcohol) ที่ความเข้มข้น 50%, 75%, 95% และ 100% และโพรพีลีนออกไซด์ 100 % (propylene oxide) 2 ครั้ง ตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่นาน 10 นาทีในแต่ละสารละลาย แล้วใส่ชิ้นเนื้อเยื่อลงในแบบพิมพ์ที่มี พลาสติคเหลว (SPURR's resin, EMS, ประเทศสหรัฐอเมริกา) อบตัวอย่างเนื้องอกในพลาสติคเหลวให้แข็งในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปล่อยให้พลาสติคเย็นลง ก่อนที่จะนำไปตัดเนื้อเยื่อบางยิ่งยวด (ultrathin sections) ให้ได้ความหนา 60-80 นาโนเมตร ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อบาง (Ultrotome) ย้อมเนื้อเยื่อด้วยยูเรนิลอะซีเตต ความเข้มข้น 1% (uranyl acetate) และเลดซิเตรท ความเข้มข้น 0.2% (lead citrate) ศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

เมื่อได้รับตัวอย่างชิ้นเนื้องอก ล้างชิ้นเนื้องอกในน้ำยาดัลเบคโคมอดิฟายด์อีเกิลมีเดียม (Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM) หรือเคอราติโนไซท์มีเดียมที่ปราศจากซีรั่ม (Serum-Free Keratinocyte Medium; K-SFM) ให้ชิ้นเนื้อสะอาดปราศจากเลือดและน้ำลายทันที แบ่งส่วนหนึ่งของชิ้นเนื้องอกไปตรวจด้วยเครื่องตัดแช่แข็งและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูปริมาณเซลล์เนื้องอก เนื้องอกที่มีปริมาณเซลล์มากเพียงพอส่วนที่เหลือนำมาแช่ใน DMEM ที่ผสม

น้ำยาปฏิชีวนะ ความเข้มข้น 5% (antibiotic-antimycotic solution) หรือ K-SFM ที่ผสมน้ำยาเจนตาไมซิน (gentamicin) ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับชิ้นเนื้อ จากนั้นตัดชิ้นเนื้องอกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีน้ำยาเลี้ยงเซลล์อยู่ เก็บจานเพาะเลี้ยงที่มีชิ้นเนื้องอกเหล่านี้ในตู้อบที่มีความชื้นสูง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน ศึกษาชิ้นเนื้องอกในจานเพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope)

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้ทดลองใช้ 2 สูตร

สูตรที่ 1 ประกอบด้วย

DMEM 1X	88%
Antibiotic-antimycotic solution	1%
L-glutamine	1%
Fetal bovine serum	10%

สูตรที่ 2 ประกอบด้วย

K-SFM basal medium

Bovine pituitary extract 50 ไมโครกรัม/1 มิลลิลิตรของน้ำยาเลี้ยงเซลล์

Recombinant epidermal growth factor 5 นาโนกรัม/1 มิลลิลิตรของน้ำยาเลี้ยงเซลล์

ส่วนผสมทั้งหมดของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 สูตร เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท GIBCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

ประมาณวันที่ 3-7 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเริ่มมีเซลล์คืบคลานออกจากชิ้นเนื้องอก เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลานานขึ้นจะพบเซลล์คืบคลานออกมาเป็นจำนวนมากขึ้น เซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์หลายลักษณะอยู่ปะปนกันอย่างหนาแน่นรอบ ๆ ชิ้นเนื้องอก เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นมาก ต้องทำ "ซับคัลเจอร์" (subculture) ซึ่งเป็นการย้ายเซลล์ไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่ โดยให้เซลล์มีความหนาแน่นน้อยลง และกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอในจานเพาะเลี้ยงใหม่ การย้ายเซลล์นี้นอกจากเป็นการกระจายและลดความหนาแน่นของเซลล์แล้ว ยังเป็นการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการออกด้วย โดยอาศัยหลักการที่เซลล์บางชนิดมีการยึดเกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงได้ดีและเร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น

การทำซับคัลเจอร์ทำได้โดยการย่อยโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เซลล์ที่ถูกย่อยจะลอยตัวขึ้นจากพื้นของจานเพาะเลี้ยง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยสารยับยั้งทริพซิน (trypsin inhibitor) เปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์และใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ด้วยความ

เข้มข้นของเซลล์ประมาณ 100,000 เซลล์ใน 1 มิลลิลิตรของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เก็บจานเพาะเลี้ยงในตู้อบและปล่อยให้เซลล์มีการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงนาน 30 นาที จากนั้นดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ไม่ยึดเกาะใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่ เก็บจานเพาะเลี้ยงใหม่ในตู้อบและปล่อยให้เซลล์มีการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงนาน 30 นาที แล้วย้ายเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่อีกครั้ง เพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ในตู้อบ เปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกวัน น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ใช้ทั้ง 2 สูตร โดยเพาะเลี้ยงแยกเป็น 2 กลุ่มทดลอง และศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เซลล์ที่ผ่านการทำซับคัลเจอร์ครั้งหนึ่งแล้ว หากเซลล์ขึ้นหนาแน่นอีก ให้ทำซ้ำ การทำซับคัลเจอร์ซ้ำ ๆ นอกจากเป็นการทำให้เซลล์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอแล้ว ยังเป็นการกำจัดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อาจมีปะปนอยู่ เซลล์ที่ผ่านการทำซับคัลเจอร์แบบนี้ ตั้งแต่รุ่นที่ 3 ขึ้นไปในระยะแรกพบว่าส่วนใหญ่เป็นพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีการเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ได้อีกอย่างรวดเร็วและเข้ายึดครองพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์มากขึ้น รุกรานพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ออกไปจนหมด

ผลการวิจัย

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมา

จากการตรวจดูตัวอย่างชิ้นเนื้องอกด้วยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อมสีฮีมาท็อก-ไซลินและอีโอซิน พบว่าชิ้นเนื้องอกประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นกลุ่มเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่ผิดปกติ อันได้แก่โอดอนโทเจนนิกเอ็พพิธีเลียม (odontogenic epithelium) และส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อยึดต่อปกติ ส่วนที่เป็นโอดอนโทเจนนิกเอ็พพิธีเลียมประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายอมีโลบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยมเรียงตัวอยู่ที่ขอบนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอก (ลูกศรชี้ ในภาพที่ 1) และเซลล์ที่คล้ายสเต็ลเลทซึ่งเป็นเซลล์รูปดาวอยู่ภายในส่วนกลางของกลุ่มเซลล์เนื้องอก (เครื่องหมายดอกจันทน์ ในภาพที่ 1) รอบ ๆ กลุ่มเซลล์เนื้องอกพบเนื้อเยื่อยึดต่อ (C ในภาพที่ 1) ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และหลอดโลหิตขนาดเล็กอยู่กันอย่างหลวม ๆ ในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์ กลุ่มของโอดอนโทเจนนิกเอ็พพิธีเลียมมีการเรียงตัวเป็นวงขนาดต่าง ๆ กัน ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อยึดต่อ (ภาพที่ 1 ภาพบน) ส่วนเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดเพล็กซิฟอร์มพบว่ากลุ่มโอดอนโทเจนนิกเอ็พพิธีเลียมมีการเรียงตัวเป็นร่างแหและล้อมรอบเนื้อเยื่อยึดต่อไว้ภายใน (ภาพที่ 1 ภาพล่าง)

การศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ในการศึกษาด้วยวิธีนี้ กลุ่มควบคุมเป็นเนื้อเยื่อเหงือกปกติซึ่งมีเอ็พพิธีเลียลเซลล์ชนิดบุผิว (surface epithelial cells) และเนื้อเยื่อยึดต่อ กลุ่มควบคุมผลบวกเตรียมขึ้นจากการย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีต่อ CK HMW และ CK 19 พบว่ามีการติดสีของโปรทีนทั้งสองชนิดในเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนของเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่บุผิว (ep ในภาพที่ 2 ภาพบน-ซ้าย) ในขณะที่ไม่มีการติดสีในส่วนของเนื้อเยื่อยึดต่อ (C) (ผลการศึกษาในกลุ่มควบคุมผลบวกย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK HMW แสดงไว้ในภาพที่ 2 ภาพบน-ซ้าย ส่วนผลการศึกษาในกลุ่มควบคุมผลบวกย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK 19 ไม่ได้แสดงผลในรายงานนี้) กลุ่มควบคุมผลลบซึ่งเป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อเดียวกันกับกลุ่มควบคุมผลบวก แต่ไม่ได้รับการย้อมด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ ไม่มีการติดสีใด ๆ ทั้งสิ้น (ไม่ได้แสดงผลการศึกษาในรายงานนี้)

จากการศึกษาในตัวอย่างเนื้องอกพบว่าเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์มให้ผลการศึกษาเหมือนกัน ตัวอย่างเนื้องอกที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK HMW และ CK 19 พบว่าไซโตเคอราตินทั้งสองชนิดมีปรากฏเฉพาะในส่วนของเอ็พพิธีเลียลเซลล์ โดยติดสีจัดในบริเวณของเซลล์ที่คล้ายสเต็ลเลท (เครื่องหมายดอกจันทน์ ในภาพที่ 2 ภาพบน-ขวา และภาพล่าง-ซ้าย) ส่วนเซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์มีการติดสีน้อยกว่า (ลูกศรชี้ ในภาพที่ 2 ภาพบน-ขวา และภาพล่าง-ซ้าย) ไม่พบมีการติดสีในส่วนของเนื้อเยื่อยึดต่อ (C) จากการศึกษาตัวอย่างเนื้องอกที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเมนทิน พบว่าลักษณะการติดสีส่วนใหญ่อยู่ในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อยึดต่อ โดยมีการติดสีในส่วนที่เป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ของเนื้องอกเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 2 ภาพล่าง-ขวา) แอนติบอดีต่อเดสมินมีการทำปฏิกิริยากับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ล้อมรอบหลอดเลือดในเนื้อเยื่อยึดต่อโดยไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ชนิดอื่น แอนติบอดีต่อเอส-100 โปรทีนไม่พบว่ามีการทำปฏิกิริยาใด ๆ ในตัวอย่างเนื้องอกที่ทำการศึกษาเลย (ไม่ได้แสดงผลการศึกษาในรายงานนี้)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชัน

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียดของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น พบว่ากลุ่มเซลล์เนื้องอกประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือชนิดที่คล้ายอมีโลบลาสต์ซึ่งเรียงตัวอยู่ที่ขอบของกลุ่มเซลล์เนื้องอก (ภาพที่ 3 และภาพที่ 5) และชนิดที่คล้ายสเต็ลเลทเซลล์ซึ่งเรียงตัวอยู่ภายในต่อเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์ (ภาพที่ 4) โดยทั่วไปเซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายกันคือ มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (polyhedral) นิวเคลียส(nucleus) ของเซลล์มีขนาดใหญ่และรูปร่างค่อนข้างกลม บางครั้งพบรอยบุ๋ม (indentation) ของนิวเคลียร์เมมเบรน (nuclear membrane) โครมาติน (chromatin)

พบเป็นจุดเล็ก ๆ กระจายทั่ว ๆ ไป และมักพบนิวคลีโอลัส (nucleolus) เป็นจุดเดี่ยวขนาดใหญ่อยู่ในนิวเคลียส ในส่วนของไซโตพลาสซึ่ม (cytoplasm) จะพบไมโตคอนเดรีย (mitochondria) เอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคูลั่ม (endoplasmic reticulum) และกอลจิแอพพาราตัส (Golgi apparatus) ได้ในปริมาณไม่มากนัก นอกจากนี้ยังสามารถพบเดสโมโซม (desmosome) ที่รอยต่อระหว่างเซลล์ด้วย (ภาพที่ 3, 4 และ 5) ด้านนอกของเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์ที่ขอบของกลุ่มเซลล์เนื้องอกจะพบเบสเมนท์เมมเบรน (basement membrane) ซึ่งเป็นแถบของเมทริกซ์นอกเซลล์ที่กั้นอยู่ระหว่างกลุ่มเซลล์เนื้องอกกับเนื้อเยื่อยึดต่อ ชั้นลามินาเดนซา (lamina densa) ซึ่งเป็นแถบทึบอิเล็กตรอนของเบสเมนท์เมมเบรนนี้มีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้องอกที่พบในผู้ป่วย กล่าวคือชั้นลามินาเดนซาของอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์มีลักษณะเป็บแถบบาง ๆ ที่มีความหนาสม่ำเสมอ (ลูกศรชี้ ในภาพที่ 3) แต่ชั้นลามินาเดนซาของชนิดเพล็กซิฟอร์มเป็นแถบที่มีรูพรุนคล้ายร่างแห (ลูกศรชี้ ในภาพที่ 5)

การศึกษาด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้องอกในห้องปฏิบัติการในเวลาไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์ พบว่ามีเซลล์คืบคลานออกจากชิ้นเนื้องอกจำนวนมาก โดยเซลล์ที่คืบคลานออกมาในลำดับแรกและคืบคลานออกห่างจากชิ้นเนื้องอกมากกว่าเป็นเซลล์ที่มีรูปกระสวย (spindle shape cells) ซึ่งส่วนใหญ่น่าจะเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (F ในภาพที่ 6) ส่วนเซลล์ที่คืบคลานออกมาช้ากว่าและอยู่ใกล้ชิ้นเนื้องอกมากกว่าเป็นเซลล์รูปกลมหรือหลายเหลี่ยมซึ่งเป็นลักษณะภายนอกของพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ (E ในภาพที่ 6) เมื่อผ่านการทำซับคัลเจอร์หลาย ๆ ครั้งพบว่าเซลล์ที่ค่อย ๆ ถูกกำจัดออกไปคือไฟโบรบลาสต์ และเซลล์ส่วนใหญ่ที่ได้เป็นพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ สังเกตได้จากการที่เซลล์มีรูปกลมหรือหลายเหลี่ยมและการมีสะพานระหว่างเซลล์ (intercellular bridges) อันเป็นลักษณะเฉพาะของพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ด้วย (หัวลูกศร ในภาพที่ 7 ภาพล่าง)

จากการทดลองเปรียบเทียบใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 สูตรในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอก พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาสูตรที่ 1 ทำให้เกิดการเจริญอย่างมากมายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์เหล่านี้เจริญมาบดบังเอ็พพิธีเลียลเซลล์ ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่สามารถเติบโตได้มากในน้ำยาเพาะเลี้ยงสูตรที่ 2 จึงเปิดโอกาสให้เอ็พพิธิเลียลเซลล์เจริญเติบโตได้ เซลล์ที่ผ่านการทำซับคัลเจอร์จนได้เป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์แล้ว เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่หลงเหลืออยู่จะมีการปรับตัวและเจริญขึ้นใหม่ได้ในจานเพาะเลี้ยง จนปกคลุมและแทนที่เอ็พพิธีเลียลเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเดียวกันได้ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาซึ่งเป็นพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์จึงทำได้ยาก

