

การใช้สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตั้งต้นจากมนุษย์



นายประสาร ขจรวัตินเดช

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

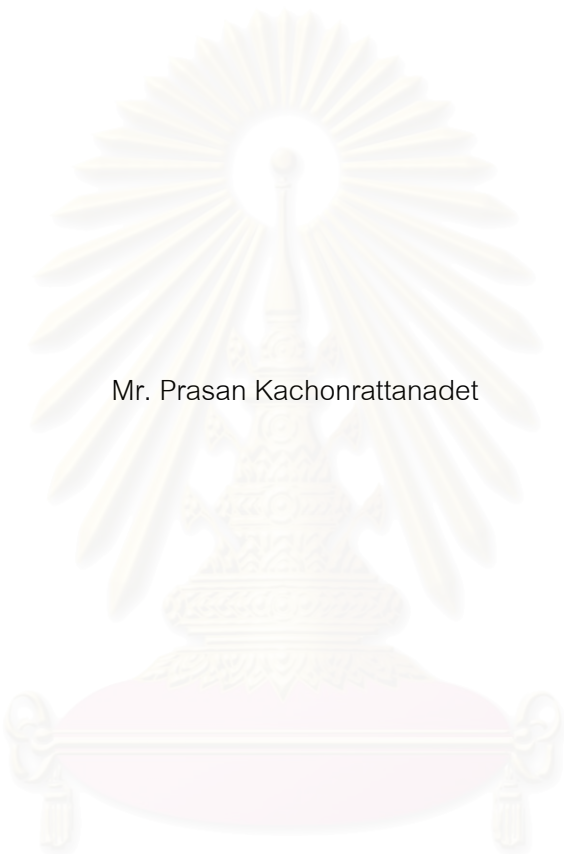
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1035-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE USE OF ANTIANGIOGENESIS AGENT IN A HUMAN-HEPATOCELLULAR-CARCINOMA  
IMPLANTED NUDE MICE MODEL



Mr. Prasan Kachonrattanadet

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-1035-8



ประสาร ขจรรัตนเดช : การใช้สารยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งระดับจากมนุษย์ (THE USE OF ANTIANGIOGENESIS AGENT IN A HUMAN-HEPATOCELLULAR-CARCINOMA IMPLANTED NUDE MICE MODEL) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. นรินทร์ วารุณี, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ; 72 หน้า. ISBN 974-13-1035-8.

วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบการใช้สารยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในการรักษามะเร็งตับในหนูทดลอง ซึ่งได้รับการปลูกเนื้อเยื่อมะเร็งระดับที่เพาะเลี้ยงขึ้นจากสายพันธุ์ของเซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ โดยการตรวจวัดปริมาณการสร้างเส้นเลือดใหม่ต่อหน่วยพื้นที่ในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็งด้วยวิธี intravital fluorescent microscopy และการตรวจนับจำนวนหย่อม (colony) ของเซลล์มะเร็งต่อหน่วยพื้นที่

วิธีดำเนินการ นำเซลล์สายพันธุ์มะเร็งระดับจากมนุษย์ที่มีชื่อว่าสายพันธุ์ HEP G2 มาเพาะเลี้ยงในสารเพาะเลี้ยงจนได้ปริมาณมาก แล้วนำไปปลูกใน dorsal skin chamber บนผิวหนังของหนูทดลอง (nude mice) อายุ 7 สัปดาห์ ตัวละ 120,000 เซลล์ แล้วแบ่งเป็นกลุ่มทดลองและกลุ่มเปรียบเทียบ หนูในกลุ่มทดลองจะได้รับการป้อนสารยับยั้งการสร้างเส้นเลือดกลุ่มละ 4 ตัว โดยมีจำนวนของหนูเพศผู้และเพศเมียเท่ากัน ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายในน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยขนาดยา 0.1 มิลลิกรัม วันละ 2 ครั้ง ทุกตัว หนูในกลุ่มเปรียบเทียบจะได้รับการป้อนน้ำบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการในปริมาณเท่าเทียมกัน ทั้งนี้โดยมีการปิดบังข้อมูลสำหรับผู้ทำการทดลองและวัดผลด้วยหลังจากนั้นหนูทดลองทั้งสองกลุ่มจะได้รับการเลี้ยงในสภาพจำกัดเชื้อ (pathogen-limited condition) ภายในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำหนูทดลองมาฉีดและดมยาสลบก่อนจะทำการตรวจระบบการไหลเวียนเลือดในบริเวณ dorsal skin chamber โดยใช้ intravital fluorescent microscopy และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโทรทัศน์ (video) ทางกล้องจุลทรรศน์หลังจากนั้นจะนำเทปบันทึกภาพมาคำนวณหาปริมาณเส้นเลือดในบริเวณ dorsal skin chamber ต่อหน่วยพื้นที่ และจำนวนหย่อมของเซลล์มะเร็ง (colony) ต่อหน่วยพื้นที่ แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบสถิติโดยใช้วิธีทดสอบสมมติฐานแบบ unpaired t-test

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... อายุศาสตร์ .....  
สาขาวิชา ..... อายุศาสตร์ .....  
ปีการศึกษา ..... 2543 .....  
ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 427 5231330 : MAJOR MEDICINE (ONCOLOGY)

KEY WORD : ANTIANGIOGENESIS / HEPATOCELLULAR CARCINOMA/NUDE MICE

PRASAN KACHONRATTANADET : THE USE OF ANTIANGIOGENESIS AGENT IN A HUMAN-HEPATOCELLULAR-CARCINOMA IMPLANTED NUDE MICE MODEL.. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NARIN VORAVUD, M.D., THESIS COADVISOR : ASSO. PROF. SUTHILUK PATUMRAJ, PH.D. 70 pp. ISBN 974-13-1035-8.

Objective To determine the objective response of antiangiogenesis agent for treatment of Hepatocellular carcinoma cell line implanted in nude mice

Method The human hepatocellular carcinoma cell lines, HEP G2 and S 109, were cultured in media. The 7 week-old nude mice were operated under anesthesia and dorsal skin chambers were placed on the backs of all nude mice subcutaneously. The HEP G2 and S 109 cell lines were implanted in all chambers with the amount of 80,000 cells in each chamber. All nude mice were maintained in pathogen-limited condition in the appropriate environment. Then the nude mice were separated into two groups, experimental and controlled groups, with three mice in each. The antiangiogenesis agent, marimastat, were diluted with water to the concentration of 1 mg/ml. The experimental nude mice were fed by oral gavage with the dosage of 10 mg/kg/day of this agent twice a day. The controlled nude mice were also fed with water in the same volume. After 7 days each mice were examined under anesthesia by intravital fluorescent microscopy with video recording. Microvessel densities and colony count per unit area were calculated by image program. The results from both groups were compared for hypothesis testing using unpaired t-test method.

Results The MMP inhibitor, marimastat, exerted a statistical significant therapeutic effect, reducing the percentage of microvascular area per one unit area and the percentage of area of cancer cells colony per one unit area. No sign of any side effect was found in the experimental group.

Conclusion The nude mice with implanted hepatocellular carcinoma cell lines were effectively treated with antiangiogenesis agent.

Department.....Medicine..... Student's signature.....  
Field of study.....Medicine..... Advisor's signature.....  
Academic year.....2000..... Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

1. รองศาสตราจารย์ นายแพทย์นรินทร์ วรวิทย์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ที่ได้ให้ความคิดริเริ่ม ความรู้ และคำแนะนำแก่ผู้วิจัย
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อิศรางค์ นุชประยูร ที่ได้เอื้อเพื่อให้ใช้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับของมนุษย์มาทำการเพาะเลี้ยงและทดลอง
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล ที่ได้เอื้อเพื่อให้ใช้ห้องทดลองของศูนย์สัตว์ทดลอง ภาควิชาสรีรวิทยา
4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล วิเศษโสภาส ที่ได้ช่วยตรวจยืนยันการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับในหนูทดลองด้วยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา
5. นางสาวสายรุ้ง ศักดิ์กุล และทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำธร ที่ได้ช่วยทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับ และช่วยผ่าตัดหนูทดลอง
6. ดร.พรทิพา พิชา หัวหน้างานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และนายธานี ศุขกลิน นักวิทยาศาสตร์จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่ได้ช่วยให้คำแนะนำอันมีค่าอย่างยิ่งในการเลี้ยงหนูทดลองและรายละเอียดของวิธีการทดลอง
7. สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่ได้เอื้อเพื่อจำหน่ายหนูทดลองและอุปกรณ์เลี้ยงหนูทดลองอย่างสม่ำเสมอ
8. บริษัท เซอริง-พลาฟ จำกัด (ประเทศไทย) และ Schering-Plough Research Institute จากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ได้เอื้อเพื่อให้ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด marimastat ในการทดลอง
9. นายธนกฤต ตะนูลานนท์ และนางสาววิจิตรา ใจฉกรรจ์ ที่ได้ช่วยเหลือปรับปรุงห้องทดลองให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม
10. นายพลเลิศ เจียมจรรยา ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้
11. นายบุญชัย จงบรรเจิด ที่ได้ช่วยถ่ายภาพประกอบวิทยานิพนธ์
12. แพทย์ประจำบ้านและแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคมะเร็ง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในหน่วยอายุรศาสตร์โรคมะเร็งทุกท่าน ที่ช่วยให้กำลังใจในการทำงานวิจัย
13. คณะกรรมการทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ สันติสนุนทุนในการวิจัยทั้งหมด ทำยาสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และพี่น้องในครอบครัวอันเป็นที่รัก ในการสนับสนุนช่วยเหลือให้กำลังใจและกำลังความคิดเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฅ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
3. วิธีดำเนินการ.....	29
4. ผลการศึกษา.....	47
5. อภิปรายและสรุปผลการศึกษา.....	51
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้ทำวิทยานิพนธ์.....	72

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด .....	8
ตารางที่ 2 ปัจจัยต้านการสร้างหลอดเลือด .....	9
ตารางที่ 3 เอ็นไซม์ในกลุ่ม MMPs .....	18
ตารางที่ 4 ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยามาริมาสแตทในหนู rat .....	26
ตารางที่ 5 ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยามาริมาสแตทใน marmoset .....	26
ตารางที่ 6 จำนวนภาพที่มีความชัดเจนเพียงพอในการนำมาวิเคราะห์ด้วย image program ...	47
ตารางที่ 7 ความหนาแน่นของหลอดเลือดและกลุ่มเซลล์มะเร็งในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม .....	48
ตารางที่ 8 น้ำหนักหลังเสร็จสิ้นการทดลองและเพศของหนูทดลองแต่ละหมายเลข .....	49
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นหลอดเลือดระหว่างหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ...	49
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง .....	49
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักของหนูทดลองระหว่างทั้ง 3 กลุ่มของหนูทดลอง .....	50

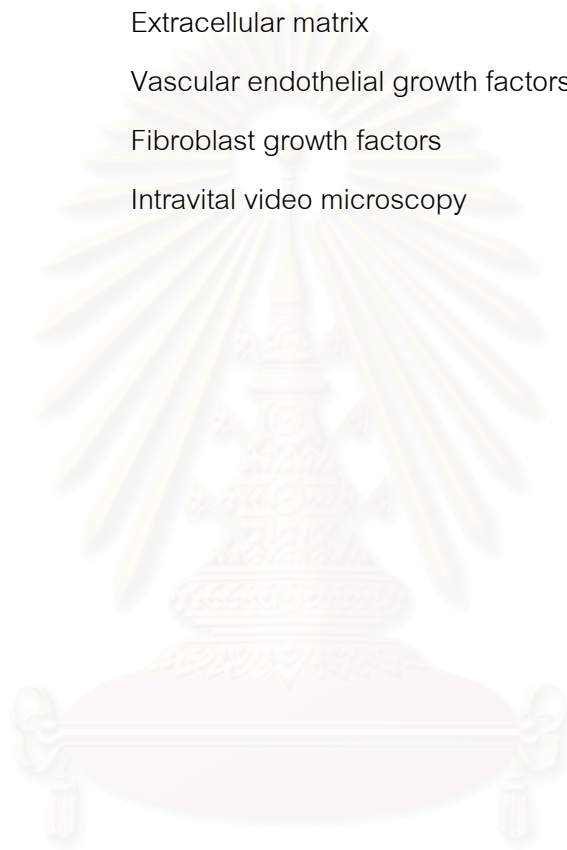


## สารบัญรูปลูกภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ขั้นตอนการสร้างหลอดเลือดใหม่ .....	10
รูปที่ 2 โครงสร้างของเอ็นไซม์ในกลุ่ม MMPs .....	19
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของยามาริมาสแตท .....	25
รูปที่ 4 แผนผังห้องทดลองเลี้ยงหนูทดลอง nude mice .....	31
รูปที่ 5 ภาพแวดล้อมหน้าห้องทดลองเลี้ยงหนู nude mice หลังจากได้รับการปรับปรุงแล้ว... ..	38
รูปที่ 6 ภาพแวดล้อมภายในห้องทดลองเลี้ยงหนู .....	38
รูปที่ 7 แสดงกรงเลี้ยงหนูทดลอง filter cap และหนูทดลองภายในกรง .....	39
รูปที่ 8 แสดงการให้อาหารและน้ำดื่มแก่หนูทดลอง .....	39
รูปที่ 9 หนูทดลอง nude mice .....	40
รูปที่ 10 หนูทดลอง nude mice หลังการผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber .....	40
รูปที่ 11 dorsal skin chamber เดิม (ต้นแบบจากประเทศญี่ปุ่น) .....	41
รูปที่ 12 dorsal skin chamber ที่ประยุกต์ขึ้นในการวิจัยครั้งนี้ .....	41
รูปที่ 13 แสดงหลอดเลือดบริเวณสันหลังของหนูทดลองที่เห็นภายใน chamber .....	42
รูปที่ 14 แสดงความชัดเจนของหลอดเลือดที่ตรวจได้โดยตรงบริเวณสันหลังของหนูทดลอง .....	42
รูปที่ 15 เซลล์ต้นแบบของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับในสภาพแช่แข็ง .....	43
รูปที่ 16 เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับที่ได้รับการเพาะเลี้ยงแล้วนำมาปั่นให้ตกตะกอน .....	43
รูปที่ 17 ยามาริมาสแตท .....	44
รูปที่ 18 แสดงการป้อนยาแก่หนูทดลอง .....	44
รูปที่ 19 แสดงเครื่องมือ intravital video microscopy และคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ภาพด้วย image program .....	45
รูปที่ 20 แสดงการใช้ image program ในการหาความหนาแน่นของหลอดเลือดและกลุ่มเซลล์มะเร็ง .....	45
รูปที่ 21 แสดงการชั่งน้ำหนักหนูทดลอง .....	46
รูปที่ 22 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังของหนูทดลองและเซลล์มะเร็งตับซึ่งฝังตัวในชั้นใต้ผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อของหนูทดลอง .....	46

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

HCC	Hepatocellular carcinoma
MMPs	Matrix metalloproteinases
TIMPs	Tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases
ECM	Extracellular matrix
VEGF	Vascular endothelial growth factors
FGF	Fibroblast growth factors
IVVM	Intravital video microscopy



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

โรคมะเร็งชนิด hepatocellular carcinoma(HCC) เป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยสำหรับผู้ชายไทย อุบัติการณ์ของโรคนี้สำหรับประชากรทั่วไปในโลกสำหรับเพศชายเป็น 6.8 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี<sup>1</sup> สำหรับเพศหญิงเป็น 2.3 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี สถิติของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปีพ.ศ.2538 คิดเป็นร้อยละ 3.4 ของโรคมะเร็งทั้งหมด<sup>2</sup> และเป็นอันดับที่ 5 ในผู้ป่วยชาย ส่วนในผู้ป่วยหญิงนั้นพบได้น้อย

ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของโรคมะเร็งตับชนิด HCC ในประเทศไทยและภูมิภาคนี้ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมาพบแพทย์ด้วยอาการจุกแน่นหรือมีก้อนในท้อง ในจำนวนมากกว่ากึ่งหนึ่ง (ร้อยละ 61.1) จะอยู่ในระยะที่เป็นมาก และไม่สามารถรับการรักษาด้วยการผ่าตัดแล้วขณะที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นครั้งแรก<sup>3</sup> และมักจะมีโรคตับอักเสบ หรือตับแข็งร่วมด้วยเสมอ ทำให้ผลการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ นอกเหนือจากการผ่าตัดนั้นไม่ดีเท่าที่ควรไม่ว่าจะใช้วิธีการใดๆก็ตามในปัจจุบัน ผู้ป่วยทั้งหมดของโรคนี้มีระยะเวลาของการรอดชีวิตโดยเฉลี่ย 5.6 เดือน<sup>4</sup> ส่วนผู้ป่วยที่ไม่ได้รักษาจะมีระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ยเพียง 8.7 สัปดาห์เท่านั้น

วิธีการรักษาอื่นๆนอกเหนือจากการผ่าตัด ได้แก่ การฉีดสารเคมีเพื่อปิดกั้นหลอดเลือดที่เลี้ยงก้อนมะเร็ง (transcatheter ioly chemoembolization, TOCE) ซึ่งให้ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ย 12 เดือน<sup>3</sup> เป็นวิธีการที่ได้ผลดีพอสมควรในการรักษาผู้ป่วยที่อยู่ในระยะเป็นมากจนไม่สามารถผ่าตัดได้ แต่มีข้อห้ามที่สำคัญและผลข้างเคียงหลายประการ การฉีดแอลกอฮอล์เข้าตับซึ่งให้ระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ย 11.2 เดือน<sup>3</sup> แต่มีข้อจำกัดในการเลือกวิธีการนี้และผลข้างเคียงหลายประการเช่นกัน ส่วนการให้ยาเคมีบำบัดนั้น จะทำให้ผู้ป่วยมีระยะเวลารอดชีวิตเฉลี่ย 7.3 เดือน<sup>3</sup> วิธีการรักษาอื่นๆ ที่ยังอยู่ในขั้นการทดลอง ได้แก่ การรักษาทางชีววิทยาร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด (chemobiologic treatment)<sup>5,6</sup> และการรักษาด้วยฮอร์โมน(hormonal therapy)<sup>7-11</sup> ล้วนแต่เป็นการรักษาที่ยังมีข้อมูลน้อยและส่วนใหญ่ไม่พบว่ามีการตอบสนองที่ดีนัก ผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงได้รับการรักษาเพียงการรักษาแบบประคับประคอง (supportive treatment) เป็นส่วนใหญ่