การอภิปรายผล

ในงานวิจัยเกี่ยวกับเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาตั้งแต่อดีตจนถึงในปัจจุบัน นักวิจัยได้พยายามศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติและลักษณะของเซลล์เนื้องอกโดยวิธีการทางอิมมูโนโลยีและทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และหาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะของเซลล์และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อเซลล์ อิมมูโนฮิสโต-เคมีเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ทุกชนิดทั้งในสภาพปกติหรือมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพ โดยการใช้แอนติบอดีที่เฉพาะต่อโปรทีนที่เซลล์สร้างขึ้นและคาดว่ามีความสำคัญต่อพฤติกรรมของเซลล์เป็นตัวบ่งชี้ โปรทีนที่ได้รับความสนใจอย่างมากในพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์คือเคอราติน ในธรรมชาติเคอราตินเป็นโปรทีนที่ไม่ละลายน้ำและอยู่ในลักษณะที่เป็นเส้นใยขนาดกลาง (intermediate filament หรือ tonofilament) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 นาโนเมตร แบ่งออกเป็นชนิดย่อย 19 ชนิด โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 40-70 กิโลดาลตัน เคอราตินแต่ละชนิดย่อยพบได้ในเอ็พพิธีเลียลเซลล์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ กัน และพบในพัฒนาการและการเปลี่ยนสภาพไปทำหน้าที่เฉพาะของเอ็พพิธีเลียลเซลล์ในระยะต่าง ๆ กันด้วย[21] ดังนั้นการศึกษาถึงการปรากฏของเคอราตินแต่ละชนิดย่อยอาจมีส่วนช่วยในการศึกษาถึงจุดกำเนิด การเปลี่ยนสภาพ และพฤติกรรมของเซลล์เนื้องอกได้

จากการศึกษาด้วยการย้อมเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์มจากผู้ป่วยในรายงานนี้ พบว่าเซลล์เนื้องอกทั้งชนิดคล้ายอมีโลบลาสต์และชนิดคล้ายสเต็ลเลทมีการสร้างโปรทีน CK HMW , CK 19 และไวเมนตินภายในเซลล์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับที่มีรายงานการพบโปรทีนทั้งสามชนิดโดย De Wilde และคณะ[12] ในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดแกรนูลาร์เซลล์ Heikinheimo และคณะ [22] ที่ศึกษาในเนื้องอกอมีโลบลาส-โตมาชนิดอะแคนโธมาตัส และ Thesleff & Ekblom[17] ซึ่งทำการศึกษาในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และเพล็กซิฟอร์มและรายงานถึงการพบเคอราตินในเอ็พพิธีเลียลเซลล์โดยมิได้ศึกษาถึงไวเมนทิน Siar & Ng [15] ทำการศึกษาในอมีโลบลาสโตมาชนิดเดสโมพลาสติก พบว่าเอ็พพิธีเลียลเซลล์ของเนื้องอกมีการติดสีของเคอราติน แต่ไม่พบการสร้างสารไวเมนทินเลยทั้งในเอ็พพิธีเลียลเซลล์และเซลล์รูปกระสวยของอมีโลบลาสโตมา นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนที่เป็นเอ็พพิ-ธีเลียลเซลล์ของอมีโลบลาสโตมาชนิดนี้มีการสร้างเอส-100 โปรทีนและเดสมินภายในเซลล์อีกด้วย ในขณะที่ไม่มีการพบโปรทีนสองชนิดหลังนี้ในพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ของเนื้องอกในการศึกษานี้หรือการศึกษาอื่น จากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดต่าง ๆ แม้มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ชนิดเดียวกัน แต่เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้องอกทำให้คุณสมบัติ

ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ตั้งต้นในแนวทางที่แตกต่างกัน คุณสมบัติที่แตกต่างกันนี้อาจมีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเนื้องอกแต่ละชนิดได้

จากการศึกษาชนิดย่อยของเคอราตินในเอ็พพิธีเลียลเซลล์พบว่าไซโตเคอราตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น CK 19 พบได้ในเอ็พพิธีเลียมที่เป็นเซลล์ชั้นเดียว (simple epithelium) และเซลล์หลายชั้นที่ไม่มีการหลุดลอกของเซลล์ชั้นบนสุด (non-keratinized stratified epithelium) ส่วนไซโตเคอราตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากพบได้ในเซลล์ของเอ็พพิธีเลียมบุผิวที่มีการเปลี่ยนสภาพไปเป็นสความัสเซลล์และ สความัสเอ็พพิธีเลียมที่มีหลายชั้น (stratified squamous epithelium) [13,21,23,24] เมื่อเปรียบเทียบชนิดของเคอราตินกับเซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์และเซลล์ที่คล้ายสเต็ลเลทในการศึกษานี้ซึ่งมีการสร้างเคอราตินทั้งชนิด CK HMW และ CK 19 น่าจะมีความหมายว่าเซลล์เนื้องอกทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มที่เป็นเอ็พพิธีเลียมที่มีหลายชั้น

จากการศึกษาลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์มของผู้ป่วย พบว่าลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเนื้องอกทั้งสองคล้ายกัน มีการเรียงตัวของเซลล์เนื้องอกทั้งชนิดเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์และเซลล์คล้ายสเต็ลเลทสอดคล้องไปกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอก เซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์เป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยมเรียงตัวค่อนข้างขนานกันอยู่ที่ขอบของกลุ่มเนื้องอกและเซลล์คล้ายสเต็ลเลทซึ่งเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยมที่มีส่วนยื่นรอบๆ เซลล์และเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ อยู่ภายในกลุ่มเซลล์เนื้องอกถัดไปจากเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์ โครงสร้างภายในของเซลล์ทั้งสองชนิดคล้ายกับที่มีรายงานมาก่อน [19,25] เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์คล้ายสเต็ลเลทกับเอ็พพิธีเลียลชนิดอื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงอย่างมากกับเซลล์ในชั้นสตราตัมสไปโนซัม (stratum spinosum) ของพวกสตราติฟายด์สความัสเอ็พพิธีเลียมในเยื่อบุช่องปาก[26] จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดหรืออาจมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ชนิดเดียวกันก็ได้

ที่ด้านนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอกพบเบสเมนท์เมมเบรนซึ่งเป็นแถบของเมทริกซ์นอกเซลล์อยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อยึดต่อ ดังได้กล่าวในผลการวิจัยแล้วว่าเบสเมนท์เมมเบรนที่พบในอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์มีชั้นลามินาเดนซาเป็นแถบบางที่มีความหนาสม่ำเสมอ แตกต่างไปจากเบสเมนท์เมมเบรนที่พบในเนื้องอกชนิดเพล็กซิฟอร์มซึ่งเป็นรูพรุน การศึกษาถึงเมทริกซ์นอกเซลล์ในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมามีไม่มากนัก แม้ว่าจะมีการกล่าวถึงการพบเบสเมนท์เมมเบรนหรือลามินินที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเบสเมนท์เมมเบรนก็ตาม แต่การศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นในลักษณะที่ศึกษาด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตโลยีร่วมไปกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง [17,27] Farman และคณะ[28] รายงานการพบเบสเมนท์เมมเบรนในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์จากผู้ป่วย 7 ราย ซึ่งในทุกรายมีชั้นลามินาเดนซาของเบสเมนท์เมมเบรนเป็นแบบแถบสม่ำเสมอที่มีความหนาต่าง ๆ กัน ซึ่งลักษณะที่รายงานโดย Farman และคณะ ตรงกับที่พบ

ในเนื้องอกชนิดฟอลลิคูลาร์ในการศึกษานี้ แต่ลักษณะเป็นแถบที่มีรูพรุนของเบสเมนท์เมมเบรนในเนื้องอกชนิดเพล็กซิฟอร์มยังไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน ซึ่งลักษณะของเบสเมนท์เมมเบรนที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเนื้องอกอาจมีส่วนสัมพันธ์กับพฤติกรรมการแทรกแซงเนื้อเยื่อใกล้เคียงโดยเซลล์เนื้องอกได้

สำหรับการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์อมีโลบลาสโตมาด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้องอกในจานเพาะเลี้ยงและใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดอีเกิลมินิมัมเอสเซลเชียลมีเดียม[16,18] (Eagle Minimum Essential Medium) การเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกในคอลลาเจนเมทริกซ์[19,20] การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเหล่านี้พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้เป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยมที่มีสะพานระหว่างเซลล์ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในคอลลาเจนเมทริกซ์มีการเรียงตัวเป็นวงกลมคล้ายท่อ (duct) แต่ไม่ว่าจะใช้วิธีการใดก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานออกไปหรือผ่านการทำซับคัลเจอร์หลายครั้ง เซลล์ที่ได้มักเป็นเซลล์รูปกระสวยของพวกไฟโบรบลาสต์ ในการศึกษานี้ได้ทดลองทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ DMEM และ K-SFM เพื่อศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้และหาวิธีการดำรงคุณสมบัติของเซลล์เนื้องอกที่เพาะเลี้ยงไว้ได้เป็นเวลานาน ผลการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงทั้งสองวิธีสามารถเพาะเลี้ยงได้เซลล์เนื้องอกชนิดเอ็พพิธีเลียม แต่ในการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา DMEM เซลล์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งเจริญเติบโตและบดบังเอ็พพิธีเลียลเซลล์ไปในเวลาอันรวดเร็ว จึงไม่เหมาะกับการใช้เพาะเลี้ยงพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา K-SFM ซึ่งเป็นน้ำยาที่ผลิตขึ้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเอ็พพิธีเลียลเซลล์โดยเฉพาะ สามารถเพาะเลี้ยงได้เอ็พพิธีเลียลเซลล์จากชิ้นเนื้องอกและทำซับคัลเจอร์ให้ได้เซลล์ส่วนใหญ่เป็นพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ด้วย เห็นได้จากการมีรูปร่างหลายเหลี่ยมและการมีสะพานระหว่างเซลล์ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเอ็พพิธีเลียลเซลล์ แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาชนิดนี้สามารถคงอยู่ได้ในระยะสั้น และมีการแทนที่ของเอ็พพิธีเลียลเซลล์ด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เช่นเดียวกับที่มีรายงานมาก่อน ทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในรายละเอียด ดังนั้นจึงต้องพัฒนาวิธีการเพื่อให้ได้แบบจำลองสำหรับการศึกษาที่เหมาะสมในการวิจัยต่อไป อุปสรรคของการเพาะเลี้ยงเซลล์อมีโลบลาสโตมาที่สำคัญคือ ปริมาณของเซลล์อมีโลบลาสต์โตมาในชิ้นเนื้องอกและความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอกของเซลล์ ชิ้นเนื้องอกที่มีเซลล์อมีโลบลาสโตมาน้อย-เนื้อเยื่อยึดต่อมาก จะทำให้มีการเจริญของไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อยึดต่อมากกว่าเอ็พพิธีเลียลเซลล์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องมีการตัดตัวอย่างเนื้องอกและตรวจดูปริมาณของเซลล์เนื้องอกด้วยเครื่องตัดเนื้อแช่แข็งเพื่อเลือกตัวอย่างเนื้องอกที่มีเอ็พพิธีเลียลเซลล์เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยง ในส่วนที่เกี่ยวกับความความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอกของเซลล์อมีโลบลาสโตมานั้น โดยทั่วไปแล้วเซลล์มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับ

สิ่งแวดล้อมหรืออดทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ การปรับตัวของเซลล์นี้รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่มีความต้านทานสูงกว่า (metaplasia) พบได้บ่อยในพวกเอ็พพิธีเลียลเซลล์ [29,30] ในเนื้องอกอมีโลบลาสโตมา เซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์อมีโลบลาสต์ซึ่งจัดเป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ชนิดพิเศษ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมจากในร่างกายคนมาอยู่ในจานเพาะเลี้ยงซึ่งมีระบบการหล่อเลี้ยงชีวิตของเซลล์แตกต่างกัน มีผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้ จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเนื้องอกหลายครั้งในงานวิจัยนี้และงานวิจัยอื่น พบว่าเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแม้จะมีรูปร่างกลมหรือหลายเหลี่ยมและมีการสร้างสะพานระหว่างเซลล์ แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้แน่ชัดว่าเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์อมีโลบลาสต์หรือเอ็พพิธีเลียลเซลล์ชนิดอื่น เช่น สความัสเซลล์ ซึ่งเป็นเอ็พพิธีเลียลเซลล์ที่มีความแข็งแรงทนทานสูง และมีลักษณะโครงสร้างของเซลล์คล้ายกัน

สรุปผล

การศึกษาโดยวิธีการทั้งสามวิธีที่กล่าวมานั้น สรุปได้ว่าเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาทั้งชนิดฟอลลิคูลาร์และชนิดเพล็กซิฟอร์มในผู้ป่วยชาวไทยมีคุณสมบัติในการสร้างโปรตีนและลักษณะโครงสร้างภายในโดยละเอียดของเซลล์เนื้องอกเหมือนกันกับเนื้องอกที่พบในเชื้อชาติอื่น แต่มีการพบลักษณะของเบสเมนท์เมมเบรนที่แตกต่างไปจากที่เคยมีรายงานการศึกษาไว้ จากอัตราการเกิดเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาในประชากรไทยสูงกว่าในเชื้อชาติอื่นถึง 6 เท่าน่าจะเป็นสิ่งสะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติของเซลล์ที่แตกต่างออกไป ซึ่งในการศึกษานี้ยังครอบคลุมไม่ถึงและเป็นสิ่งที่สมควรดำเนินการวิจัยต่อให้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกในห้องปฏิบัติการพบว่าวิธีการที่ใช้ศึกษานี้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกได้ แต่เซลล์เนื้องอกดำรงอยู่ได้เพียงระยะสั้นและถูกบดบังด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเวลาต่อมา ทำให้ไม่สามารถพิสูจน์ว่าเซลล์เหล่านี้ยังคงคุณสมบัติของการเป็นอมีโลบลาสต์หรือไม่ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการจำกัดการเจริญของเซลล์ไฟโบร-บลาสต์ และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่เพาะได้ในการวิจัยขั้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Reichart PA, Ries P. Considerations on the classification of odontogenic tumours. Int J Oral Surg 1983;12:323-33.
2. Brand RW, Isselhard DE. Enamel, dentin, and pulp. In: Anatomy of orofacial structures. 4th edition. St. Louis: CV Mosby, 1990:55-70.
3. Becker J, Schuppan D, Philipsen HP, Reichart PA. Ectomesenchyme of ameloblastic fibroma reveals a characteristic distribution of extracellular matrix proteins. J Oral Pathol Med 1992;21:156-9.
4. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Ameloblastoma. In: A text book of oral pathology. 4th edition. Pennsylvania: WB Saunders, 1983:276-85.
5. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Ameloblastoma. In: Oral & maxillofacial pathology. Pennsylvania: WB Saunders, 1995:512-22 .
6. Mehlisch DR, Dahlin DC, Masson JK. Ameloblastoma: A clinicopathologic report. J Oral Surg 1972;30:9-22.
7. Sirichitra V, Dhiravarangkura P. Intrabony ameloblastoma of the jaws. An analysis of 147 Thai patients. Int J Oral Surg 1984;13:187-93.
8. Waldron CA, El-Mofty SK. A histopathologic study of 116 ameloblastomas with special reference to the desmoplastic variant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987;63:441-51.
9. Regezi JA, Sciubba J. Ameloblastoma. In: Oral pathology. Clinico-pathologic correlations. 2nd edition. Pennsylvania: WB Saunders, 1993:363-74.
10. Ueno S, Nagamura S, Mushimoto K, Shirasu R. A clinicopathologic study of ameloblastoma. J Oral Maxillofac Surg 1986;44:361-5.
11. Ueno S, Mushimoto K, Shirasu R. Prognostic evaluation of ameloblastoma based on histologic and radiographic typing. J Oral Maxillofac Surg 1989;47:11-5.
12. De Wilde PCM, Slootweg PJ, Müller H, Kant A, Moesker O, Vooijs P, Ramaekers FCS Immunocytochemical demonstration of intermediate filaments in a granular cell ameloblastoma. J Oral Pathol 1984;13:29-39.
13. Matsuo A, Ueno S. Immunohistochemical demonstration of keratin in ameloblastoma as an indication of tumor differentiation. J Oral Maxillofac Surg 49;282-8.