ในช่วงทศวรรษล่าสุดนี้ มีความก้าวหน้าในการศึกษาเรื่องกระบวนการเจริญเติบโต และวิวัฒนาการของโรคมะเร็งในระดับอณูชีววิทยาเป็นอย่างมาก ความรู้ในเรื่องดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคิดค้นวิธีการรักษาใหม่ๆของโรคมะเร็งด้วย ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า การเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นต้องอาศัยปัจจัยช่วยการเจริญเติบโต (growth

factors) หลายชนิด ที่สำคัญคือ เอ็นไซม์หลายกลุ่มซึ่งมีบทบาทหน้าที่ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งแตกต่างกันไป

เอ็นไซม์กลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นกลุ่มของเอ็นไซม์กลุ่มหนึ่งซึ่งมีหน้าที่ที่สำคัญมากในการย่อยสลายโปรตีนในบริเวณที่เป็นสารโครงสร้างพื้นฐานนอกเซลล์ (extracellular matrix) เพื่อให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตลุกลามได้มากขึ้น และเป็นเส้นทางให้หลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่สามารถงอกเข้าไปเลี้ยงถึงบริเวณก้อนมะเร็งได้ดีขึ้นด้วย อีกทั้งเป็นเอ็นไซม์ที่ช่วยย่อยสลายผนังหลอดเลือดชั้น basement membrane ทำให้ผนังหลอดเลือดในบริเวณมีการซึมผ่าน (permeability) มากกว่าปกติ เซลล์มะเร็งจึงสามารถแทรกตัวเข้าสู่หลอดเลือดและแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่น การค้นคิดสารยับยั้งฤทธิ์ของเอ็นไซม์กลุ่มนี้จึงน่าจะมีประโยชน์ในหลายๆด้าน สำหรับการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

ยามาริมาสแตท (marimastat) เป็นยาชนิดแรกที่สุดชนิดหนึ่งในกลุ่มสารยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMPs inhibitors) ได้อย่างกว้างขวาง (broad spectrum) มีการทดลองนำยานี้นี้ไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ทั้งในขั้นการทดลองยาระดับก่อนคลินิก (preclinical phase) และในระดับคลินิก (clinical phase) มาเป็นเวลาหลายปีแล้ว แต่ยังไม่ปรากฏรายงานการทดลองใช้ยานี้นี้ในการรักษาโรคมะเร็งตับ ทั้งที่ในทางทฤษฎีแล้วลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญประการหนึ่งของโรคมะเร็งตับคือ มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เข้ามาหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็งมากกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆ โดยทั่วไป ดังนั้น การรักษาโรคมะเร็งตับด้วยการใช้สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือด ซึ่งในการทดลองนี้คือยามาริมาสแตท จึงอาจจะเป็นวิธีการรักษาที่ได้ผลดีกว่าการใช้ยานี้นี้รักษาโรคมะเร็งทั่วไปอื่นๆ นอกจากนี้ การทดลองใช้สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในการรักษาโรคมะเร็งอื่นๆ นั้นมักนิยมการวัดผลของยาทางอ้อม เช่น โดยการชั่งน้ำหนักก้อนมะเร็ง<sup>12</sup> โดยการวัดการลุกลามของมะเร็งและระยะเวลารอดชีวิตของสัตว์ทดลอง<sup>13-16</sup> หรือการวัดระดับ tumor marker ที่ลดลงหลังการรักษา<sup>12,17,18</sup> เป็นต้น ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการวัดประสิทธิภาพของการรักษาที่มีโอกาสได้ผลคลาดเคลื่อนอยู่มาก เนื่องจากยานี้นี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว แต่ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งโดยตรง ดังเช่นในกรณีของยาเคมีบำบัด ดังนั้นการวัดผลการรักษาของยานี้นี้ด้วยการวัดขนาดของก้อนมะเร็งจึงไม่สามารถใช้ได้ แต่ควรจะเป็นการเปรียบเทียบขนาดของก้อนมะเร็งที่ได้รับยาว่าสามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโตได้หรือไม่ รวมทั้งการตรวจตัวบ่งชี้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง เช่น การตรวจสัดส่วนของเซลล์มะเร็งในระยะ S (S-phase fraction) การตรวจความหนาแน่นของเส้นเลือด ตลอดจนการวัดผลการรักษาในระยะยาว ได้แก่ การวัดอัตราการรอดชีวิต ค่าเฉลี่ยของเวลาที่รอดชีวิต และค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่ปลอดโรค เป็นต้น การทดลองนี้จึงออกแบบขึ้นให้เป็นการวัดผล

ทางตรงของยาต่อจำนวนหย่อม (colony) ของเซลล์มะเร็ง และความหนาแน่นของหลอดเลือด  
ในบริเวณที่มีเซลล์มะเร็ง จึงน่าจะแสดงถึงประสิทธิภาพโดยตรงของสารยับยั้งการสร้างหลอดเลือด  
เลือดได้ชัดเจนมากกว่าอีกด้วย

## คำถามของการวิจัย (Research Question)

### 1. คำถามการวิจัยหลัก (Primary Research Question)

ยามาริมาสแตท จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับที่เพาะเลี้ยงใน  
หลอดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

### 2. คำถามการวิจัยรอง (Secondary Research Question)

ยามาริมาสแตทจะสามารถลดปริมาณการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งที่  
เพาะเลี้ยงในหลอดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

## สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

ยามาริมาสแตท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างหลอดเลือดของเซลล์  
มะเร็งระดับที่เพาะเลี้ยงในหลอดลองได้

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดลองการใช้ยามาริมาสแตทซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้าง  
หลอดเลือดในการรักษาโรคมะเร็งตับในหลอดลองโดยการตรวจวัดจำนวนความหนาแน่นของ  
หย่อมของเซลล์มะเร็งและความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

## ข้อจำกัดในการวิจัย

ข้อจำกัดในการวิจัยนี้ที่สำคัญ ได้แก่ ข้อจำกัดในด้านเวลาและเงินทุนวิจัย ทำให้ไม่  
สามารถเปรียบเทียบผลของยาชนิดนี้ต่อโรคมะเร็งอื่นๆ ที่มีปริมาณการสร้างหลอดเลือดและ

รูปแบบการแพร่กระจายของโรคแตกต่างกัน ซึ่งจะช่วยให้เห็นประโยชน์ของการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ด้วยยาชนิดนี้ได้ชัดเจนขึ้น

## อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

1. การติดต่อขอยามาใช้ในการทดลองและการนำเข้าประเทศเนื่องจากเป็นยาที่ไม่มีกรจำหน่ายและจดทะเบียนในประเทศใดๆ การติดต่อขอยามาใช้ในการทดลองจึงเป็นไปด้วยความยากลำบาก และมีปัญหามากในการนำยาเข้าสู่ประเทศไทย แก้ไขโดยการติดต่อประสานงานอย่างใกล้ชิดกับตัวแทนของบริษัทยาในประเทศไทย
2. การเลี้ยงและดูแลหนูทดลอง เนื่องจากหนูทดลอง nude mice เป็นหนูทดลองที่มีความบอบบางของภูมิคุ้มกันอย่างมากแต่กำเนิด จึงเป็นสัตว์ทดลองที่ต้องการความชำนาญและการดูแลเอาใจใส่อย่างยิ่งในขณะที่มีผู้ชำนาญงานในด้านนี้จำนวนน้อยมากในประเทศ และไม่มีห้องทดลองแห่งใดเลยที่มีมาตรฐานทัดเทียมกับต่างประเทศ โดยเฉพาะห้องทดลองที่มีในคณะแพทยศาสตร์ แก้ไขโดยการดัดแปลงปรับปรุงสภาพห้องทดลองให้ดีที่สุดเท่าที่ทำได้ และจำกัดผู้ทำการดูแลหนูทดลองให้น้อยที่สุด เพื่อควบคุมโอกาสการปนเปื้อนเชื้อโรคในห้องทดลองให้น้อยที่สุด
3. เทคนิควิธีการในการวิจัย เนื่องจากหนูทดลอง nude mice เป็นหนูทดลองที่ใช้้น้อยมากในประเทศ จึงไม่มีผู้ให้คำแนะนำสำหรับปัญหาทางเทคนิคในการวิจัยต่างๆ เช่น การผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber เป็นต้น แก้ไขโดยการสังเกตและศึกษาปัญหาที่เกิดขึ้น แล้วทำการแก้ไขแบบลองผิดลองถูกเป็นครั้งๆ ไปจนได้วิธีการที่เหมาะสม โดยประยุกต์เข้ากับเทคนิคการทดลองในเรื่องนี้ของต่างประเทศ
4. การจัดหาและเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับของมนุษย์ เซลล์สายพันธุ์มะเร็งดังกล่าวเป็นเซลล์ที่หาได้ยากและต้องการความชำนาญในการเพาะเลี้ยง แก้ไขโดยติดต่อหาผู้เชี่ยวชาญในการเพาะเลี้ยงเซลล์มาร่วมทำการวิจัยผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งชี้ประสิทธิภาพของวิธีการรักษาโรคมะเร็งตับด้วยวิธีใหม่ ก่อนที่จะทำการศึกษาในชั้นคลินิกต่อไป รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้หนูทดลอง nude mice ในการวิจัยอื่นๆ และการวิจัยในเรื่องหลอดเลือดระดับจุลภาคที่สัมพันธ์กับโรคมะเร็งในด้านอื่นๆ ในอนาคต

## ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

## คำสำคัญ (Key Words)

Marimastat

Hepatocellular Carcinoma

Nude Mice



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### I การสร้างหลอดเลือด (angiogenesis)

การสร้างหลอดเลือด คือกระบวนการที่หลอดเลือดเดิมที่มีอยู่แล้วมีการแตกแขนงของหลอดเลือดใหม่เข้าสู่เนื้อเยื่อโดยรวม กระบวนการนี้เกิดขึ้นเสมอในขณะที่มีการสมานแผลและระหว่างรอบประจำเดือนของสตรีที่บริเวณรังไข่และมดลูก แต่นอกจากนี้แล้ว สำหรับผู้ใหญ่ปกตินั้นจะมีโอกาสเกิดกระบวนการนี้ได้้น้อยมาก สาเหตุสำคัญของการเกิดกระบวนการนี้ในผู้ใหญ่คือโรคหลายชนิดรวมทั้งโรคมะเร็งนั่นเอง

#### ก. อณูชีววิทยาของการสร้างหลอดเลือด

ในขณะที่เริ่มต้นเซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโตได้จนมีขนาดประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่จำกัดตัวเอง เนื่องจากการหล่อเลี้ยงของสารอาหารและออกซิเจนจากเลือดไม่เพียงพอ<sup>19-20</sup> เซลล์มะเร็งในระยะเริ่มต้นขนาดนี้จะอยู่ในภาวะสงบนิ่ง นั่นคือไม่มีการเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็งและไม่ทำให้เกิดอาการใดๆ แก่ผู้ป่วยได้เป็นเวลานานหลายปี โดยที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการตรวจใดๆทั้งสิ้น อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งในก้อนมะเร็งระยะนี้อาจมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วเทียบเท่ากับเซลล์มะเร็งในระยะที่มีการลุกลามของโรคได้ แต่ความจำกัดในด้านอาหารและออกซิเจนจะทำให้เซลล์มะเร็งส่วนในของก้อนมะเร็งซึ่งอาหารและออกซิเจนไม่สามารถกระจายไปถึงเกิดการตาย (apoptosis) ขึ้นเองในอัตราเท่ากับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดนั้น เชื่อกันว่าควบคุมโดย "เครื่องเปิดปิดการสร้างหลอดเลือด(angiogenic switch)"<sup>22</sup> ซึ่งได้แก่ ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ของเซลล์มะเร็งและการกลายพันธุ์ของเซลล์มะเร็ง ภาวะขาดออกซิเจนจะกระตุ้นการทำงานของปัจจัยช่วยการคัดลอกโปรตีน (transcription factor) ที่เรียกว่า hypoxia-induced factor 1 (hif 1)<sup>23,24</sup> ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในการคัดลอกโปรตีนที่เป็นปัจจัยช่วยการเจริญเติบโตของเซลล์บุหลอดเลือด (vascular endothelial growth factor, VEGF) ต่อไป<sup>25</sup> ส่วนความไม่เสถียรทางพันธุกรรมซึ่งเป็นคุณสมบัติประจำตัวของเซลล์มะเร็งจะทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ในระหว่างการแบ่งตัวได้ง่าย การกลายพันธุ์เป็นการกระตุ้นยีนมะเร็ง (oncogene) หรือยับยั้งยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) โดยเฉพาะที่สำคัญคือการกลายพันธุ์ของยีนต้านมะเร็ง p53 ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของ



เซลล์และวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) จะทำให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตรอดได้ในภาวะขาดออกซิเจน<sup>26</sup> ร่วมกับการลดการทำงานของปัจจัยต้านการสร้างหลอดเลือด (antiangiogenic factors) โดยเฉพาะ thrombospondin และกลไกอื่นอีกหลายประการ<sup>28</sup> ทำให้เกิดความไม่สมดุลของการควบคุมการสร้างหลอดเลือด เซลล์มะเร็งที่กลายพันธุ์ยังสามารถสร้าง VEGF<sup>29</sup> และปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดอื่นๆ ทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดขึ้นใหม่ โดยที่เซลล์เหล่านี้จะเติบโตทดแทนเซลล์ที่ไม่กลายพันธุ์ที่ตายไปและกลายเป็นเซลล์ส่วนใหญ่ของก้อนมะเร็งนั้น<sup>19</sup> ตารางที่ 1 และ 2 แสดงถึงปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดและปัจจัยต้านการสร้างหลอดเลือด

กระบวนการสร้างหลอดเลือดแบ่งได้เป็น 4 ระยะ (รูปที่ 1) ได้แก่

1. การสร้างช่องว่างขึ้นที่ผนังหลอดเลือด (establishment of vascular discontinuity)
2. การเคลื่อนย้ายของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell migration)
3. การเจริญเติบโตของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell proliferation)
4. การจัดเรียงโครงสร้างหลอดเลือดใหม่ (structural reorganization)

ขั้นตอนแรกของกระบวนการสร้างหลอดเลือดเริ่มต้นจากการกระตุ้นเซลล์บุหลอดเลือดที่มีอยู่ก่อนแล้วและอยู่ในภาวะสงบนิ่งโดยปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด (angiogenic factors) ซึ่งจะไปจับกับตัวรับที่จำเพาะกัน ทำให้เกิดการส่งสัญญาณผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane signalling) และกระตุ้นเซลล์บุหลอดเลือดให้เกิดการเจริญเติบโตและมีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งออกจากช่องว่างของผนังเลือด ซึ่งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ซึ่งหลังจากเซลล์มะเร็งเช่นกัน นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารโครงสร้างพื้นฐานระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) และสร้างปัจจัยดึงดูดเซลล์บุหลอดเลือด (chemotactic factor) เข้าหาก้อนมะเร็ง ทำให้เซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มจำนวนสร้างหลอดเลือดผ่านพื้นที่ที่มีการย่อยสลายโครงสร้างพื้นฐานระหว่างเซลล์ออกแล้วเข้าไปสู่ก้อนมะเร็ง เซลล์บุหลอดเลือดที่เจริญเติบโตออกนอกหลอดเลือดเดิมเหล่านี้สามารถรอดชีวิตอยู่ได้โดยอาศัยปัจจัยช่วยการเจริญเติบโตที่จำเพาะ ได้แก่ integrins,  $\alpha v \beta 3$  และ  $\alpha v \beta 5$  แล้วจัดเรียงโครงสร้างใหม่เป็นหลอดเลือดโดยอาศัยโมเลกุลยึดเหนี่ยวเซลล์ (cell adhesion molecules) ที่เรียกว่า E-selectin<sup>30</sup>

ปัจจุบันมีการค้นพบปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดชนิดใหม่ๆ มากขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดที่มีฤทธิ์รุนแรงและจำเพาะกับเซลล์บุหลอดเลือดมากที่สุดยังคงเป็นปัจจัยแรกที่มีการค้นพบคือ VEGF เซลล์มะเร็งเกือบทุกชนิดสามารถสร้าง VEGF ได้ VEGF จะทำหน้าที่โดยจับกับตัวรับที่จำเพาะ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม tyrosine kinase

**Vascular endothelial growth factors**

VEGF A, VEGF B, VEGF C

**Fibroblast growth factors (FGF)**

FGF-1 (acidic FGF)

FGF-2(basic FGF)

FGF-3 (int-2)

FGF-4 (K-FGF)

**Tumor necrosis factor- $\alpha$** **Transforming growth factor- $\beta$** 

Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth-factor)

Platelet-derived growth factor

Scatter factor (hepatocyte growth factor)

Interleukin 8

**Other proteins and peptides**Transforming growth factor- $\alpha$ 

Granulocyte colony-stimulating factor

Angiogenin

Platelet-activating factor

Proliferin

Substance P

**Non-peptides**

Lactate

Hyaluron fragment

Erucamide

Prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>

ตารางที่ 1 ปัจจัยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด

**Antiangiogenic factors**

Angiostatin

Endostatin

Interferons  $\alpha, \beta$  and  $\gamma$

Interferon  $\gamma$  inducible protein 10

Interleukin 1

Interleukin 12

Platelet factor 4

**Proliferin related protein**

16 K prolactin fragment

Thrombospondin 1

2-methoxyoestradiol

Tissue inhibitor of metalloproteinase

Retinoic acid

Tumour necrosis factor- $\alpha$  (high concentration)

**Antiangiogenic drugs**

Metalloproteinase inhibitors

Fumagillin analogues (AGM1470)

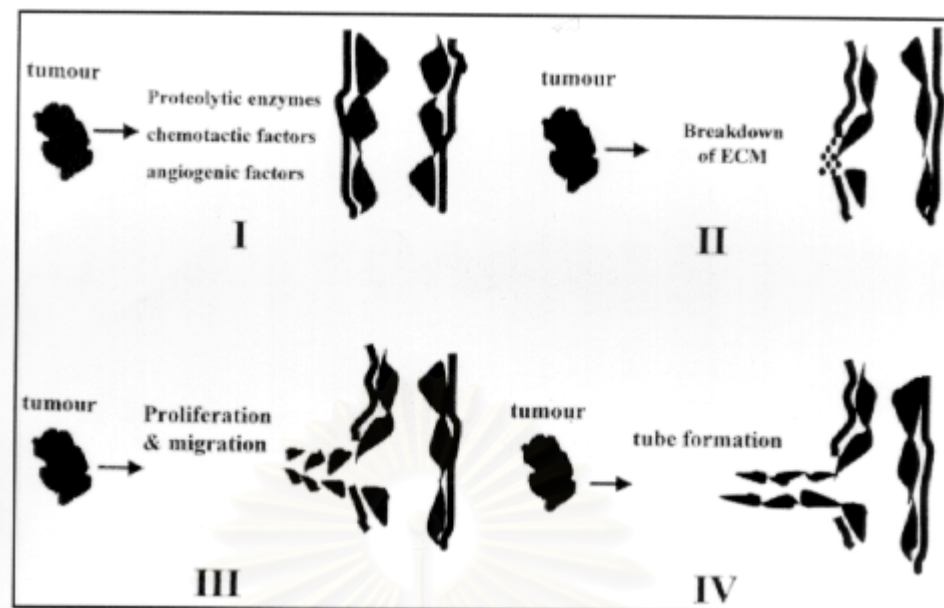
Group B streptococcus toxin

Interferons

Pentosan polysulphate

VEGF blocking-antibodies

VEGF receptor kinase inhibitors



รูปที่ 1 ขั้นตอนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (นำมาจาก New strategies in anti-vascular cancer therapy ใน European Journal of Clinical Investigation 1999 vol. 29(9) หน้า 804)

ทั้งหมด ได้แก่ ตัวรับ VEGF1 หรือมีอีกชื่อว่า flt-1 ตัวรับ VEGF 2 หรือ KDR/flk-1 และตัวรับ VEGF3 หรือ flt-4<sup>31-35</sup> ในระหว่างการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งนั้น VEGF และตัวรับ VEGF1 รวมทั้งตัวรับ VEGF2 จะถูกเพิ่มบทบาท (up-regulation) มากขึ้น ในทางตรงข้ามการลดบทบาท (down-regulation) ของ VEGF จะช่วยยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้<sup>36-38</sup> ปัจจุบันส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดชนิดใหม่ที่เพิ่งมีการค้นพบคือ angiopoietin ซึ่งทำหน้าที่โดยจับกับตัวรับที่เรียกว่า Tie2 การยับยั้งการทำงานของตัวรับ Tie2 และ angiopoietin ก็ สามารถยับยั้งการเติบโตและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน<sup>39</sup>

การยับยั้งการทำงานของปัจจัยด้านการสร้างหลอดเลือดก็เป็นสิ่งจำเป็นต่อการสร้างหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งเช่นกัน ตัวอย่างที่สำคัญในกรณีนี้คือ thrombospondin นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่าปัจจัยด้านการสร้างหลอดเลือดอื่นๆ ซึ่งมีหลายชนิดที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ไม่เคยทราบมาก่อนว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด เช่น prolactin และ fibronectin เป็นต้น หรือบางชนิดก็เป็นผลิตภัณฑ์จากปัจจัยยับยั้งการสร้างหลอดเลือดอื่นที่มีฤทธิ์อ่อนกว่า เช่น Platelet factor 4 เป็นต้น

เอ็นไซม์ย่อยโปรตีน ก็มีความจำเป็นในการย่อยสลาย basement membrane เพื่อให้เกิดช่องว่างที่ผนังหลอดเลือด และย่อยสลายสารโครงสร้างพื้นฐานระหว่างเซลล์

(extracellular matrix) เพื่อให้เกิดพื้นที่ที่เซลล์บุหลอดเลือดสามารถเคลื่อนย้ายมาได้ เอ็นไซม์ที่สำคัญในกระบวนการนี้คือเอ็นไซม์กลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) และเอ็นไซม์ย่อยซีรีน (serine proteases) เอ็นไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้สร้างขึ้นได้จากเซลล์บุหลอดเลือด เซลล์มะเร็ง และเซลล์ตอบสนองการอักเสบ (inflammatory cell)<sup>40-42</sup> นอกจากนี้โมเลกุลยึดเหนี่ยวเซลล์ (adhesion molecules) ก็มีบทบาทสำคัญในการปรับตัวของเซลล์บุหลอดเลือดเข้ากับสารโครงสร้างพื้นฐานระหว่างเซลล์<sup>43,44</sup> โมเลกุลยึดเหนี่ยวเซลล์ที่สำคัญคือ  $\alpha\beta 3$  และ  $\alpha\beta 5$  นั้นสร้างจากเซลล์บุหลอดเลือดเช่นเดียวกัน เซลล์บุหลอดเลือดที่เคลื่อนย้ายออกมาภายนอกจะสร้างจุดเชื่อมต่อ (tight junction) ระหว่างกันเรียงเป็นโครงสร้างรูปท่อและต่อกับหลอดเลือดฝอยเดิมทำให้การสร้างหลอดเลือดใหม่เสร็จสิ้น

#### ข. ความแตกต่างระหว่างหลอดเลือดปกติและหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง

ความรู้ในเรื่องการสร้างเส้นเลือดของเซลล์มะเร็งทำให้เกิดความเข้าใจในเรื่องความแตกต่างระหว่างหลอดเลือดปกติและหลอดเลือดในก้อนมะเร็งได้ชัดเจนขึ้น ปัจจุบันทราบกันแน่ชัดแล้วว่า หลอดเลือดในก้อนมะเร็งมีความแตกต่างจากหลอดเลือดปกติหลายประการ<sup>45,46</sup> หลอดเลือดปกตินั้น เซลล์บุหลอดเลือดจะอยู่ในภาวะสงบนิ่ง (quiescent) และมีอัตราการตายของเซลล์บุหลอดเลือดต่ำมากเทียบกับหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งผนังของหลอดเลือดในก้อนมะเร็งจะบางกว่า เซลล์บุหลอดเลือดก็มีการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ ไม่มีเส้นประสาทหล่อเลี้ยง และไม่สามารถควบคุมทิศทางการไหลเวียนเลือดได้ดีเต็มที่<sup>47</sup> ผนังของหลอดเลือดในก้อนมะเร็งประกอบด้วยชั้น basement membrane ที่บุด้วยเซลล์บุหลอดเลือดที่เติบโตอย่างรวดเร็วและยังไม่สมบูรณ์เต็มที่ (immature) ทำให้มีการซึมผ่านของสารเข้าออกหลอดเลือดได้ง่ายกว่าปกติ ความรู้ในเรื่องนี้ ช่วยให้เกิดความพยายามวิจัยหาวิธีการรักษามะเร็งที่จำเพาะกับหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง ซึ่งได้แก่การใช้สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในการป้องกันการสร้างหลอดเลือดขึ้นใหม่ และการใช้ยาที่มีฤทธิ์ทำลายหลอดเลือดในก้อนมะเร็งที่มีอยู่แล้ว ซึ่งทำให้เซลล์มะเร็งตายจากการขาดสารอาหาร ยาที่มีผลต่อหลอดเลือดในก้อนมะเร็งทั้งสองชนิดนี้แม้จะมีผลต่อหลอดเลือดต่างกันแต่ก็สามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งได้จากการทดลองในสิ่งมีชีวิต

## II การใช้หนูทดลอง nude mice ในการทดลองทางมะเร็งวิทยา

### ก. ประวัติศาสตร์ของหนู nude mice

หนู nude mice ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1962 ในห้องทดลองเชื้อไวรัสของโรงพยาบาล Ruchill ในเมืองกลาสโกว์ ประเทศสกอตแลนด์ โดยเป็นหนูกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญจากการผสมพันธุ์กันภายในครอบครัวของหนูเผือก (albino mice) ลักษณะภายนอกที่ปรากฏความแตกต่างชัดเจนคือเป็นหนูที่ไม่มีขน N.R.Grist ซึ่งเป็นผู้ค้นพบเป็นครั้งแรกได้ส่งหนูทดลองกลายพันธุ์นี้ไปที่สถาบันพันธุศาสตร์ของสัตว์ (The Institute of Animal Genetics) ในเมืองเอдинเบิร์ก ประเทศสกอตแลนด์ เพื่อทำการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมอย่างละเอียด<sup>48</sup> และสามารถวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่มีความผิดปกติและเป็นสาเหตุของลักษณะไร้ขน รวมทั้งตำแหน่งของยีนที่เป็นเครื่องหมาย (marker genes) ที่ใช้สำหรับการยืนยันความถูกต้องของพันธุกรรมของหนูทดลอง nude mice<sup>49</sup> ซึ่งใช้ในการทดลองหลายสาขาในเวลาต่อมา

Flanagan แห่งสถาบันพันธุศาสตร์ของสัตว์เป็นบุคคลแรกที่พบว่าหนู nude mice มีช่วงชีวิตที่สั้นมาก ในครั้งแรก Flanagan เชื่อว่าเกิดจากการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในหนู จึงส่งหนูทดลอง nude mice ไปให้ W.Hutchison ในเมืองกลาสโกว์ ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญเรื่องโรคติดเชื้อ *Toxoplasmosis* ช่วยตรวจสอบ ผลการตรวจสอบไม่พบหลักฐานใดๆของการติดเชื้อโรคดังกล่าว หนูทดลองจึงถูกส่งต่อให้ E.M. Pantelouris จากมหาวิทยาลัย University of Strathclyde เมื่อทำการตรวจหาโรคติดเชื้ออื่น Pantelouris ได้ค้นพบความผิดปกติที่สำคัญของหนูทดลอง nude mice ซึ่งมีผลอย่างมากต่อการทดลองทางภูมิคุ้มกันวิทยาและมะเร็งวิทยาในเวลาต่อมา<sup>50</sup>

ในปี ค.ศ.1968 Pantelouris ได้รายงานว่าหนู nude mice ไม่มีต่อมธัยมัส ในขณะที่หนูในครอบครัวเดียวกันที่ไม่เป็นพันธุ์แท้ (homozygote) ของ nude mice นั้นยังตรวจพบการเจริญเติบโตของต่อมธัยมัสตามปกติ นอกจากนี้หนูทดลอง nude mice ยังมีจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดต่ำกว่าหนูปกติถึง 4 เท่า ตรงกับผลที่ได้รับจากการตรวจระบบน้ำเหลืองของหนู nude mice ในสถาบันอื่น<sup>51</sup> ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าหนู nude mice ซึ่งไม่มีต่อมธัยมัสตั้งแต่เกิด มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ (cell mediated immunity, CMI) อย่างรุนแรง จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดที่ต่ำมากยังแสดงถึงความบกพร่องของภูมิคุ้มกันแบบ humoral mediated immunity (HMI) ร่วมด้วยเนื่องจากจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocyte ชนิด B ต่ำมากนั่นเอง

ยีนที่มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของต่อมธัยมัสของหนู mice ให้เป็นไปตามปกติคือยีน *nu* การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดหนูที่ไม่มีต่อมธัยมัสเป็นการกลายพันธุ์แบบด้อย (recessive autosomal mutation) ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดหนู nude mice ต้องเป็นการกลายพันธุ์ที่ยีน *nu* ทั้ง 2 ยีนบนโครโมโซมที่เป็นคู่กัน โดยปกติการผสมพันธุ์หนูทดลองให้ได้ nude mice นั้นต้องใช้หนู nude mice พันธุ์แท้ (homozygote) เพศผู้กับหนู mice ที่มียีน *nu* แบบพันธุ์ทาง (heterozygote) เพศเมีย เพื่อให้เกิดโอกาสได้ลูกที่เป็น nude mice พันธุ์แท้ร้อยละ 50<sup>49</sup>

### ข. การปลูกเซลล์มะเร็งมนุษย์ (Transplantability of Human Cancers)

การปลูกเซลล์มะเร็งของมนุษย์ในหนู nude mice เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกจากการทดลองของ Rygaard และ Povlsen<sup>52</sup> ซึ่งทำการปลูกเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) ของหนู nude mice เป็นผลสำเร็จ หลังจากนั้นการทดลองปลูกเซลล์มะเร็งของมนุษย์ในหนูทดลองก็เป็นการทดลองที่ทำอย่างแพร่หลายเพื่อจุดประสงค์หลายประการ ทั้งในการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและแพร่กระจายของโรคมะเร็ง ความเปลี่ยนแปลงในระดับจุลภาคของเซลล์มะเร็งและเซลล์รอบข้างขณะที่มีการเจริญเติบโตของโรคมะเร็ง รวมทั้งการทดลองการรักษาด้วยวิธีการใหม่หรือยาที่มีการผลิตขึ้นใหม่

มีรายงานจำนวนมากพบว่า การทดลองปลูกเซลล์มะเร็งหลายชนิดจากมนุษย์ในหนู nude mice นั้นไม่สามารถปลูกได้สำเร็จทุกชนิด<sup>53-58</sup> มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อความสำเร็จในการปลูกเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่

#### 1. การเกาะติดของเซลล์มะเร็ง (tumor take)

เซลล์มะเร็งที่สามารถเกาะติดในเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองได้นั้น อาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานมากถึง 6 เดือนก็ได้<sup>59</sup> โอกาสในการเกาะติดเนื้อเยื่อของหนูทดลองย่อมแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์มะเร็งเช่นกัน

#### 2. ปัจจัยในด้านของสัตว์ทดลอง (host factors)

##### 2.1 พันธุกรรมของสัตว์ทดลอง

หนูทดลอง nude mice เป็นหนูทดลองที่มีลักษณะภายนอกที่เด่นชัดคือไม่มีขน ลักษณะภายในตัวหนูทดลองคือไม่มีการเจริญเติบโตของต่อมธัยมัสตามปกติ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากยีนกลายพันธุ์ *nu* ซึ่งเป็นยีนด้อย นอกจากลักษณะที่ปรากฏชัดเจนจากยีนดังกล่าว ยังมียีนอื่นที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะของหนูทดลองที่เด่นชัดซึ่งเป็นยีนหลักที่ใช้ในการเรียกชื่อสายพันธุ์ของหนูทดลองอีกด้วย ตัวอย่างของยีนดังกล่าวซึ่งเป็นยีนสำคัญ

ของหนูขาว (albino strain) คือยีน *BALB/c* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของหนูทดลองที่นิยมใช้กันทั่วไปในห้องทดลองทั่วโลกรวมทั้งในการทดลองนี้ด้วย การผลิตหนูทดลองที่เป็นมาตรฐานสำหรับการทดลองแต่ละครั้งนั้นจำเป็นต้องให้ได้หนูทดลองที่มีพันธุกรรมเหมือนกันมากที่สุด จึงต้องอาศัยการสืบพันธุ์ของหนูทดลองภายในครอบครัว (inbreeding) ดังนั้นในห้องทดลองทั่วไปและรวมทั้งในการทดลองนี้จึงใช้หนูทดลองที่มีพันธุกรรมเหมือนหนูสายพันธุ์ *BALB/c* ทุกประการยกเว้นยีนกลายพันธุ์ *nu* ซึ่งต้องเป็นพันธุ์แท้ (*nu/nu*) หนูทดลองดังกล่าวจึงมีชื่อเรียกว่าสายพันธุ์ *BALB/c-nu*

ยีน *nu* ที่ทำให้ต่อมธัยมัสไม่เจริญเติบโตนั้นมีผลต่อภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องของหนูทดลองในสายพันธุ์ต่างๆ ไม่เท่ากัน<sup>60</sup> และย่อมจะทำให้โอกาสของการปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลองได้สำเร็จแตกต่างกันไปด้วย แต่ไม่มีผู้ทำการศึกษเปรียบเทียบโอกาสของความสำเร็จดังกล่าวในหนูทดลองแต่ละสายพันธุ์สำหรับเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดอย่างชัดเจน เนื่องจากห้องทดลองแต่ละแห่งก็มักจะทำการทดลองกับหนูสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นการทดลองในกรณีนี้จึงจำเป็นต้องระบุสายพันธุ์ของหนู nude mice ด้วยเสมอ นอกจากนี้ยังมีรายงานบางฉบับกล่าวว่า โอกาสของการปลูกเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อของหนูทดลองจะสูงมากขึ้น ถ้าใช้หนูทดลองที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันมากกว่าหนู nude mice ธรรมดา<sup>61-65</sup> ซึ่งมีความบกพร่องของเม็ดเลือดขาว lymphocyte ชนิด T cell เป็นสำคัญเท่านั้น แต่ก็มีรายงานที่ได้ผลขัดแย้งกับสมมติฐานดังกล่าวเช่นกัน<sup>66</sup>