14. Ong'uti MN, Cruchley AT, Howells GL, Williams DM. Ki-67 antigen in ameloblastomas: Correlation with clinical and histological parameters in 54 cases from Kenya. Int J Oral Maxillofac Surg 1997;26:376-9.
15. Siar CH, Ng KH. Patterns of expression of intermediate filaments and S-100 protein in desmoplastic ameloblastoma. J Nihon Univ Sch Dent 1993;35:104-8.
16. Tanaka N, Hsieh KJ, Sato T, Shioda S. Electron microscopic studies of primary culture cells from ameloblastoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988;66:341-4.
17. Thesleff I, Ekblom P. Distribution of keratin and laminin in ameloblastoma. Comparison with developing tooth and epidermoid carcinoma. J Oral Pathol 1984;13:85-96.
18. Stenman G, Lilja J, Sagne S. Human ameloblastomas *in vitro*: Light microscopical and ultrastructural observations. Br J Oral Maxillofac Surg 1985;23:326-32.
19. Yasuda K, Nakanishi A, Satomura K, Nagayama M, Hayashi Y. The behavior of human ameloblastoma tissue in collagen matrix in vitro: An immunohistochemical study. J Oral Pathol Med 1991;20:187-90.
20. Yasuda K, Satomura K, Nagayama M. Behavior of human ameloblastoma cells in collagen matrix in vitro: An ultrastructural study. J Oral Pathol Med 1991;20:438-42.
21. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang J-W, Woodcock-Mitchell J, Sun T-T. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. Cell 1982;30:361-72.
22. Heikinheimo K, Hormia M, Stenman G, Virtanen I, Happonen R-P. Patterns of expression of intermediate filaments in ameloblastoma and human fetal tooth germ. J Oral Pathol Med 1989;18:264-73.
23. Gown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal human tissues. Am J Pathol 1984;114:309-21.
24. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982;31:11-24.
25. Kim SK, Nasjleti CE, Weatherbee L. Fine structure of cell types in an ameloblastoma. J Oral Pathol 1979;8:319-32.

26. Rhodin JA. Epithelia. In: An atlas of histology. New York: Oxford University Press, 1975:37-43.

27. Nadimi H, Toto PD. Product identification of ameloblastomas: An immunohistochemical study. J Oral Pathol 1986;15:439-44.

28. Farman AG, Gould AR, Merrell E. Epithelium-connective tissue junction in follicular ameloblastoma and ameloblastic fibroma: An ultrastructural analysis. Int J Oral Maxillofac Surg 1986;15:176-86.

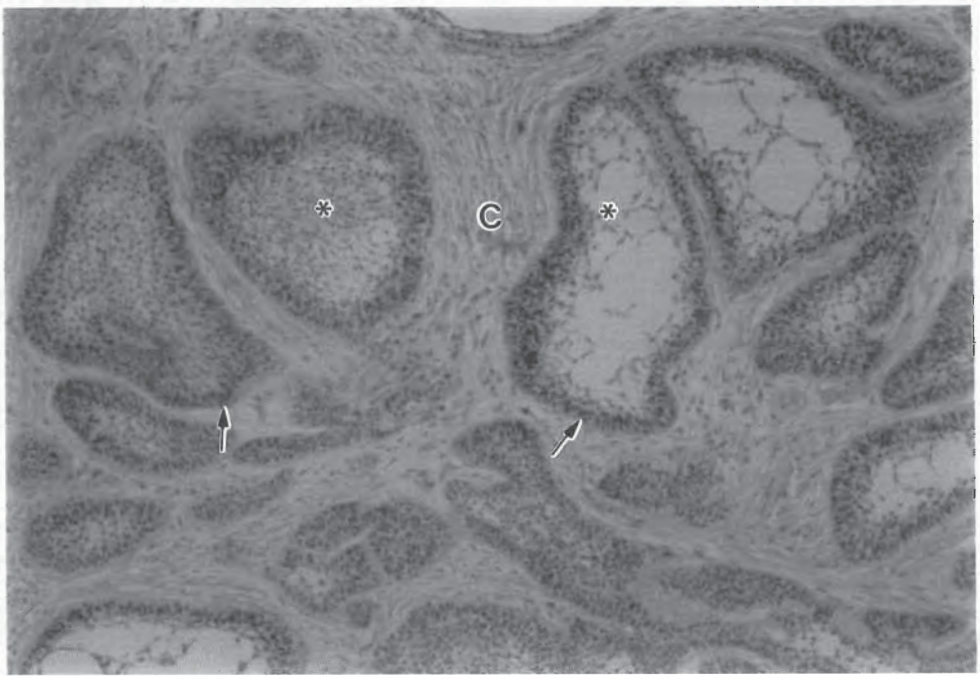
29. Junqueir LC, Carneiro J, Long JA. Metaplasia. In: Basic histology. 5th edition. California: Lange Medical Publications, 1983:79.

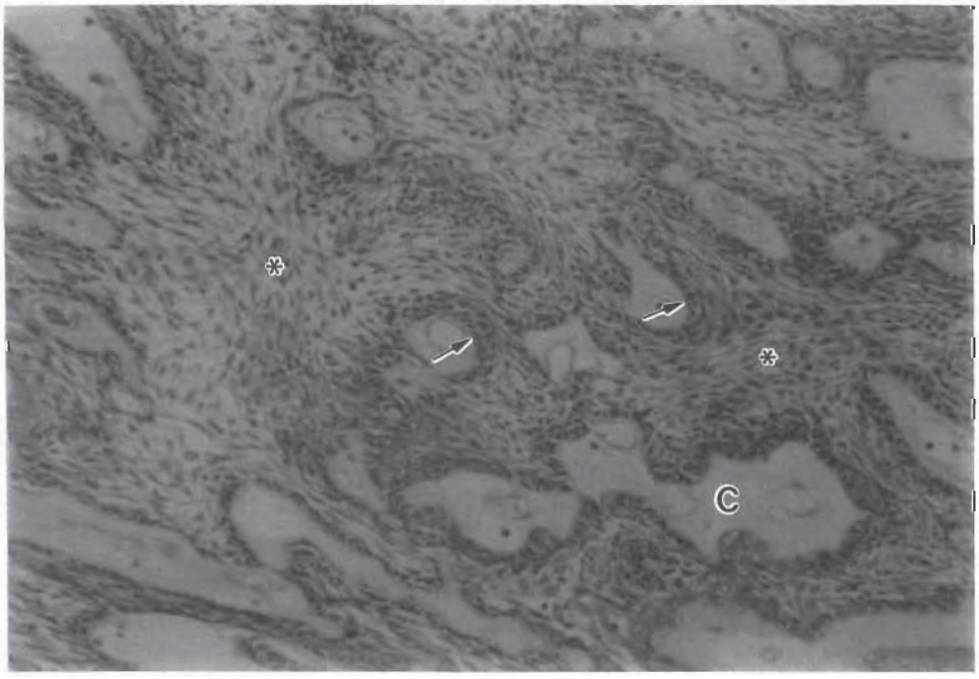
30. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Metaplasia. In: Pathologic basis of disease. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders, 1994:48-9.