## 2.2 อายุของหนูทดลอง

มีรายงานพบว่าโอกาสของการปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลองจะสูงขึ้นเมื่อทำการทดลองกับหนูแรกเกิด ซึ่งเป็นข้อเท็จจริงที่มีประโยชน์ในทางปฏิบัติไม่น้อย เนื่องจากไม่สามารถปฏิบัติได้จริง นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่า การปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลองอายุ 2 ถึง 3 สัปดาห์ ก็มีโอกาสสำเร็จมากขึ้นและมีโอกาสของการพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งมากขึ้นเช่นกัน<sup>67,68</sup> แต่ก็มีรายงานที่ได้ผลขัดแย้งเช่นเดียวกัน<sup>66</sup>

## 2.3 สุขภาพของหนูทดลอง

หนูทดลองที่มีการติดเชื้อหรือสุขภาพไม่ดีนั้น พบว่า มีโอกาสของการปลูกเซลล์มะเร็งได้สำเร็จน้อยลง<sup>57,60,68</sup> เชื่อว่าอาจเกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการติดเชื้อทำให้มีการต่อต้านเซลล์แปลกปลอมขึ้น (graft rejection) นั่นเอง

## 3. ปัจจัยด้านกลวิธีการปลูกเซลล์มะเร็ง

### 3.1 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง

โดยทั่วไปเชื่อกันว่าการปลูกเซลล์มะเร็งในรูปของชิ้นเนื้อที่ตัดแบ่งมาจากก้อนมะเร็งที่ได้มาจากผู้ป่วยในทันที โดยต้องเลือกบริเวณที่ตัดอย่างดีและมีขนาดชิ้นเนื้อไม่เล็กเกินไปนั้น



จะมีโอกาสปลูกเซลล์มะเร็งได้ผลดีกว่าการปลูกเซลล์มะเร็งโดยใช้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย (cell suspension) อย่างไรก็ตามการปลูกเซลล์มะเร็งในรูปชิ้นเนื้อสดนั้นเป็นไปได้ยากในทางปฏิบัติและยังมีรายงานที่ได้ผลค่านว่าการปลูกเซลล์สายพันธุ์มะเร็ง (cell lines) ในรูปสารแขวนลอยสามารถทำให้เกิดการลุกลามและแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้ดีกว่าการปลูกชิ้นเนื้อมะเร็ง<sup>57</sup>

### 3.2 ตำแหน่งที่ปลูกเซลล์มะเร็ง

การปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลองสามารถทำได้หลายตำแหน่ง มีผู้ทำการทดลองฉีดเซลล์มะเร็งเข้าใต้ผิวหนัง เข้าหลอดเลือดดำ และหลอดเลือดแดง เข้าผนังเยื่อช่องท้อง ในหลอดลม ในหัวใจ สมอง ไต ม้าม<sup>53,57,68-79</sup> ผลการศึกษาพบว่า โอกาสของการปลูกเซลล์มะเร็งสำเร็จจะสูงขึ้นถ้าปลูกเซลล์มะเร็งในตำแหน่งเดียวกับโรคมะเร็งชนิดนั้น (orthotopic implantation) เช่นการปลูกเซลล์มะเร็งปอดโดยฉีดเข้าหลอดลม การปลูกเซลล์มะเร็งไตโดยฉีดเข้าไต เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นการทดลองที่ไม่มีกลุ่มควบคุมมาเปรียบเทียบ เชื่อว่าผลการศึกษาดังกล่าวเกิดจากผลของสิ่งแวดล้อมในระดับจุลภาค (microenvironment) ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

### 4. ปัจจัยด้านเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่มีโอกาสในการนำไปปลูกในสัตว์ทดลองได้สำเร็จมากนั้น ควรจะเป็นเซลล์มะเร็งที่อยู่ในระยะแบ่งตัวมากกว่าเซลล์มะเร็งที่ไม่อยู่ในวัฏจักรของเซลล์<sup>80</sup> และควรจะเป็นเซลล์มะเร็งที่มาจากต้นกำเนิดซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่มีวิวัฒนาการของเซลล์น้อยหรือไม่มี<sup>57,81</sup> นอกจากนี้โรคมะเร็งบางชนิดที่มีความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับฮอร์โมน เช่นโรคมะเร็งเต้านม โรคมะเร็งมดลูก เป็นต้น เซลล์สายพันธุ์ของมะเร็งเหล่านี้ ก็น่าจะมีความสัมพันธ์ดังกล่าวด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า เซลล์สายพันธุ์ของโรคมะเร็งที่มีการเจริญเติบโตสัมพันธ์กับฮอร์โมนบางชนิดสามารถเจริญเติบโตโดยไม่ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนอีกต่อไปก็ได้เช่นกัน<sup>82</sup>

สำหรับโรคมะเร็งของระบบทางเดินอาหารนั้น โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นโรคมะเร็งที่มีอัตราความสำเร็จในการปลูกเซลล์มะเร็งในหนู nude mice สูงมากถึงร้อยละ 44 ถึง 72<sup>55,57,83</sup> โดยเฉพาะเมื่อนำเซลล์มะเร็งมาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีการลุกลามของโรคไปมากแล้ว ส่วนโรคมะเร็งกระเพาะอาหารนั้นผู้ทำการทดลองพบว่าโอกาสสำเร็จในการปลูกเซลล์มะเร็งประมาณร้อยละ 45<sup>84</sup> สำหรับโรคมะเร็งตับนั้น ยังไม่มีรายงานที่กล่าวถึงเรื่องนี้

### ค. การปลูกเนื้อเยื่อในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous xenograft)

การปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง nude mice เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1969<sup>52</sup> โดยเป็นการปลูกเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous implantation) หลังจากนั้น เป็นต้นมา การปลูกเซลล์มะเร็งในหนูทดลองก็นิยมทำกันมากที่สุดที่เนื้อเยื่อในชั้นใต้ผิวหนัง สาเหตุสำคัญเนื่องจากเป็นตำแหน่งที่สังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ง่าย และมีโอกาสปลูกเซลล์มะเร็งสำเร็จได้มาก

ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนังนั้น โดยทั่วไปพบว่า จะโตขึ้นเป็นก้อนมะเร็งเฉพาะที่ (local nodule) หุ้มด้วยแคปซูลซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ถ้าก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น ก็อาจลุกลามทำให้เกิดแผลขึ้นที่ผิวหนังเนื้อก้อนมะเร็ง ด้านล่างของก้อนมะเร็งมักจะไม่มีการยึดติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านล่าง ทำให้ก้อนมะเร็งถูกจับเคลื่อนย้ายได้อิสระ (freely mobile) และมีหลอดเลือดขนาดกลางและเล็กแตกแขนงมาหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็งโดยรอบอย่างมาก<sup>85</sup>

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง nude mice ยังมีความเหมาะสมต่อการปลูกเนื้อเยื่ออย่างมากด้วย ผิวหนังของหนู nude mice มีลักษณะที่แตกต่างอย่างมากจากผิวหนังของมนุษย์ โดยชั้นหนังกำพวด (epidermis) และชั้นผิวหนัง (dermis) นั้นไม่แตกต่างกับผิวหนังของมนุษย์ แต่ลึกลงไปจากชั้นผิวหนังของหนู nude mice จะเป็นชั้นกล้ามเนื้อของผิวหนัง เรียกว่า panniculus musculosus ซึ่งช่วยในการเคลื่อนไหวของผิวหนังได้เช่นเดียวกับกล้ามเนื้อที่หนังศีรษะและด้านหน้าของลำคอของมนุษย์ ลึกลงไปจากชั้น panniculus musculosus จะเป็นชั้นพังผืดบางๆ ซึ่งยึดด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจำนวนน้อยกับชั้นกล้ามเนื้อของหนู ทำให้ผิวหนังของหนูทดลอง nude mice นั้นสามารถยืดหยุ่นได้ดีตามการเคลื่อนไหวของหนู ชั้นพังผืดบางๆ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ปริมาณน้อยนี้ยังถูกดึงให้กว้างออกเป็นพื้นที่ว่างสำหรับปลูกเนื้อเยื่อต่างๆได้ง่าย

อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ปลูกในชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของหนูทดลองยังมีความแตกต่างกันไปตามตำแหน่งของผิวหนังอีกด้วย มีรายงานพบว่า เซลล์มะเร็งที่ได้รับการปลูกในเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังบริเวณส่วนหน้าของลำตัวของหนูจะเติบโตได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่ปลูกในบริเวณส่วนหลังของลำตัวของหนู 3 ถึง 4 เท่า<sup>86</sup> และมีผู้พบว่า เซลล์มะเร็งที่ปลูกในส่วนท้องของลำตัว (ventral region) จะเติบโตได้เร็วกว่าเซลล์มะเร็งที่ปลูกในด้านหลัง (dorsal region) ของลำตัว แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งที่ปลูกในด้านซ้ายและขวาของลำตัวของหนูทดลอง สาเหตุของความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

### III เอ็นไซม์ matrix metalloproteinases และสารยับยั้ง (inhibitors)

การกำหนดโอกาสในการรักษาและวิธีการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งส่วนใหญ่ที่มาพบแพทย์นั้นมักจะทำได้ตั้งแต่ก่อนเริ่มการรักษา โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วโลกในปัจจุบันยังคงมาพบแพทย์เมื่อมีการแพร่กระจายของโรคเกิดขึ้นมาก่อนแล้วและเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้การรักษาให้หายขาดนั้นเป็นไปได้ไม่ได้ การรักษาด้วยยาชนิดใดๆ ในปัจจุบันก็มักจะไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมดความรู้ความเข้าใจในเรื่องของกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของการแพร่กระจายของโรคมะเร็งจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการแก้ปัญหาในอนาคต

สารโครงสร้างพื้นฐานนอกเซลล์ (extracellular matrix, ECM) เป็นโครงร่างภายนอกที่ประกอบขึ้นด้วยส่วนประกอบพื้นฐานที่สำคัญได้แก่ คอลลาเจน (collagens), กลัยโคโปรตีน (glycoproteins) และโปรตีโอกัลยแคน (proteoglycans) โครงร่างเหล่านี้เป็นแหล่งให้เซลล์ปกติรวมทั้งเซลล์มะเร็งฝังตัวอยู่เป็นรูปร่างที่มั่นคงแน่นอน การเปลี่ยนรูปร่างของเนื้อเยื่อใดๆ จำเป็นต้องมีการสลาย ECM เหล่านี้ออกก่อน ดังเช่นที่พบในพยาธิวิทยาของโรคหลายชนิด เช่น ข้ออักเสบ โรคหลอดเลือดหัวใจ การเกิดแผล รวมทั้งโรคมะเร็ง การแพร่กระจายของโรคมะเร็งจะเกิดขึ้นได้ต้องมีกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ ECM อย่างกว้างๆ 3 กระบวนการ ได้แก่ การย่อยสลายโปรตีนที่ประกอบเป็น ECM การจับติดและปลดปล่อยเซลล์มะเร็งจาก ECM และการเคลื่อนที่ผ่านรอยเสียหายของ ECM<sup>87-89</sup> มีเอ็นไซม์ หลายกลุ่มที่สามารถย่อยสลาย ECM ได้ แต่เอ็นไซม์กลุ่มที่สำคัญที่สุดคือเอ็นไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs)<sup>90-92</sup>

#### ก. กลุ่มเอ็นไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs)

กลุ่มเอ็นไซม์ MMPs เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ซึ่งพบได้จากการศึกษาระดับอนุชีววิทยา ทั้งในเนื้อเยื่อจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และต้นไม้<sup>93</sup> สำหรับในมนุษย์นั้นเอ็นไซม์กลุ่มนี้มีบทบาทที่สำคัญหลายประการทั้งในกระบวนการที่เกิดขึ้นตามปกติและที่เกิดจากโรค เช่น การสมานแผล การปรับเปลี่ยนรูปร่างของกระดูก การสร้างหลอดเลือดใหม่ โรคกลุ่มที่มีการอักเสบเรื้อรังและโรคจากการเสื่อมของอวัยวะต่างๆ เป็นต้น การศึกษาในปัจจุบันทราบว่าเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มี 16 ชนิด ที่ทราบโครงสร้างการเรียงตัวของกรดอะมิโนและบทบาทที่ชัดเจนแล้ว และยังมีอีกหลายชนิดที่อยู่ในระหว่างการศึกษาดังตารางที่ 3

รูปร่างโครงสร้างของเอนไซม์ MMPs แสดงไว้ในรูปที่ 2 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทั้งหมดจะมีโครงสร้างร่วมที่เหมือนกันคือจะต้องมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนที่เรียกว่า โดเมน (domain) ดังต่อไปนี้<sup>94</sup>

1. prodomain เป็นส่วนที่มีกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) เป็นส่วนประกอบ ส่วนนี้มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ถ้าเอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ ก็จะต้องถอดส่วนประกอบนี้ออกเสียก่อนเท่านั้น
2. catalytic domain ซึ่งมีตำแหน่งที่จับกับโลหะ (metal-binding sites) เป็นส่วนประกอบ

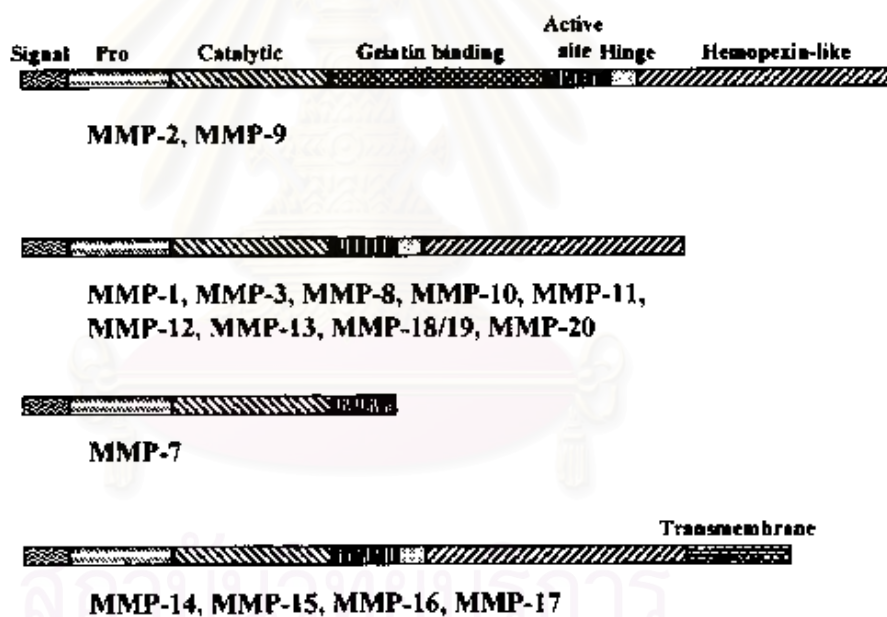
MMP number	Common Name	Molecular weight (kDa) <sup>a</sup> full/pro/active	Substrates
1	Interstitial Collagenase	54.0/51.8/42.6	Types I, II, III, VII and X collagen
2	Gelatinase A	73.9/71.0/62.1	Gelatin, types I, IV, V, and X collagen, laminin V
3	Stromelysin 1	54.0/52.2/42.8	Types III, IV, IX, And X Collagen, gelatin, proMMP-1, Laminin, proteoglycans
7	Matrilysin	29.7/27.9/19.1	Gelatin, fibronectin, proMMP-1
8	Neutrophil Collagenase	53.4/51.1/42.2	Types I, II, III, IV and X Collagen
9	Gelatinase B	78.4/76.3/66.6 <sup>d</sup>	Gelatin, types I, IV V and X collagen
10	Stromelysin 2	94/92/82 54.2/52.3/43.0	Types III, IV, IX, and X Collagen, gelatin, proMMP-1, Laminin, proteoglycans
11	Stromelysin 3	54.6/51.1/44.3	Alpha-1-antiprotease Elastin
12	Metalloelastase	54.0/52.3/42.8	Types I, II, III, VII and X
13	Collagenase 3	53.8/51.7/42.2	Collagen ProMMP-2, gelatin,

14	MT1-MMP	65.9/63.8/53.9	collagens ProMMP-2
15	MT2-MMP	75.8/71.2/61.2	ProMMP-2
16	MT3-MMP	69.5/65.8/55.7	?
17	MT4-MMP	?/61.7/53.7	?
18/19	RASI-1	57.4/54.7/46.5	Amelogenin
20	Enamelysin	54.4/52.1/42.6	

<sup>a</sup> Molecular weights are given for full-length, proenzyme, and active forms based on amino acid sequence

<sup>d</sup> MMP-9 is significantly glycosylated. The first set of molecular weights is for the unglycosylated forms, the latter set for the glycosylated forms

ตารางที่ 3 เอ็นไซม์ในกลุ่ม MMPs



รูปที่ 2 โครงสร้างของเอ็นไซม์ในกลุ่ม MMPs (นำมาจากเรื่อง Matrix metalloproteinases and metastasis ใน Cancer Chemotherapy and Pharmacology 1999 vol. 43 (suppl) หน้า S44)

3. active site domain ซึ่งมีตำแหน่งที่จับอย่างจำเพาะกับธาตุสังกะสี (Zinc) เป็นส่วนประกอบ

นอกจากนั้นเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs แต่ละชนิดยังมีโครงสร้างในส่วนอื่นที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในรูปที่ 2 รายละเอียดจะไม่กล่าวถึงในบทความนี้