ภาพที่ 1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสง แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาจากผู้ป่วย

ภาพบน แสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกชนิดฟอลลิคูลาร์
ภาพล่าง แสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกชนิดเพล็กซิฟอร์ม

เซลล์เนื้องอกประกอบไปด้วยเซลล์เอ็พพิธิเลียมสองชนิดคือเซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์ (ลูกศรชี้) ซึ่งเป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยมและมีนิวเคลียสเบนออกจากฐานด้านนอกของเซลล์ เซลล์ชนิดนี้เรียงตัวขนานกันที่ขอบด้านนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอก เซลล์อีกชนิดหนึ่งคือเซลล์รูปดาว ซึ่งมีลักษณะคล้ายสเต็ลเลทเซลล์ของหน่อฟัน เซลล์ชนิดหลังนี้เรียงตัวกระจัดกระจายอยู่ด้านในของเซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์ (เครื่องหมายดอกจันทน์) ด้านนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอกเป็นเนื้อเยื่อยึดต่อที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจน หลอดโลหิตขนาดเล็ก และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เรียงตัวอยู่อย่างหลวม ๆ (C)
(ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน; กำลังขยาย 176 เท่า)


C


C

ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ระบบใช้แสงแสดงลักษณะการติดสีของเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาจากผู้ป่วย เมื่อย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ภาพบน-ซ้าย เนื้อเยื่อเหงือกที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK HMW ซึ่งใช้เป็นเนื้อเยื่อกลุ่มควบคุมผลบวก

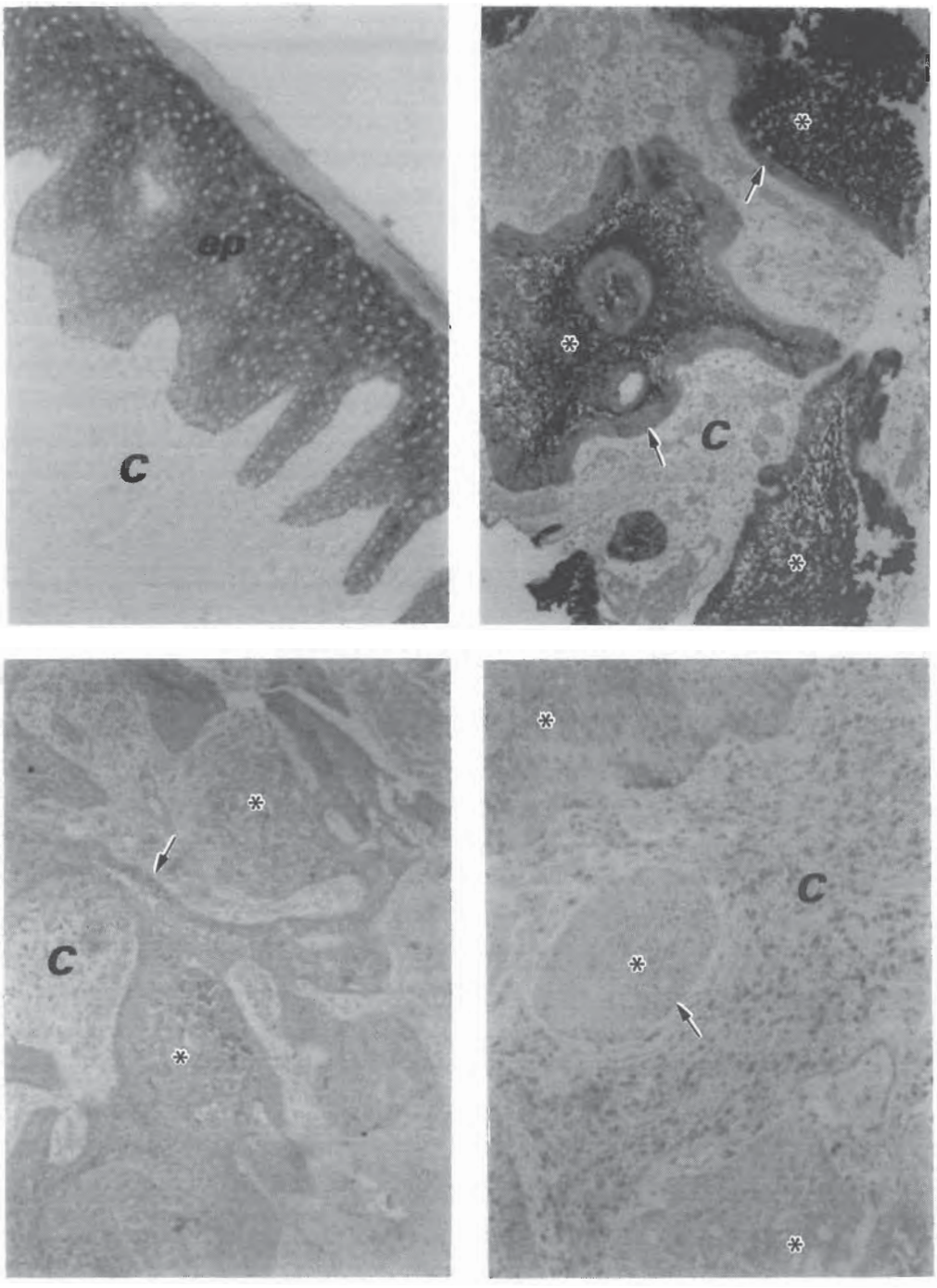
ภาพบน-ขวา เนื้องอกจากผู้ป่วยที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK HMW

ภาพล่าง-ซ้าย เนื้องอกจากผู้ป่วยที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ CK 19

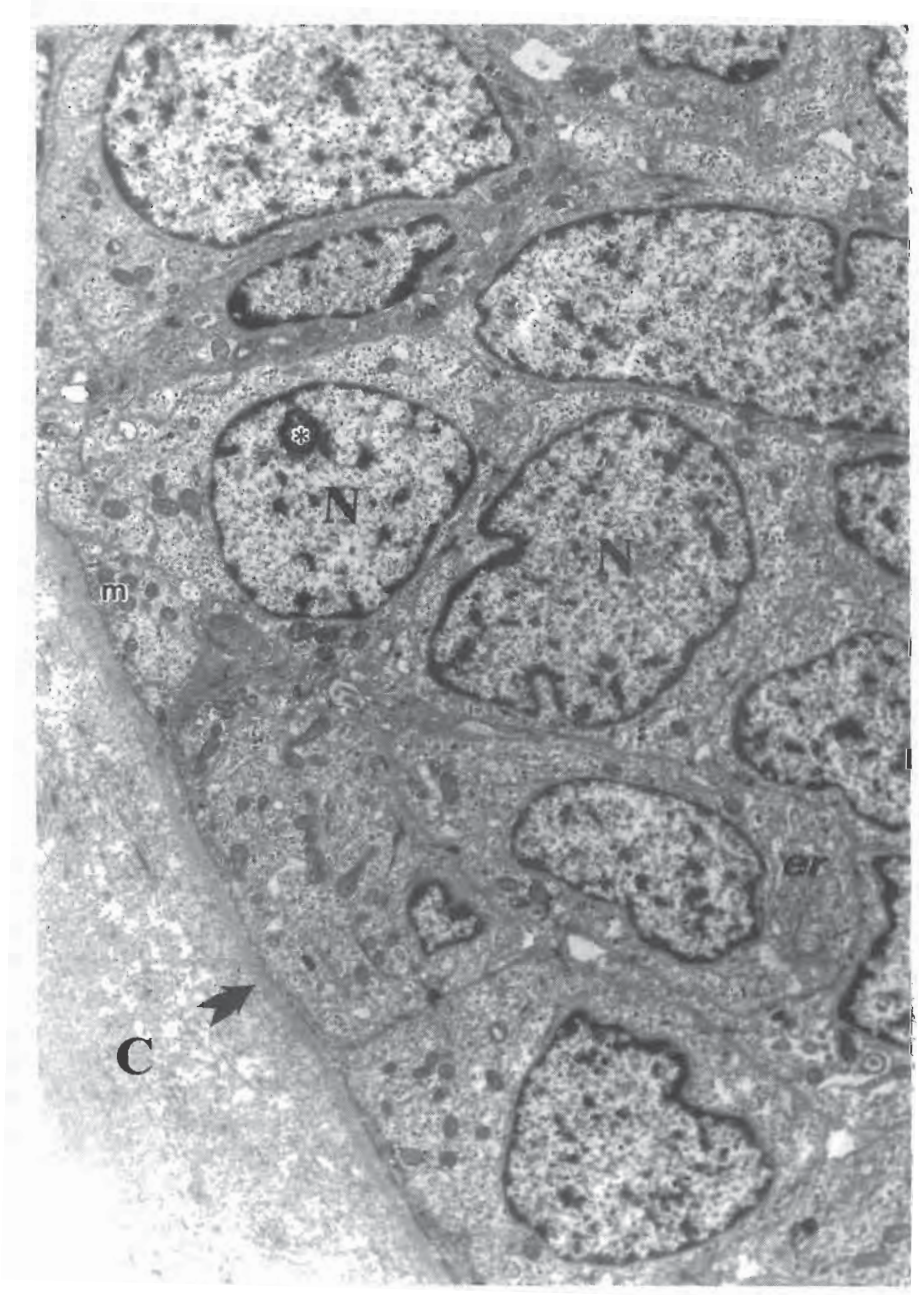
ภาพล่าง-ขวา เนื้องอกจากผู้ป่วยที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวเมนทิน

ในกลุ่มควบคุมผลบวกแสดงลักษณะการติดสีจากปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลที่เอ็พพิธีเลียลเซลล์ (ep) แต่ไม่มีการติดสีในส่วนของเนื้อเยื่อยึดต่อ (C)

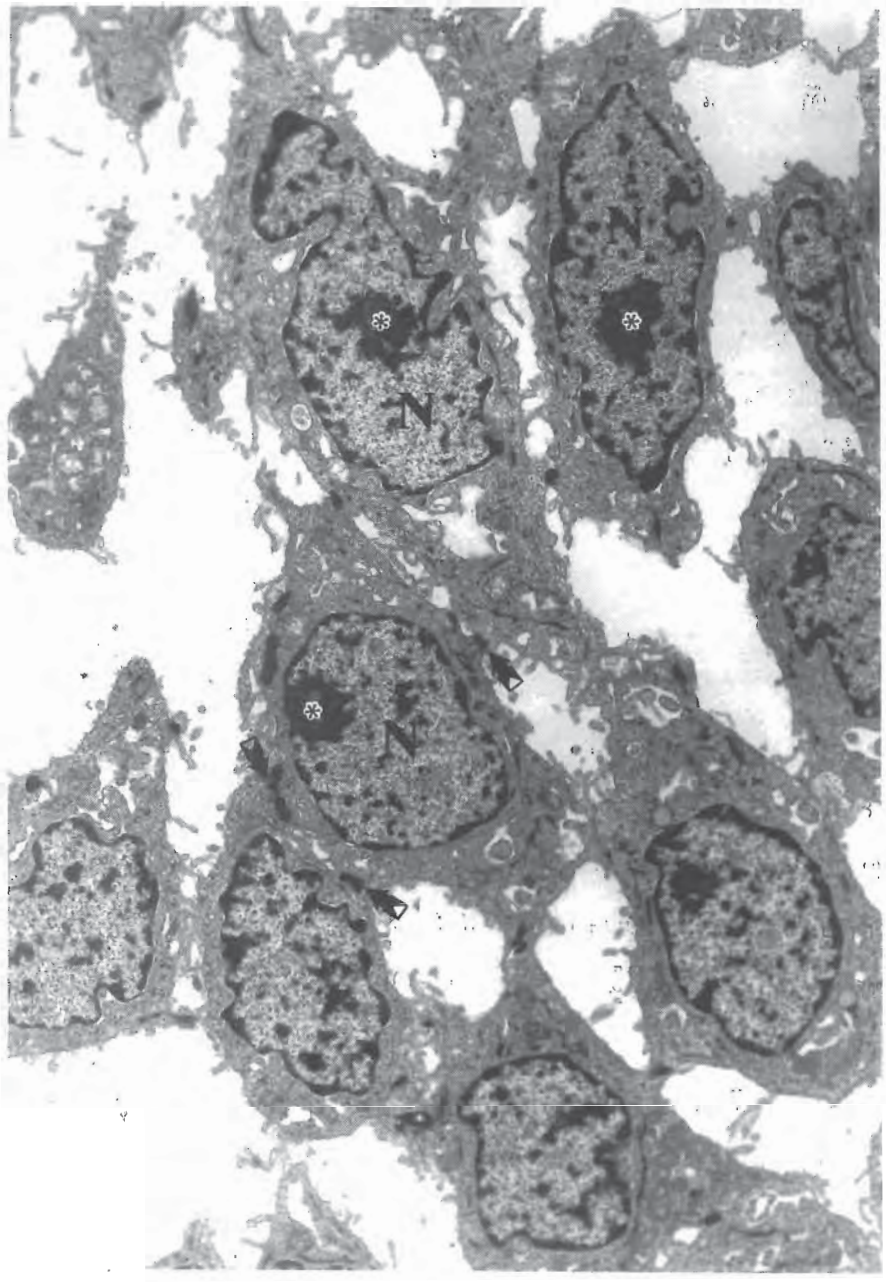
ในกลุ่มทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อ CK HMW และ CK 19 มีการติดสีเฉพาะในส่วนที่เป็นเซลล์เนื้องอกทั้งสองชนิด โดยลักษณะการติดสีที่เซลล์รูปดาว (เครื่องหมายดอกจันทน์) มีมากกว่าเซลล์ที่คล้ายอมีโลบลาสต์ (ลูกศรชี้) ส่วนแอนติบอดีต่อไวเมนทินมีการติดสีทั่วไปในเนื้อเยื่อยึดต่อ และติดสีเล็กน้อยในส่วนที่เป็นกลุ่มเซลล์เนื้องอก (กำลังขยาย 125 เท่า)