โครงสร้างส่วนที่มีบทบาทสำคัญและเป็นเอกลักษณ์ของเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs คือ active site domain และ prodomain active site domain ประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงตัวกัน 50-55 ตำแหน่ง โดยมีกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidines) 3 ตำแหน่งในจุดที่จับกับไอออนของธาตุสังกะสีทั้ง 3 จุด ส่วน prodomain นั้นจะมีกรดอะมิโนซิสเตอีนอยู่ในจุดที่สี่ของเอ็นไซม์ที่จับกับไอออนของธาตุสังกะสี ในตำแหน่งนี้ของ prodomain จะมีอนุมูล sulphhydryl มาจับกับไอออนของธาตุสังกะสีอีกครั้งหนึ่งที่ทำให้เอ็นไซม์ไม่ทำงาน<sup>95</sup> การกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์นี้จะต้องมีกลไกในการสลายพันธะระหว่างธาตุสังกะสีและธาตุกำมะถัน (Zinc- sulfur bond) ทำให้เกิดการหลุดออกของลำดับกรดอะมิโนส่วนที่มีซิสเตอีนอยู่ด้วย จึงจะได้เอ็นไซม์ที่ทำงานได้<sup>96</sup>

เอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ส่วนใหญ่จะถูกหลั่งออกจากเซลล์ในรูปแบบที่ไม่ทำงาน และต้องผ่านการกระตุ้นตามที่กล่าวแล้ว สำหรับเอ็นไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่ม MMPs จะถูกกระตุ้นโดย plasmin และ urokinase-type plasminogen activator<sup>94,96</sup> นอกจากนี้ยังมีเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs บางชนิดที่สามารถกระตุ้นเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ชนิดอื่นได้<sup>97,98</sup> หรือถูกกระตุ้นด้วยสารอื่นๆได้<sup>99</sup> เอ็นไซม์ที่ถูกกระตุ้นแล้วแต่ละชนิดก็จะมีจำเพาะในการย่อยสลายโปรตีนบางชนิดของ ECM ด้วยเช่นกัน<sup>90,100</sup> ดังแสดงในตารางที่ 3

ส่วน catalytic domain เป็นส่วนประกอบที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน ความรู้เรื่องโครงสร้างของส่วนประกอบส่วนนี้เป็นพื้นฐานในการออกแบบสังเคราะห์ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์กลุ่มนี้<sup>101</sup> ยาเหล่านี้บางชนิดได้รับการทดลองในระดับคลินิกเพื่อรักษาโรคมะเร็งและอาการข้ออักเสบแล้วในปัจจุบัน

ในภาวะปกติเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs จะถูกควบคุมอย่างมากทั้งในด้านการหลั่งและการทำงาน โดยทั่วไปเอ็นไซม์นี้จะพบได้ในเนื้อเยื่อทั่วไปในปริมาณที่น้อยมาก และจะมีปริมาณที่มากขึ้นเฉพาะเมื่อมีกระบวนการบางอย่างเกิดขึ้นในร่างกายดังที่กล่าวแล้วเท่านั้น เอ็นไซม์นี้จะถูกสร้างและคัดหลั่งออกจากเซลล์ตามวิธีการปกติยกเว้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอันได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ macrophage ซึ่งจะสามารถเก็บเอ็นไซม์นี้ไว้ใน secretory granule และปล่อยออกมาใช้ในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น การควบคุมการทำงานของเอ็นไซม์กลุ่มนี้มีหลายขั้นตอน เริ่มจากการทำงานของ prodomain ภายในเอ็น

ชั้ยม์เอง และการควบคุมภายนอกเซลล์โดยอาศัยสารยับยั้งตามธรรมชาติที่เรียกว่า tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)<sup>102,103</sup>

ข. สารยับยั้งการทำงานของเอ็นชั้ยม์ในกลุ่ม MMPs ชนิด tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)

ปัจจุบันมีการค้นพบ สารในกลุ่ม TIMPs แล้วสี่ชนิด สารเหล่านี้เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งมีน้ำหนักเพียง 21 ถึง 28 กิโลดาลตันและมีส่วนประกอบสำคัญเป็นพันธะ disulfide จำนวนหกพันธะ ส่วนใหญ่ของ TIMPs จะสามารถจับและยับยั้งการทำงานของเอ็นชั้ยม์ในกลุ่ม MMPs ทุกชนิด<sup>94</sup> โดยให้ส่วนปลายของ TIMPs ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจับกับส่วนของ active site ของ MMPs ซึ่งจับอยู่กับธาตุสังกะสี<sup>104</sup> เชื่อว่าพันธะ disulfide ซึ่งเป็นพันธะที่จับกันอย่างแข็งแรงในโครงสร้างของ TIMPs มีส่วนอย่างมากในการยับยั้งการทำงานของ MMPs อย่างไรก็ตาม TIMPs แต่ละชนิดก็มีความสามารถที่จะจับกับเอ็นชั้ยม์ในกลุ่ม MMPs แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น TIMP-2 จะสามารถจับกับ MMP-2 ได้ดี หรือ TIMP-1 สามารถจับกับ MMP-9 ได้ดี เป็นต้น

ค. การทำงานของเอ็นชั้ยม์กลุ่ม MMPs

เอ็นชั้ยม์ในกลุ่ม MMPs ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกจากหางของลูกอ๊อด ในช่วงทศวรรษที่ 60<sup>105</sup> ระหว่างการเจริญเติบโตของกบจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัยนั้นหางของลูกอ๊อด ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนจำนวนมากจะค่อยๆ หดสั้นลงโดยอาศัยเอ็นชั้ยม์ย่อยคอลลาเจน (collagenase) หลังจากนั้นก็มีผู้ค้นพบหน้าที่ของเอ็นชั้ยม์กลุ่ม MMPs ในระบบต่างๆ ของร่างกายตามปกติอีกมากมาย โดยปกติเอ็นชั้ยม์กลุ่มนี้จะมีอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ในของผู้ใหญ่ ปริมาณที่น้อยมาก และจะเพิ่มปริมาณขึ้นเฉพาะเมื่อมีการกระตุ้นเท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน เนื่องจากเชื่อว่าเอ็นชั้ยม์นี้โดยทั่วไปน่าจะมีส่วนบทบาทน้อย การรักษาจึงน่าจะมีผลต่อการทำงานของร่างกายตามปกติเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาต้านเอ็นชั้ยม์กลุ่ม MMPs พบว่ามีผลทำให้เกิดอาการปวดข้อ (arthralgia) ได้ จึงเชื่อว่าเอ็นชั้ยม์ชนิดนี้อาจมีบทบาทบางประการต่อการทำงานของระบบข้อของร่างกายซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัด<sup>106,107</sup>

บทบาทของเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ต่อการดำเนินโรคของโรคมะเร็งมีดังต่อไปนี้

### 1. บทบาทด้านการลุกลามและการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง

เอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ที่สามารถผลิตโดยการลอกแบบทางพันธุกรรมขึ้นมาได้เป็นครั้งแรกนั้นพบว่าเกิดจากยีนที่สามารถกระตุ้นการทำงานด้วยยีนมะเร็ง (oncogene)<sup>108</sup> หลังจากนั้นผู้ค้นพบว่าในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งมีเอ็นไซม์กลุ่มนี้ในปริมาณมาก และพบว่าความสามารถในการแทรกตัวของเซลล์มะเร็งเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยรอบนั้นสัมพันธ์กับปริมาณของเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs<sup>109,110</sup> ทำให้มีสมมติฐานว่าเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ซึ่งสามารถย่อยสลาย ECM ได้นี้เป็นเอ็นไซม์ที่เซลล์มะเร็งใช้ในการลุกลามของมะเร็งเข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียงรวมทั้งผนังหลอดเลือดชั้น basement membrane เข้าสู่หลอดเลือดและเกิดการแพร่กระจายของโรคในที่สุด การทดลองทั้งในระดับเซลล์และในสัตว์ทดลองในเวลาต่อมาก็ได้พิสูจน์ว่าสมมติฐานนี้เป็นความจริง รวมทั้งยังพบว่าการให้สาร TIMPs หรือกระตุ้นการทำงานของยีนที่สร้าง TIMPs ก็ช่วยยับยั้งการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกัน<sup>111-113</sup>

การทดลองในเวลาต่อมาโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า intravital video microscopy (IVVM)<sup>114</sup> พบว่าเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นให้สร้าง TIMPs และฉีดเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรงก็สามารถแพร่กระจายผ่านผนังหลอดเลือดเข้าสู่อวัยวะอื่นได้เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งอื่นที่มีการแพร่กระจาย<sup>115</sup> แต่เซลล์มะเร็งที่สร้าง TIMPs ออกมามากนั้นจะไม่สามารถเติบโตจนมีขนาดที่ตรวจพบได้ง่ายเช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งปกติอื่นๆ ในอวัยวะที่มีการแพร่กระจายดังนั้นจึงเชื่อว่ากระบวนการแพร่กระจายของโรคมะเร็งซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและต้องการการทำงานของสารหลายชนิดในหลายขั้นตอนร่วมกันนั้น เอ็นไซม์กลุ่ม MMPs อาจไม่ได้มีผลควบคุมการแทรกตัวของเซลล์มะเร็งผ่านเข้าออกผนังหลอดเลือดทั้งหมด แต่ขณะเดียวกันกลับมีผลต่อการวางรากฐาน (tumor establishment) และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในอวัยวะแห่งใหม่ด้วย

### 2. บทบาทต่อการกำเนิดมะเร็ง (tumorigenesis)

โดยทั่วไปแม้จะพบว่าเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs มีปริมาณและชนิดที่พบสูงชันมากในโรคมะเร็งที่มีการลุกลามไปมากหรือมีการแพร่กระจาย แต่สำหรับในเซลล์มะเร็งระยะเริ่มกำเนิดโรคมักพบว่าปริมาณของเอ็นไซม์กลุ่มนี้สูงขึ้นเช่นกัน<sup>92</sup> การสร้างเอ็นไซม์กลุ่มนี้ในโรคมะเร็งระยะเริ่มกำเนิดโรคมักไม่ได้เกิดจากเซลล์มะเร็งเพียงอย่างเดียว แต่ยังเกิดจากเซลล์รวมทั้งก้อนมะเร็ง (tumor stroma) อีกด้วย<sup>90,116</sup> เซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เซลล์ระยะภูมิคุ้มกันที่แทรกตัวเข้าหาก้อนมะเร็ง และเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งล้วนแต่สามารถหลั่งเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ได้ทั้งสิ้น เชื่อกันว่าส่วนหนึ่งเกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อก้อนมะเร็งระยะเริ่มแรกเสมือนเป็นแผล (wound) จึงทำให้เกิดกระบวนการ



การสลายเพิ่มขึ้น และส่วนหนึ่งจากการหลั่งปัจจัยกระตุ้นเซลล์รอบข้างจากเซลล์มะเร็งเอง<sup>117</sup> การสร้างเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs นี้ยังเกิดในโรคเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign tumor) ได้เช่นกัน มีรายงานในสัตว์ทดลองที่ถูกระตุ้นให้สร้างเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs เฉพาะบางชนิดมากผิดปกติแล้วพบว่า มีผลส่งเสริมการกำเนิดมะเร็งของโรคมะเร็งหลายชนิดได้จริง<sup>118-120</sup> การส่งเสริมการวางรากฐานและการเจริญเติบโตของโรคมะเร็งในระยะเริ่มกำเนิดโรคนี้เกิดจากเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ทั้งที่มาจากเซลล์มะเร็งและเซลล์รอบข้าง<sup>121</sup>

### 3. บทบาทในการสร้างหลอดเลือดใหม่

เมื่อเซลล์มะเร็งเติบโตมากขึ้นก็จำเป็นต้องมีหลอดเลือดหล่อเลี้ยงมากขึ้น เชื่อว่าเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs มีบทบาทในด้านนี้เช่นกัน มีรายงานในสัตว์ทดลองพบว่า การให้สารยับยั้งเอ็นไซม์ MMP-2 หรือการใช้หนูทดลองที่ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ MMP-2 ในการปลูกเซลล์มะเร็งจะทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่น้อยลง เซลล์มะเร็งมีการเติบโตช้าลงได้จริง<sup>122,123</sup>

### 4. บทบาทในการควบคุมทางชีววิทยาต่อเซลล์มะเร็ง

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ECM ไม่ได้เป็นเพียงโครงร่างให้เซลล์อาศัยฝังตัวเท่านั้น แต่ผิวสัมผัสระหว่างเซลล์และ ECM ยังมีตัวรับที่ผิวของเซลล์ เป็นสารที่เรียกว่าอินทิกริน (integrin) โดยมีการส่งสัญญาณระหว่าง ECM และเซลล์ผ่านทางตัวรับดังกล่าว สัญญาณดังกล่าวจะช่วยควบคุมความอยู่รอด การเจริญเติบโต วิวัฒนาการและการเคลื่อนย้ายของเซลล์เพื่อปรับตัวตามสภาพแวดล้อม

การย่อยสลาย ECM โดยเอ็นไซม์ในกลุ่ม MMPs จะมีผลในระดับอนุชีววิทยาหลายประการ ได้แก่ เป็นการกระตุ้นเอ็นไซม์กลุ่ม MMPs ที่ยังอยู่ในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์เป็นรูปที่ออกฤทธิ์ได้ดี การย่อยสลาย ECM ยังเป็นการช่วยให้จุดยึดเกาะของ ECM กับตัวรับที่ผิวของเซลล์ ซึ่งเคยถูกปิดซ่อนไว้ไม่ได้ทำหน้าที่ให้เปิดเผยออกมา รวมทั้งยังเป็นการสลาย ECM ได้ขึ้นส่วนย่อยของ ECM จุดยึดเกาะของ ECM ที่เปิดเผยออกมาใหม่และขึ้นส่วนย่อยของ ECM เหล่านี้อาจส่งสัญญาณเข้าสู่ตัวรับของเซลล์ที่แตกต่างไปจากเดิม ซึ่งอาจเป็นการทำให้เซลล์มะเร็งได้รับสัญญาณที่ช่วยการรอดชีวิตและการเคลื่อนย้ายของเซลล์ได้<sup>124,125</sup> การย่อยสลาย ECM ยังอาจทำให้ปัจจัยช่วยการเจริญเติบโต (growth factor) ที่สร้างจาก ECM และเก็บไว้ในรูปไม่ออกฤทธิ์ ถูกปลดปล่อยออกมาในรูปที่ออกฤทธิ์ได้อีกด้วย<sup>126</sup> ทั้งหมดนี้แสดงว่าการย่อยสลาย ECM นั้นนอกจากจะเป็นการเปิดช่องว่างให้เซลล์มะเร็งแล้วยังเป็นการปรับสภาพแวดล้อมทางชีววิทยาให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอีกด้วย

### 5. บทบาทในการย่อยสลายโปรตีนอื่น ๆ นอกจาก ECM

การทำงานของเอนไซม์กลุ่ม MMPs นั้นนอกจากจะกระตุ้นเอนไซม์ชนิดอื่นในกลุ่ม MMPs เหมือนกันแล้ว ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนกลุ่มอื่นได้ เช่นเดียวกับที่เอนไซม์กลุ่มอื่น สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม MMPs เช่นกัน<sup>127</sup>

#### IV Dorsal Skin Chamber และ Intravital Microscopy

intravital microscopy หมายถึงวิธีการทำการทดลองในสัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่หรือถูกทำให้สลบแต่ยังมีชีวิต แล้วทำการศึกษาระบบการไหลเวียนเลือดในระดับจุลภาคโดยใช้การตรวจโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์<sup>128</sup>

Dorsal skin chamber เป็นเครื่องมือที่ถูกออกแบบมาสำหรับการศึกษากการไหลเวียนเลือดที่ผิวหนังของสัตว์ทดลอง โดยการประกบอุปกรณ์ดังกล่าวกับผิวหนังของสัตว์ทดลอง และศึกษาหลอดเลือดที่ถูกตรึงไว้ภายใน

การประยุกต์ใช้ dorsal skin chamber ในสัตว์ทดลองเริ่มมีขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1934 โดย Williams และถูกปรับปรุงอีกครั้งในปี ค.ศ. 1943 โดย Algire ซึ่งได้ทดลองใช้อุปกรณ์ดังกล่าวกับหนู mouse ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 Yamaura ได้ประยุกต์ใช้อุปกรณ์นี้กับหนู rat และในปี ค.ศ. 1979 Papenfuss<sup>129</sup> ได้ริเริ่มใช้โลหะอลูมิเนียมในการผลิตอุปกรณ์นี้ หลังจากนั้นเป็นต้นมา ก็มีการนำ dorsal skin chamber ใช้ในการศึกษาหลอดเลือดระดับจุลภาคในเนื้อเยื่อทั้งของสัตว์ทดลองเอง และเนื้อเยื่อที่ถูกนำมาปลูกในสัตว์ทดลอง ซึ่งมีทั้งเนื้อเยื่อของโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ<sup>130,131</sup>

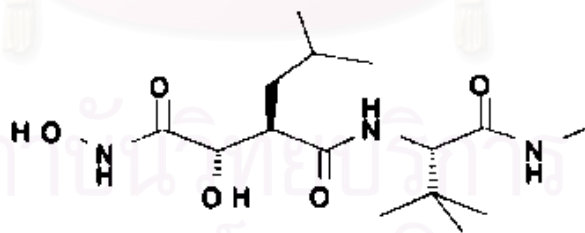
การนำ dorsal skin chamber มาใช้ในการศึกษากลไกของโรคร่วมกับ intravital microscopy ทำให้เกิดความก้าวหน้าในการศึกษากลไกของโรคและภาวะต่าง ๆ อย่างมาก ได้แก่ การเจริญเติบโตและการสร้างหลอดเลือดใหม่ของโรคมะเร็งและโรคอื่น ๆ การปลูกถ่ายและบำรุงรักษาอวัยวะที่ปลูกใหม่ รวมทั้งกลไกการต่อต้านอวัยวะที่ปลูกใหม่ พยาธิวิทยาของโรคออโตอิมมูนและโรคหลอดเลือด การหายของบาดแผล การประยุกต์ใช้อุปกรณ์เหล่านี้ในการศึกษาหลอดเลือดระดับจุลภาคจึงช่วยทำให้เกิดความเป็นไปได้ในการศึกษาพยาธิสรีรวิทยาของหลอดเลือดที่มีความเปลี่ยนแปลงได้ง่ายในสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นได้จริง ทั้งที่เป็นสิ่งที่ทำได้ยากจากการใช้วิธีการทดลองเดิมในอดีต