ep
C
C
C
C

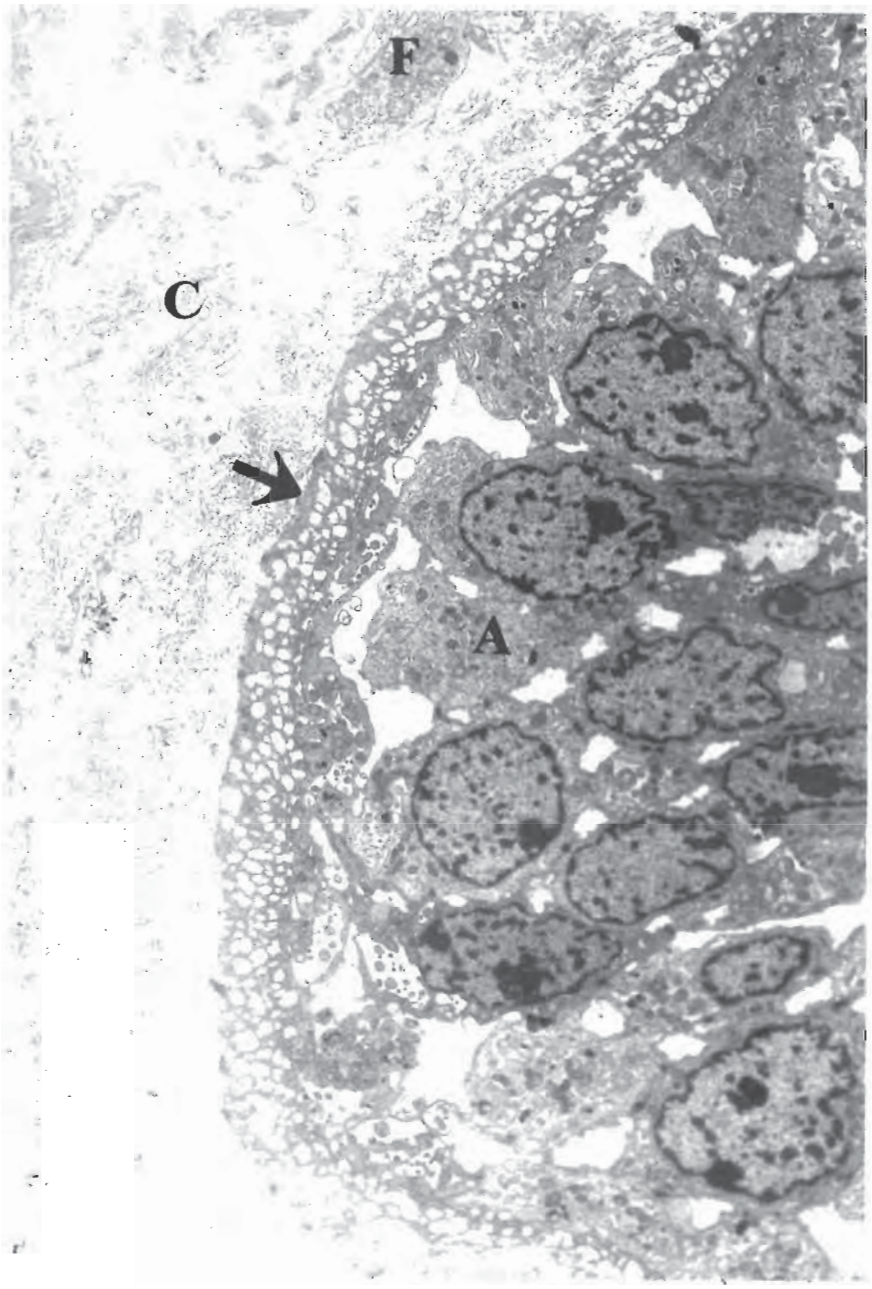
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นแสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์จากผู้ป่วย เซลล์ที่ขอบนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอกเป็นเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์ที่เรียงตัวอยู่ชิดกัน เซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมหรือหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (N) โครมาตินจับกันเป็นจุดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปในนิวเคลียส บางครั้งจะพบนิวคลีโอลัสเป็นจุดทึบอิเล็กตรอนขนาดใหญ่อยู่เดี่ยว ๆ (เครื่องหมายดอกจันทน์) ในไซโตพลาสซึ่มของเซลล์จะพบไมโตคอนเดรีย (m) และเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคูลั่ม (er) กระจายอยู่ทั่วไป ที่ขอบนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอกพบเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เป็นแถบบาง (ลูกศรชี้) ความหนาสม่ำเสมอและไม่มีรูพรุนอยู่ล้อมรอบ ถัดจากแถบของเมทริกซ์นอกเซลล์ออกไปเป็นเนื้อเยื่อยึดต่อที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมากมาย (C)
(กำลังขยาย 6,600 เท่า)


N
N
m
er
C

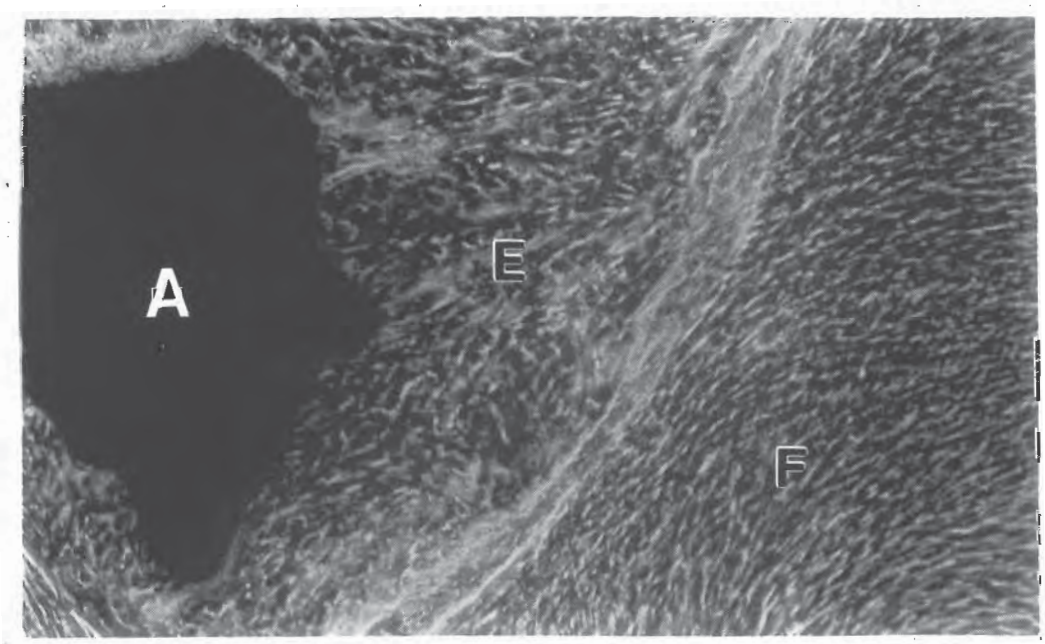
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่นแสดงลักษณะของเซลล์คล้ายสเต็ลเลทจากเนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดฟอลลิคูลาร์ในผู้ป่วยเดียวกันกับภาพที่ 3 เซลล์คล้ายสเต็ลเลทมีลักษณะเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยมเรียงตัวอยู่กันอย่างหลวม ๆ มีส่วนยื่นของเซลล์ที่ใกล้กันมาประสานกัน เซลล์เหล่านี้มีนิวเคลียส (N) ขนาดใหญ่ มีโครมาตินเป็นจุดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป บางครั้งพบนิวคลีโอลัสเป็นจุดใหญ่เดี่ยว ๆ อยู่ในนิวเคลียส (เครื่องหมายดอกจันทน์) นอกจากนี้ยังพบเดสโมโซม (ลูกศรชี้) ที่ผิวเซลล์ด้านในของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกันหรือที่ส่วนยื่นของเซลล์ที่มาชิดกัน
(กำลังขยาย 6,600 เท่า)


N
N
N

ภาพที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดทรานสมิชชั่น แสดงลักษณะของเซลล์เนื้องอกอมีโลบลาสโตมาชนิดเพล็กซิฟอร์มจากผู้ป่วย เซลล์ที่ขอบนอกของกลุ่มเซลล์เนื้องอกเป็นเซลล์คล้ายอมีโลบลาสต์ (A) ซึ่งมีลักษณะของเซลล์คล้ายกับที่พบในชนิดฟอลลิคูลาร์ เซลล์เหล่านี้มีการเรียงตัวอย่างหลวม ๆ และถูกล้อมรอบด้วยเมทริกซ์นอกเซลล์ที่สานเป็นร่างแห (ลูกศรชี้) อีกด้านหนึ่งของร่างแหนี้เป็นเนื้อเยื่อยึดต่อที่ประกอบไปด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (F) และเส้นใยคอลลาเจน (C) จำนวนมากมาย
(กำลังขยาย 4,400 เท่า)


F
C
A

ภาพที่ 6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแสดงลักษณะของเซลล์ที่คืบคลานออกจากชิ้นเนื้องอกที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้สังเกตเซลล์ที่คืบคลานออกมาประกอบด้วยเซลล์มากกว่าหนึ่งชนิด โดยในระยะแรกเซลล์ที่เคลื่อนตัวออกมาก่อนแล้วเคลื่อนออกไปไกลจากชิ้นเนื้องอก (A) มีลักษณะเป็นเซลล์รูปกระสวย (F) ในขณะที่เซลล์ที่เคลื่อนตัวออกมาทีหลังและอยู่ใกล้ชิ้นเนื้องอกมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม (E)
(กำลังขยาย 75 เท่า)


A
E
F

ภาพที่ 7 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแสดงลักษณะของเซลล์รุ่นที่ 3 ของการทำซับคัลเจอร์ เซลล์ที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยม ที่ช่องว่างระหว่างเซลล์จะพบส่วนยื่นเล็ก ๆ ของเซลล์ยึดระหว่างเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน (หัวลูกศรชี้ในภาพล่าง)
(ภาพบน กำลังขยาย 75 เท่า)
(ภาพล่าง กำลังขยาย 375 เท่า)