#### IV ยามาริมาสแตท (marimastat)

การสังเคราะห์ยายับยั้งเอนไซม์ MMPs เริ่มต้นขึ้นในช่วง 10 ถึง 15 ปีที่ผ่านมา ยาชนิดแรกในกลุ่มนี้คือยาบาติมาสแตท (Batimastat, BB-94) ซึ่งเป็นยาชนิดแรกที่มีการทดลองอย่างกว้างขวางในสัตว์ทดลองเช่นกัน ยาชนิดนี้มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ MMPs ได้อย่างกว้างขวาง (broad spectrum) ละลายน้ำได้เป็นบางส่วน และสามารถป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็งในหนูทดลองได้ดี รวมทั้งชะลอการลุกลามเฉพาะที่และการสร้างเส้นเลือดใหม่ซึ่งจะทำให้ก้อนมะเร็งโตขึ้นได้อีกด้วย

ยารุ่นต่อมาคือยามาริมาสแตท (marimastat, BB-16) จะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น จากคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีขึ้นนี้เชื่อกันว่าทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งดีขึ้นเช่นกัน ยาชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ได้อย่างกว้างขวาง และอาจสามารถบริหารยาด้วยการรับประทานได้ต่างจากยาในรุ่นแรก เนื่องจากยายับยั้งเอนไซม์ MMPs เหล่านี้จะเห็นผลได้เมื่อมีการใช้เป็นเวลาานแล้วพบว่าก้อนมะเร็งมีขนาดไม่โตขึ้น ดังนั้นการบริหารยาด้วยการรับประทานน่าจะเป็นวิธีที่ดีกว่า การฉีดยาทางเส้นเลือดดำหรือกล้ามเนื้อ จึงทำให้มีข้อมูลจากการวิจัยในด้านประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของยาอยู่มากที่สุด รวมทั้งได้รับการทดลองในผู้ป่วยโรคมะเร็งจริงแล้วในบางรายงานโดยเป็นการทดลองในระยะที่สาม (phase III trial) ผลการวิจัยพบว่ายาชนิดนี้มีช่วงเวลาครึ่งชีวิตในการกำจัดยา (elimination half-life) เป็น 7 ถึง 10 ชั่วโมง มีผลข้างเคียงน้อย

ยามาริมาสแตทหรือชื่อในการทดลองว่า BB-2516 เป็นยาที่ออกฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม MMPs ทุกชนิด (broad spectrum) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท British Biotech Pharmaceuticals จำกัด แห่งเมืองออกซ์ฟอร์ด ประเทศอังกฤษ ปัจจุบันเป็นยาภายใต้สิทธิบัตรของบริษัท Schering-Plough แห่งประเทศสหรัฐอเมริกา



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของยามาริมาสแตท

สูตรโครงสร้างของยาชนิดนี้แสดงในรูปที่ 2 สูตรโมเลกุลของยาชนิดนี้คือ  $C_{15}H_{29}N_3O_5$  ลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีขาว (white crystalline powder) สามารถละลายน้ำได้ด้วย ความเข้มข้นไม่เกิน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เป็น 3.2 และไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.5 ตัวยานี้ที่นำมาใช้กับมนุษย์จะอยู่ใน รูปสารแขวนลอยในน้ำมัน (oil suspension) ซึ่งบรรจุอยู่ในแคปซูล

#### ก. การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาในสัตว์ทดลอง

ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของยามาริมาสแตทในสัตว์ทดลองนั้นมีในหนู (rat) และ marmoset สำหรับในหนู rat พบว่าการป้อนยาทางปาก (oral gavage) ด้วยขนาด 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จะได้ค่า oral bioavailability โดยเฉลี่ยเป็นร้อยละ 18 ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์จากการทดลองป้อนยาในขนาดนี้เป็นเวลา 29 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4 ส่วนใน marmoset ค่า oral bioavailability จากการป้อนยาทางปากด้วยขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นร้อยละ 50 และที่ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นร้อยละ 22 ถึง 35 ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์จากการทดลองป้อนยาในขนาดทั้ง 2 ขนาดนี้เป็นเวลา 28 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5

#### ข. การสัณดาป (Metabolism) ของยามาริมาสแตท

ยามาริมาสแตทถูกสัณดาปที่ตับเป็นสำคัญ ขบวนการสัณดาปของยาชนิดนี้ไม่ผ่านการ ทำงานของเอนไซม์ไมโทโครม (cytochrome) P450 ผลิตผลหลักจากการสัณดาปของยา (major metabolite) คือสาร carboxamide (BB-3195) ซึ่งไม่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์กลุ่ม MMPs ผลิตผลรองจากการสัณดาปของยา (minor metabolite) คือ BB-2987 ซึ่งเกิดจากการสัณดาปของ BB-3195 อีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีผลิตผลรองจากการสัณดาป ของยาหลายชนิด การเกิดผลิตผลจากการสัณดาปเหล่านี้พบว่าไม่แตกต่างกันจากการทดลอง ในสัตว์ต่างสปีชีส์รวมทั้งมนุษย์ แต่พบว่าคนและหนู rat มีการสัณดาปยาเร็วกว่า marmoset

Time point	Sex	n	C <sub>max</sub> (µg/l)	T <sub>max</sub> (min)	AUC <sub>0-24 hr</sub> (µg.hr/l)	T <sub>1/2</sub> (hrs)
Day 1	Male	5	2,068	15	4,044	505
	Female	5	1,754	15	3,835	4.5
Day 2	Male	5	690	15	2,525	-
	Female	5	946	15	2,879	-

ตารางที่ 4 ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยามาริมาสแตทในหนู rat

Time point	Sex	n	C <sub>max</sub> (µg/l)		AUC <sub>0-24 hr</sub> (µg.hr/l)	
			10 mg/kg	100 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg
Day 1	Male	3	2,2187	7,371	6,350	27,194
	Female	3	1,682	12,656	4,983	36,822
Day 2	Male	3	1,882	8,803	6,046	24,684
	Female	3	1,816	9,093	5,010	25,904

ตารางที่ 5 ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยามาริมาสแตทใน marmoset

#### ค. พิษวิทยา (toxicology)

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าค่าขนาดยาสูงสุด (maximum tolerated dose) คือ ประมาณ 100 ถึง 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน การทดลองให้ยานี้ร่วมกับยาเคมีบำบัดหลายชนิดที่ใช้บ่อย เช่น cisplatin, 5-FU, doxorubicin, gemcitabine เป็นต้น ไม่พบว่ามี การส่งเสริมการเกิดผลข้างเคียงในระยะสั้นซึ่งกันและกัน

การทดลองในหนู rat ด้วยการให้ยาขนาด 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน และ 26 สัปดาห์ไม่พบว่ามีผลข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้น

การทดลองใน marmoset ด้วยการให้ยาขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่าเกิดผลข้างเคียงที่สำคัญคือการอักเสบของเส้นเอ็น (inflammation of tendons and joint ligaments) สังเกตได้จากการจำกัดการเคลื่อนไหว อาการเดินเซ และสัตว์ทดลองมีพฤติกรรมรุนแรงมากขึ้น เป็นการตอบสนองต่อความเจ็บปวด อาการเหล่านี้จะพบใน

ช่วงสัปดาห์ที่ 3 หลังจากเริ่มการให้ยา และพบในสัตว์ทดลองเกือบทุกตัว สำหรับ marmoset ที่ได้รับยาในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันนั้นไม่พบผลข้างเคียงดังกล่าวเลย ส่วนขนาดยา 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันนั้นทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ในสัตว์ทดลองส่วนน้อย

การศึกษาหลายฉบับได้รายงานการใช้ยามาริมาสแตทในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิด พบว่าผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือ อาการปวดตามกระดูกและกล้ามเนื้อ (musculoskeletal pain) และการอักเสบโดยเฉพาะที่เส้นเอ็น (tendinitis) อาการเหล่านี้จะพบได้บ่อยเมื่อมีการใช้ยานี้เป็นเวลานานในขนาดที่สูงมากกว่า 25 มิลลิกรัมวันละ 2 ครั้ง อาการอักเสบที่เส้นเอ็น (tendinitis) จะไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม NSAIDs และยาเพรดนิโซโลนในขนาดต่ำซึ่งหมายถึงขนาด 10 ถึง 20 มิลลิกรัมต่อวัน ในรายงานที่ให้ยาขนาด 200 มิลลิกรัมวันละ 2 ครั้ง ซึ่งสูงกว่าขนาดที่ใช้ในการวิจัยตามปกติถึง 20 เท่าจะพบมีระดับเอนไซม์ ALT ของตับสูงขึ้น

ผลข้างเคียงอีกประการหนึ่งจากการใช้ยานี้เป็นเวลานานที่สำคัญคือการเกิดรอยโรคในถุงน้ำดีของสัตว์ทดลอง การศึกษาในมนุษย์ไม่พบผลข้างเคียงดังกล่าว

ยามาริมาสแตทนี้ไม่พบว่าทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม หรือการกลายพันธุ์ใดๆ การใช้ยานี้ในเพศชายก็ไม่มีผลต่อสมรรถภาพทางเพศและการเจริญพันธุ์ แต่ไม่มีข้อมูลสำหรับผลของยาต่อการเจริญพันธุ์ของเพศหญิง การให้ยาดังกล่าวในหนู rat เพศเมียพบว่าทำให้เกิดความผิดปกติแต่กำเนิดของระบบหัวใจและหลอดเลือดรวมทั้งกระดูกของตัวอ่อนในครรภ์ของหนู rat ได้

#### ง. ขนาดของยามาริมาสแตท

ขนาดของยานี้ที่ใช้ในการทดลองรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์นั้นคือขนาด 10 มิลลิกรัมวันละ 2 ครั้ง

สำหรับในสัตว์ทดลองเนื่องจากค่า oral bioavailability ที่ดีมากในสัตว์ทุกชนิด ข้อเสนอแนะของบริษัท British Biotech Pharmaceuticals จึงกล่าวว่าสามารถลดขนาดของยาลงได้ถึง 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม<sup>132</sup>

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการ

### รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study design) แบบมีกลุ่มทดลองและกลุ่มเปรียบเทียบ (experimental controlled trial) โดยมีการปิดบังข้อมูลทั้งในผู้ทำการวัดผลการทดลองและผู้ถูกทดลองซึ่งเป็นสัตว์ทดลอง (double-blinded)

### ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

#### ก. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ (cell culture)

เซลล์ต้นแบบของมะเร็งตับจากมนุษย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ทั้งหมด คือเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma cell line) ที่มีชื่อว่า HEP G2 และ S 109 ซึ่งนำมาจากห้องทดลองของหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สาเหตุที่ต้องใช้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับสองสายพันธุ์เนื่องจากปัญหาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งไม่ได้ปริมาณเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เดียวทั้งหมดตามต้องการภายในเวลาการวิจัยอันจำกัด เซลล์ต้นแบบที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวจะถูกนำมาละลาย และเพาะเลี้ยงขยายจำนวนที่ห้องทดลองอณูชีววิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ โดยเลี้ยงในสารเพาะเลี้ยง (media) ซึ่งเป็นส่วนผสมของ fetal-bovine serum ในสารเพาะเลี้ยง Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ความเข้มข้นของ fetal-bovine serum เป็นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ส่วนผสมทั้งสองส่วนที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Gibco BRL จากประเทศสหรัฐอเมริกา

เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับ HEP G2 และ S109 จะถูกเพาะเลี้ยงภายในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจนได้ปริมาณมากเพียงพอ ก่อนที่จะนำไปนับจำนวนเซลล์ในหนึ่งหน่วยปริมาตรให้ได้จำนวน 80,000 เซลล์สำหรับหนูทดลองแต่ละตัว แล้วนำเซลล์มะเร็งตับจำนวนนี้ในสารเพาะเลี้ยงมาปั่นให้ตกตะกอน ดูดสารเพาะเลี้ยงส่วนเกินทิ้งจนได้ปริมาตรของเซลล์และสารเพาะเลี้ยงรวมกันประมาณ 5-10 ไมโครลิตร

## ข. การเลี้ยงหนูทดลอง

หนูทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้ทั้งหมดเป็นหนู nude mice สายพันธุ์ BALB/c-nu เพศผู้ 6 ตัวและเพศเมีย 3 ตัว ซึ่งสั่งซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติในขนาดอายุ 6 สัปดาห์ หนูทั้งหมดถูกจัดส่งมาในกล่องที่ปิดผนึกป้องกันการสัมผัสกับอากาศภายนอก และได้รับการนำเข้าห้องทดลองในทันทีที่มาถึง

ห้องทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ ห้องเลี้ยงหนูทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองและห้องทดลองทางหลอดเลือดจลคุณภาพของภาควิชาสรีรวิทยา ห้องเลี้ยงหนูทดลองเป็นห้องทดลองเดิมของศูนย์สัตว์ทดลองที่ได้รับการปรับปรุงให้อยู่ในสภาพจำกัดเชื้อ (Pathogen-limited)<sup>133</sup> ซึ่งหมายถึงสัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในภาชนะที่ไร้เชื้อ ได้รับอาหารและน้ำที่ไร้เชื้อ กรงเลี้ยงสัตว์ทดลองจะปิดด้วยฝาที่มีตัวกรองอากาศป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ (Filter cap) บุคลากรผู้ทำการดูแลสัตว์ทดลองจะต้องสวมผ้าปิดจมูกและปาก ถุงมือและเสื้อคลุมที่ผ่านการจำกัดเชื้อก่อนเข้าสู่ห้องทดลองเสมอ และควบคุมอุณหภูมิที่ 24-28 องศาเซลเซียส ควบคุมการเปิดปิดแสงไฟโดยเปิดไฟนาน 10 ชั่วโมง สลับกับปิดไฟนาน 14 ชั่วโมงทุกวัน และเปิดพัดลมระบายอากาศเป็นระยะ

หลังจากหนูทดลอง (nude mice) ถูกนำมาส่งที่ห้องทดลองแล้ว หนูทดลองจะถูกนำเข้าสู่อุโมงค์เลี้ยงหนูทันที และถูกนำไปใส่ในกรงเลี้ยงหนูซึ่งทำจากพลาสติกแข็งทนความร้อนได้ขนาด 20x30x20 เซนติเมตร ปิดด้วยตะแกรงโลหะซึ่งใช้วางอาหารและขวดบรรจุน้ำเลี้ยงหนู แล้วปิดอีกครั้งด้วย filter cap ซึ่งมีตัวกรองอากาศเป็นกระดาศกรงอย่างดี อุปกรณ์ทั้งหมดซึ่งได้แก่ กรงเลี้ยงหนู ตะแกรงโลหะ และ filter cap เป็นผลิตภัณฑ์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ

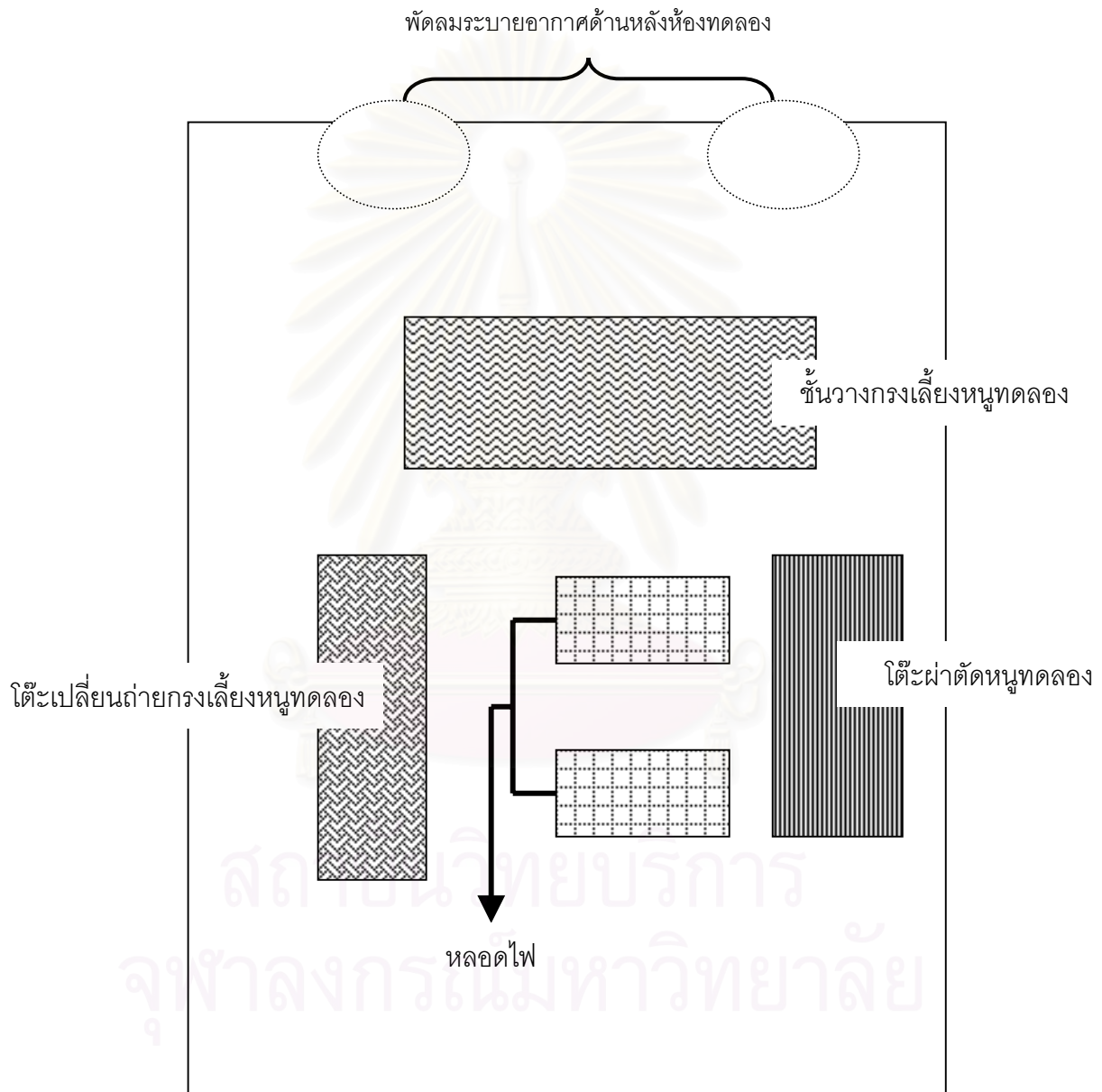
หนูแต่ละตัวจะถูกเลี้ยงในกรงเลี้ยงหนูกรงละ 1 ตัว พื้นกรงเลี้ยงหนูจะปูด้วยวัสดุรองนอน (beddings) ซึ่งเป็นขี้เลื่อยอบแห้งชั้นเล็กๆ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ด้วยความร้อน 130 องศาเซลเซียส นาน 30-45 นาที แต่ละกรงจะปูด้วยวัสดุรองนอนความหนา 1 เซนติเมตร และทำการเปลี่ยนกรงเลี้ยงหนูรวมทั้งวัสดุรองนอนทุกๆ 7 วัน

อาหารเลี้ยงหนูทดลอง nude mice เป็นอาหารที่สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เช่นเดียวกัน อาหารดังกล่าวเป็นอาหารเม็ดซึ่งได้รับการคำนวณสัดส่วนของสารอาหารสำหรับหนู mouse มาอย่างถูกต้อง และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เช่นเดียวกับกรงเลี้ยงหนูทดลองก่อนนำมาใช้เลี้ยงหนูทดลอง

น้ำที่ใช้เลี้ยงหนูทดลองเป็นน้ำแร่กรองบรรจุขวด แล้วนำมาปรับความเป็นกรดต่าง (pH) ด้วยการผสมกรดเกลือเข้มข้นจนได้ค่าความเป็นกรดต่างที่ประมาณ 2-2.5 เพื่อเป็นการ



ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และอาจมีผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองในเรื่องของ reticulo-endothelial cell clearance rate<sup>134</sup> รวมทั้งอาจช่วยให้หนูทดลองกินอาหารและดื่มน้ำได้ดีขึ้น มีน้ำหนักมากขึ้นได้ดี น้ำเลี้ยงหนูทดลองจะถูกเปลี่ยนทุก 3-4 วันเพื่อควบคุมความเป็นกรดต่างให้คงที่และป้องกันการอุดตันของหลอดดูน้ำจากเศษอาหารที่หนูทดลองบ้วนเข้าสู่ขวดน้ำ



รูปที่ 4 แผนผังห้องทดลองเลี้ยงหนูทดลอง nude mice

การเลี้ยงหนูทดลอง nude mice ทั้งหมดเป็นไปตามมาตรฐานการใช้และดูแลสัตว์ทดลองในการวิจัยทางการแพทย์และชีววิทยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศแคนาดา แผนผังห้องทดลองดังแสดงในรูปที่ 4

หนูทดลอง nude mice จะถูกเลี้ยงในสภาพดังกล่าวโดยไม่ทำการทดลองใดๆเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการปรับสภาพร่างกายรวมทั้งความเปลี่ยนแปลงของระบบการทำงานของร่างกายหนูทดลองให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และลดความเครียดจากการขนส่งและการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม

หนูทดลองที่มีสุขภาพดีหลังจากการเลี้ยงในห้องทดลองนาน 1 สัปดาห์ จะถูกนำมาฉีดยา atropine sulphate ขนาด 0.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าที่ใต้ผิวหนังบริเวณต้นขาหลังด้านขวาของหนูทดลองเพื่อเป็นการลดน้ำลายในปากหนูทดลองซึ่งอาจทำให้เกิดอาการสำลักและการหายใจล้มเหลวได้ระหว่างหมดสติ ที่งัวสักรูแล้วจึงนำมาทำให้หมดสติด้วยยาสลบ ketamine hydrochloride ขนาด 90 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าใต้เยื่อช่องท้อง (intraperitoneum) แล้วให้ดมยาสลบ ether ซ้ำเพื่อให้หมดความรู้สึกอย่างสมบูรณ์ก่อนจะนำมาผ่าตัดผิวหนังบริเวณสันหลังของหนูทดลอง แล้วเย็บ dorsal skin chamber ประคบเข้ากับแผ่นผิวหนังที่ถูกดึงยึดขึ้นบริเวณกลางหลังบริเวณ chamber ซึ่งปิดทับด้วยกระจกปิด (cover slip) จะถูกหยอดด้วยสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งตับและสารเพาะเลี้ยงในปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ก่อนแล้วในบริเวณใต้ผิวหนังของหนูทดลองที่ถูกดึงขึ้นตั้งฉากกับสันหลัง หลังจากนั้นหนูทดลองจะถูกทิ้งไว้ในกรงเลี้ยงหนูเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง

#### ค. การทดลอง (Methods)

หนูทดลอง nude mice ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งสิ้น 9 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดยหนูทดลองเพศผู้กลุ่มละ 2 ตัว เพศเมียกลุ่มละ 1 ตัว

หนูทดลองกลุ่มแรกถูกนำมาผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber ตามวิธีการที่กล่าวแล้วโดยไม่ใส่เซลล์มะเร็ง แล้วนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้วิธีการที่เรียกว่า Intravital Fluorescent Microscopy ภายใต้ภาวะหมดสติด้วยวิธีการฉีดและดมยาสลบเช่นเดิม เมื่อตรวจวัดค่ามาตรฐานของความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvessel density) ที่บริเวณใต้ผิวหนังที่สันหลังของหนูทดลองในอายุ 7 สัปดาห์ ก่อนที่จะทำให้หนูทดลองเสียชีวิตด้วยการใช้ยาดมสลบในปริมาณเกินปกติ

หนูทดลองที่เหลือ 6 ตัวจะถูกนำมาแบ่งเป็น 2 กลุ่มแต่ละกลุ่มมีหนูทดลองเพศผู้และเมียจำนวนเท่าๆกันดังกล่าวแล้วเพื่อป้องกันปัญหาจากความแตกต่างทางเพศของยาคที่ใช้ในการทดลองระหว่างหนูทั้งสองเพศ

ยา marimastat จะถูกนำมาผสมในน้ำดื่มของหนูทดลองด้วยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2-2.5 เช่นกัน แล้วแบ่งเป็น 3 ส่วนสำหรับหนูทดลอง 3 ตัวในกลุ่มทดลอง สำหรับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมจะได้รับการป้อนน้ำดื่มตามปกติ ทั้งนี้ลักษณะภายนอกของสารละลายยา marimastat นั้นไม่แตกต่างจากน้ำบริสุทธิ์แต่อย่างใด

สารละลายยา marimastat และยาหลอก (placebo) ซึ่งเป็นน้ำดื่มปกติสำหรับหนูทดลองนั้นจะถูกนำมาให้หนูทดลองทั้ง 2 กลุ่มโดยวิธีการสุ่ม ทั้งนี้โดยผู้ทำการทดลองจะไม่ทราบว่าเป็นยาจริงหรือยาหลอก ยาทั้งหมดจะถูกป้อนวันละ 2 ครั้งเท่าๆกัน คิดเป็นขนาดยา marimastat 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน การป้อนยาจะเริ่มต้นขึ้นหลังจากการผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber และเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจนครบ 7 วันนับจากเริ่มใส่เซลล์มะเร็ง หนูทดลองทั้ง 2 กลุ่มจะได้รับการเลี้ยงด้วยอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เหมือนกันทุกประการ

เมื่อครบ 7 วัน หลังจากใส่เซลล์มะเร็งแล้ว ปริมาณของเซลล์มะเร็งที่ทั้งหมดจะยังคงน้อยมากจนไม่ทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในหนูทดลองขึ้นได้ หนูทดลองจะถูกทำให้หมดสติอีกครั้งด้วยวิธีการเดิม แล้วนำมาตรวจด้วยวิธี Intravital Fluorescent Microscopy และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโทรทัศน์ลงในเทปบันทึกภาพ (video) หลังจากนั้นหนูทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตด้วยการใช้ยาดมสลบปริมาณเกินปกติ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักทุกตัว

เทปบันทึกภาพผลการตรวจหนูทดลองทุกตัวจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยการใช้ image program ซึ่งเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ค่าทางสถิติของตัวแปรต่างๆในภาพนิ่งที่ได้รับการสุ่มเลือกจากเทปบันทึกภาพ ภาพผลการตรวจของหนูทดลองทุกตัวจะถูกนำมาหาค่าความหนาแน่นของหลอดเลือด สำหรับเทปบันทึกภาพผลการตรวจของหนูทดลองในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมซึ่งมีการใส่เซลล์มะเร็งด้วยนั้นจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งจากตำแหน่งคงที่ 4 ตำแหน่ง ในภาพนิ่งที่มีเซลล์มะเร็งปรากฏอยู่ และถูกเลือกมาด้วยวิธีการสุ่มตรวจค่าความหนาแน่นของหลอดเลือดและกลุ่มเซลล์มะเร็งที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean) ของแต่ละกลุ่ม

ค่าความหนาแน่นของหลอดเลือดของหนูทดลองในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับค่าดังกล่าวของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับเซลล์มะเร็งว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ และนำมาเปรียบเทียบกับตนเองระหว่างกลุ่มทดลองและ

กลุ่มควบคุมอีกครั้ง ส่วนค่าความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเพื่อทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ

### การรวบรวมข้อมูล (data collection)

ข้อมูลที่จะเก็บบันทึกในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล ได้แก่ หมายเลขของหนูทดลอง น้ำหนักของหนูทดลอง ค่าความหนาแน่นของหลอดเลือด และค่าความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็ง

ผลลัพธ์ที่จะนำมาเปรียบเทียบกันได้แก่น้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม ค่าความหนาแน่นของหลอดเลือดเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้ปลูกเซลล์มะเร็งและกลุ่มทดลอง กลุ่มที่ไม่ได้ปลูกเซลล์มะเร็งและกลุ่มควบคุม และระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ค่าความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการทำวิจัยนำร่อง (Pilot Study) จึงไม่สามารถทราบค่าทางสถิติใดๆของผลลัพธ์ที่ต้องการวัดมาก่อนการทดลองนี้ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การคำนวณทางสถิติเพื่อหาขนาดตัวอย่างในการวิจัยได้และหนูที่ใช้มีลักษณะและพันธุกรรมที่เหมือนกันอยู่แล้วจึงน่าจะใช้จำนวนน้อยได้ และเนื่องจากมีปัญหาเรื่องค่าใช้จ่ายและเวลาในการทดลองจึงใช้หนูทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 3 ตัว

เมื่ออนุมานว่าหนูทดลองจากการศึกษาทั้งสองกลุ่มมีการแจกแจงของข้อมูลตัวแปรต่างๆแบบปกติและมีค่าความแปรปรวนของข้อมูลเท่ากัน ผลลัพธ์ที่ได้จากการทดลองทั้งสองค่านี้จะถูกรวบรวมและนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีทดสอบสมมุติฐานแบบ unpaired t-test โดยให้สูตร

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_{x_1 - x_2}}$$

## การนำเสนอข้อมูล

นำเสนอในรูปแบบตาราง

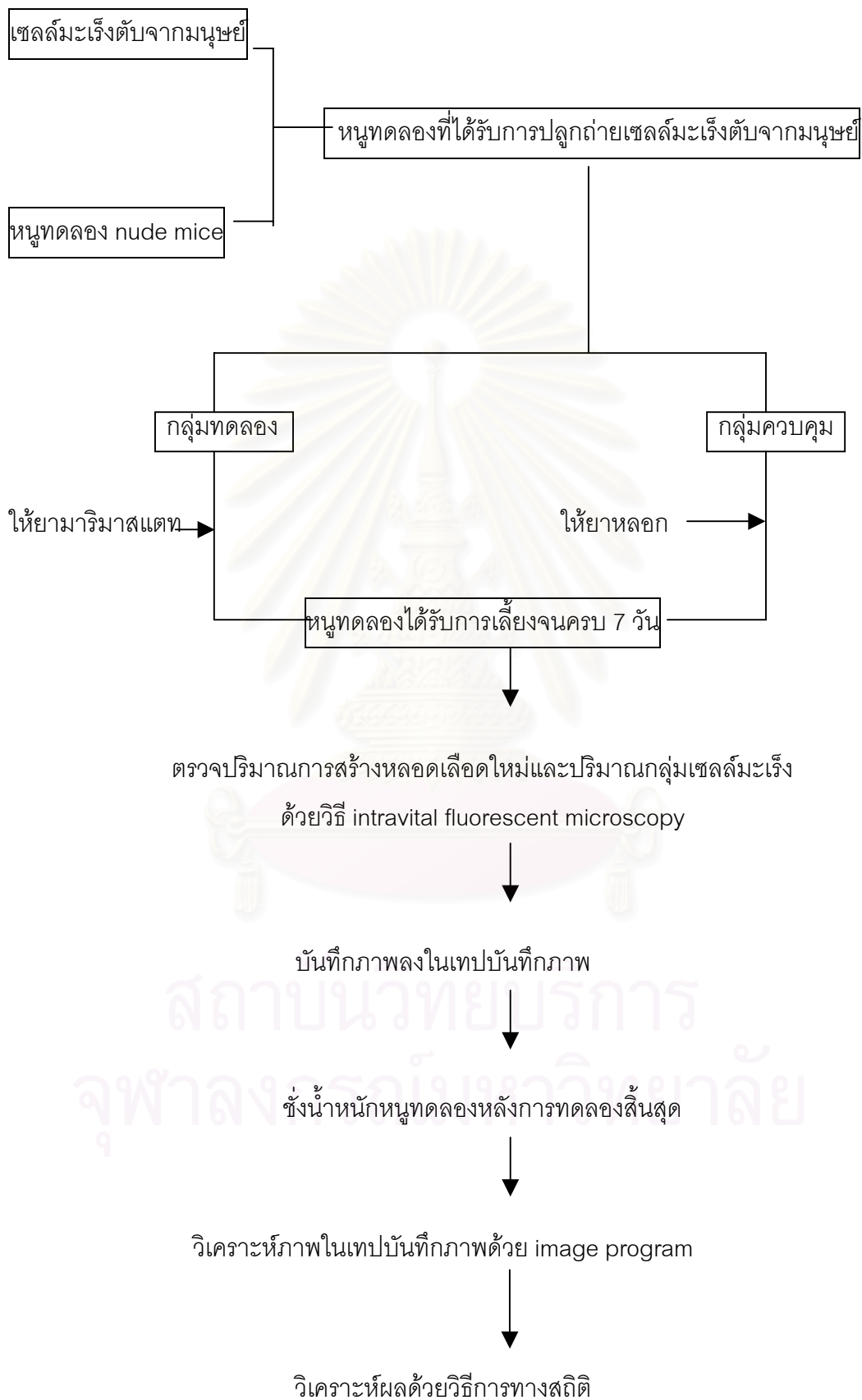
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

ไม่มี



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



## ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนั้นเชื่อว่าจะได้ประโยชน์ในการเป็นแนวทางใหม่เพื่อการวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตสำหรับการรักษามะเร็งตับ ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบบ่อยในผู้ป่วยภูมิภาคนี้ แต่ยังไม่มีความรู้แนวทางการรักษาใด ๆ ในปัจจุบันที่ได้ผลดีเลยสำหรับมะเร็งที่ไม่สามารถผ่าตัดออกได้หมด รวมทั้งเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการวิจัยเปรียบเทียบผลของการให้ยาต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่มีต่อการเจริญเติบโตของโรคมะเร็งที่มีการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยงมาก (hypervascular tumor) และชนิดที่มีการสร้างหลอดเลือดมาเลี้ยงน้อย (hypovascular tumors) ซึ่งยังเป็นการศึกษาที่จะแสดงผลของยาในกลุ่มนี้ได้เป็นอย่างดีเป็นรูปธรรมมากที่สุดและยังไม่มีผู้ทำการศึกษาไว้ แต่ไม่สามารถทำการศึกษาได้ในครั้งนี้เนื่องจากปัญหาทางด้านเวลาและเงินทุนของการวิจัย การวิจัยนี้ยังเป็นการวิจัยที่บุกเบิกด้านการทดลองด้วยหนูทดลอง nude mice ในทางมะเร็งวิทยา ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งวิทยาอีกมากมายในอนาคต

## ตารางการปฏิบัติงาน (Time Schedule)

กิจกรรม	2542						2543												2544				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1. ขั้นตอนเตรียมการวิจัย			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*									
2. ขั้นตอนปฏิบัติงาน															*	*	*						
3. ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล																		*	*				
4. ขั้นตอนการเขียนรายงาน																				*			
5. ขั้นตอนการรายงานผล																					*	*	

## ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

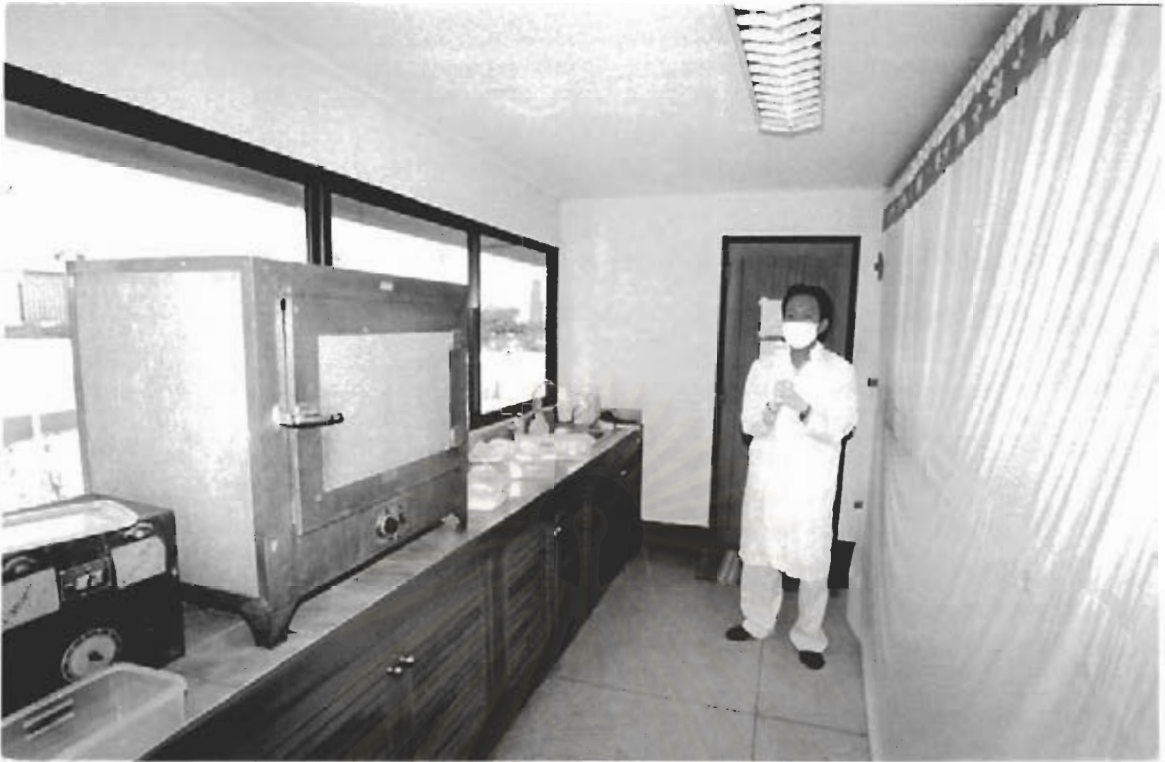
การทดลองนี้ได้รับการออกแบบให้หนูทดลองทั้งสองกลุ่มได้รับการเลี้ยงดูและได้รับการทดลองโดยคำนึงถึงปัญหาทางจริยธรรมในทุกขั้นตอน ทั้งนี้โดยยึดหลักการของมาตรฐานทางจริยธรรมในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองของประเทศแคนาดา ซึ่งได้อ้างอิงไว้ในภาคผนวกของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว

### งบประมาณ (Budget)

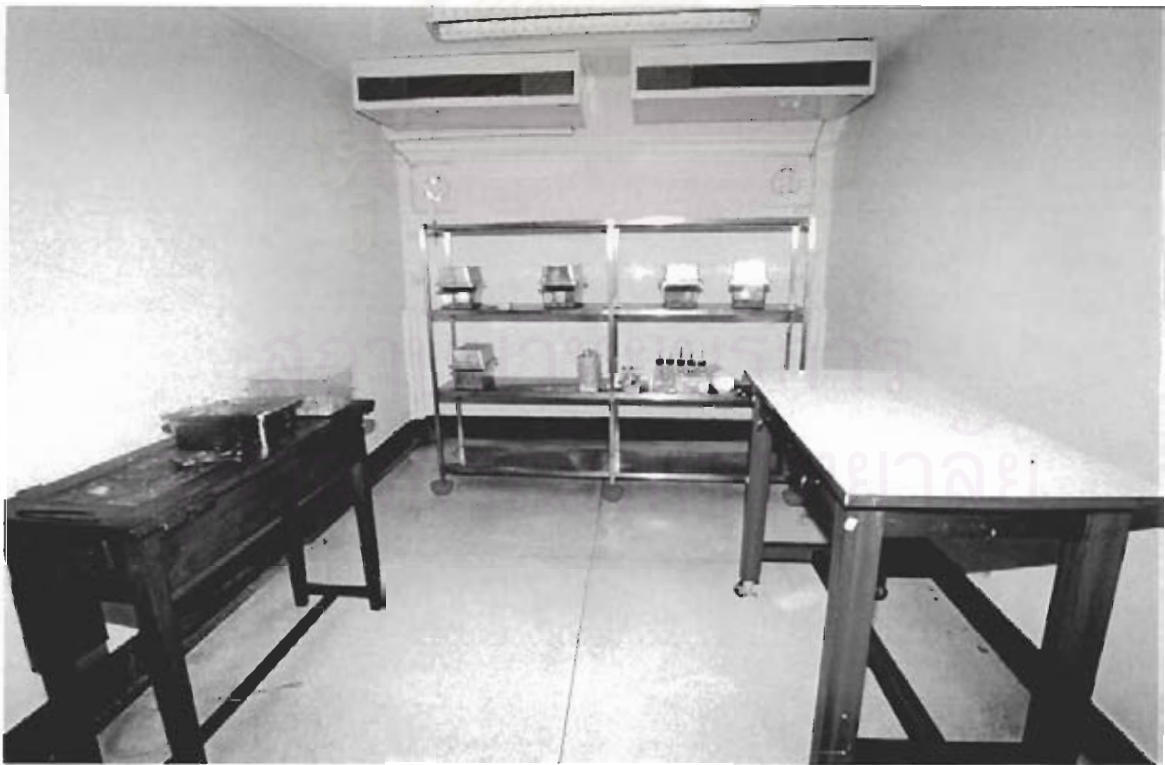
หนูทดลอง (nude mice) จำนวนประมาณ 30 ตัวๆละ 150 บาท	4500 บาท
ค่าอุปกรณ์ในการทดลอง	15000 บาท
ค่าปรับเปลี่ยนสภาพห้องทดลอง	10000 บาท
ค่าจ้างเจ้าหน้าที่ดูแลหนูทดลอง	1000 บาท
ค่าอาหารหนูทดลองและวัสดุรองนอน	<u>2000</u> บาท
รวม	<u>32500</u> บาท

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





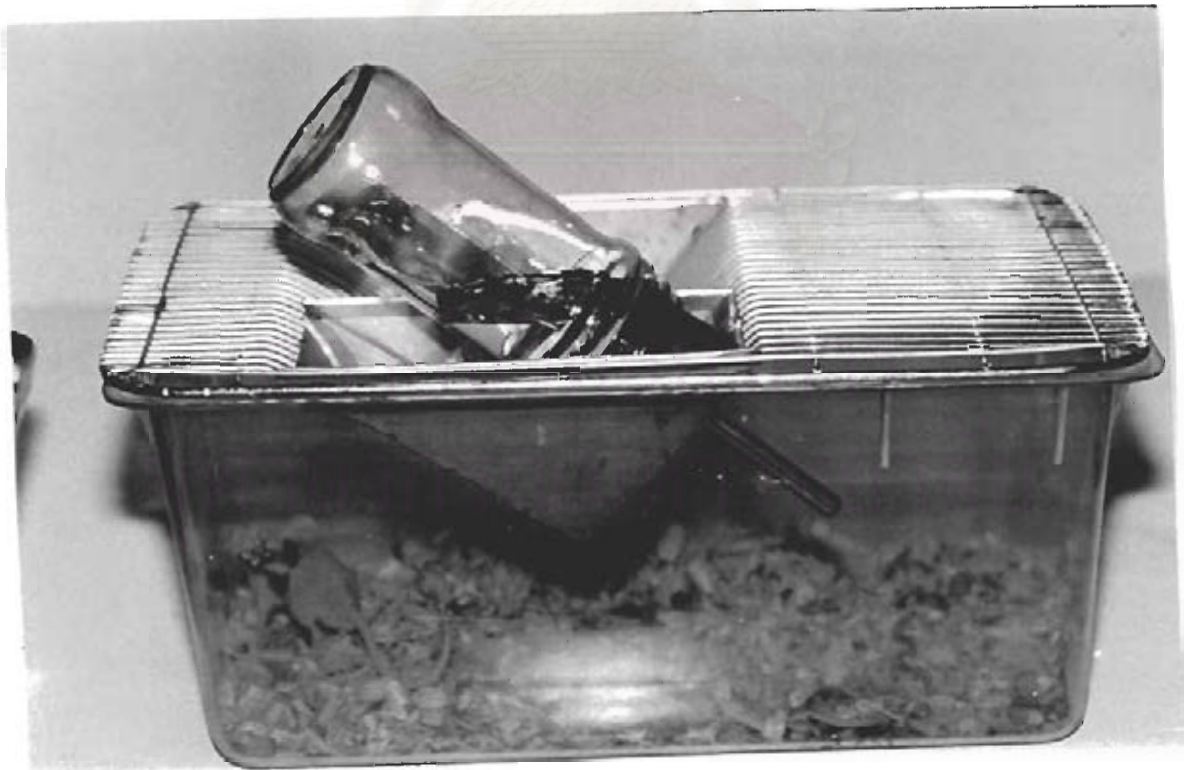
รูปที่ 5 สภาพแวดล้อมหน้าห้องทดลองเลี้ยงหนู nude mice หลังจากได้รับการปรับปรุงแล้ว



รูปที่ 6 สภาพแวดล้อมภายในห้องทดลองเลี้ยงหนู



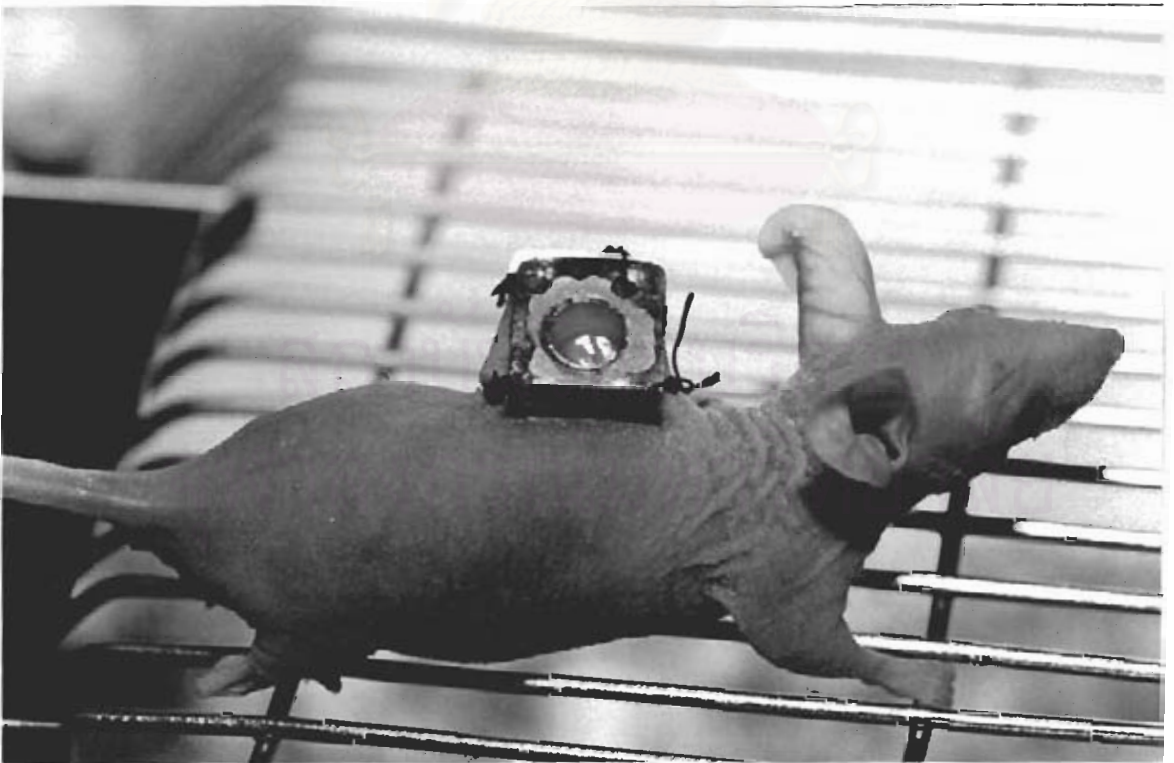
รูปที่ 7 แสดงกรงเลี้ยงหนูทดลอง filter cap และหนูทดลองภายในกรง



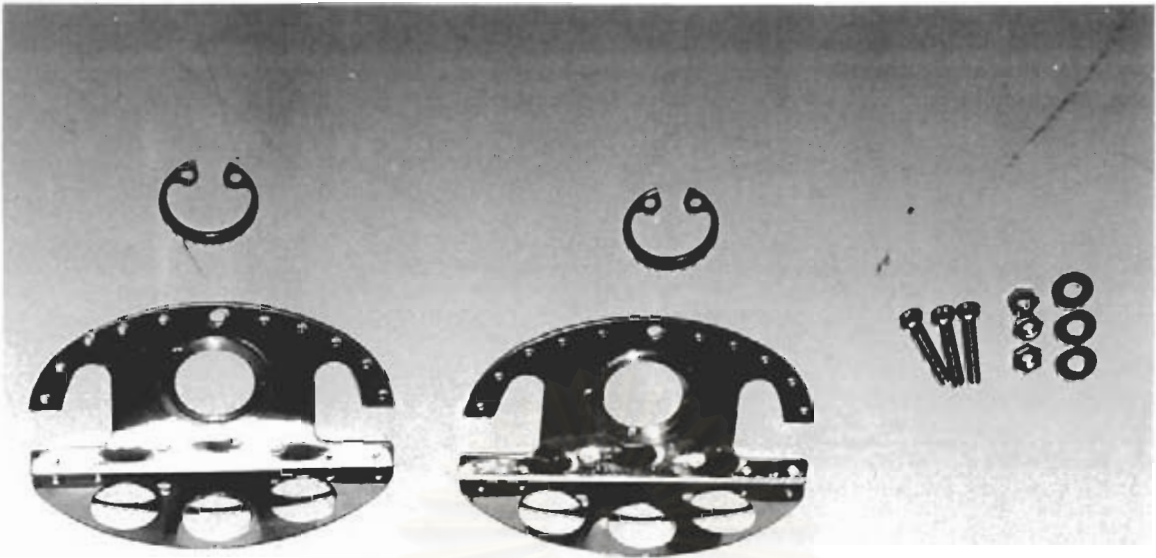
รูปที่ 8 แสดงการให้อาหารและน้ำดื่มแก่หนูทดลอง



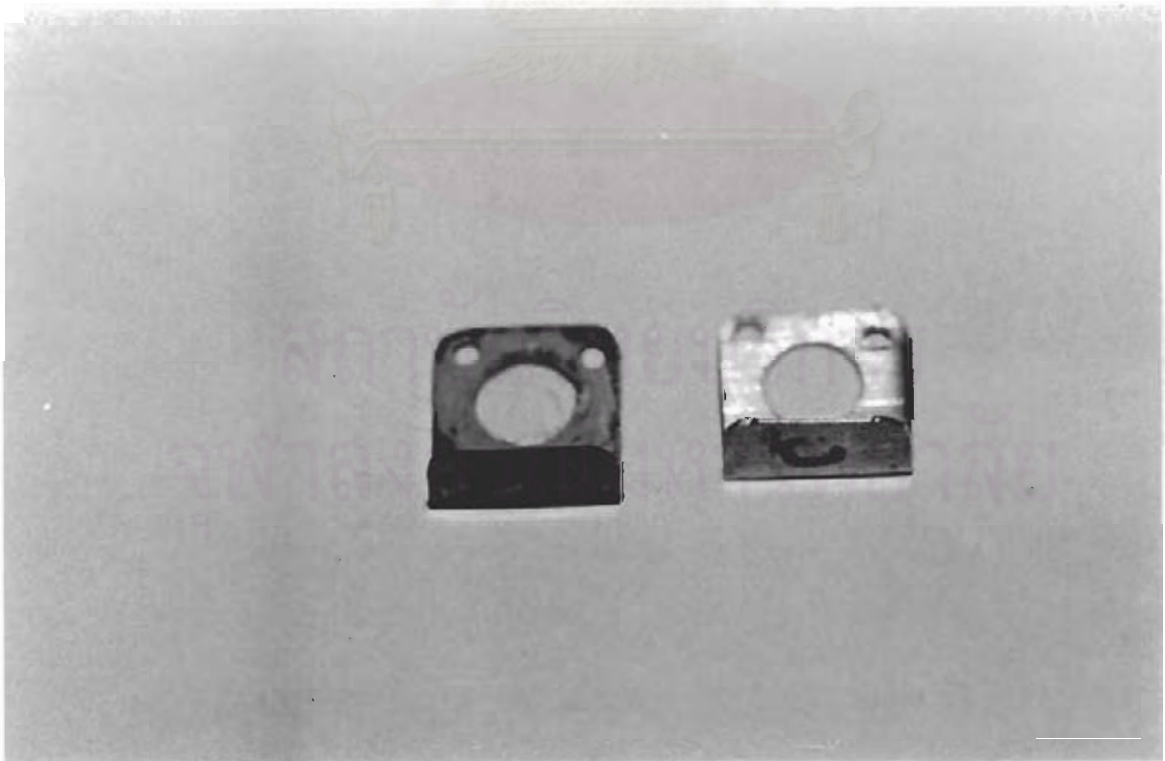
รูปที่ 9 หนูทดลอง nude mice



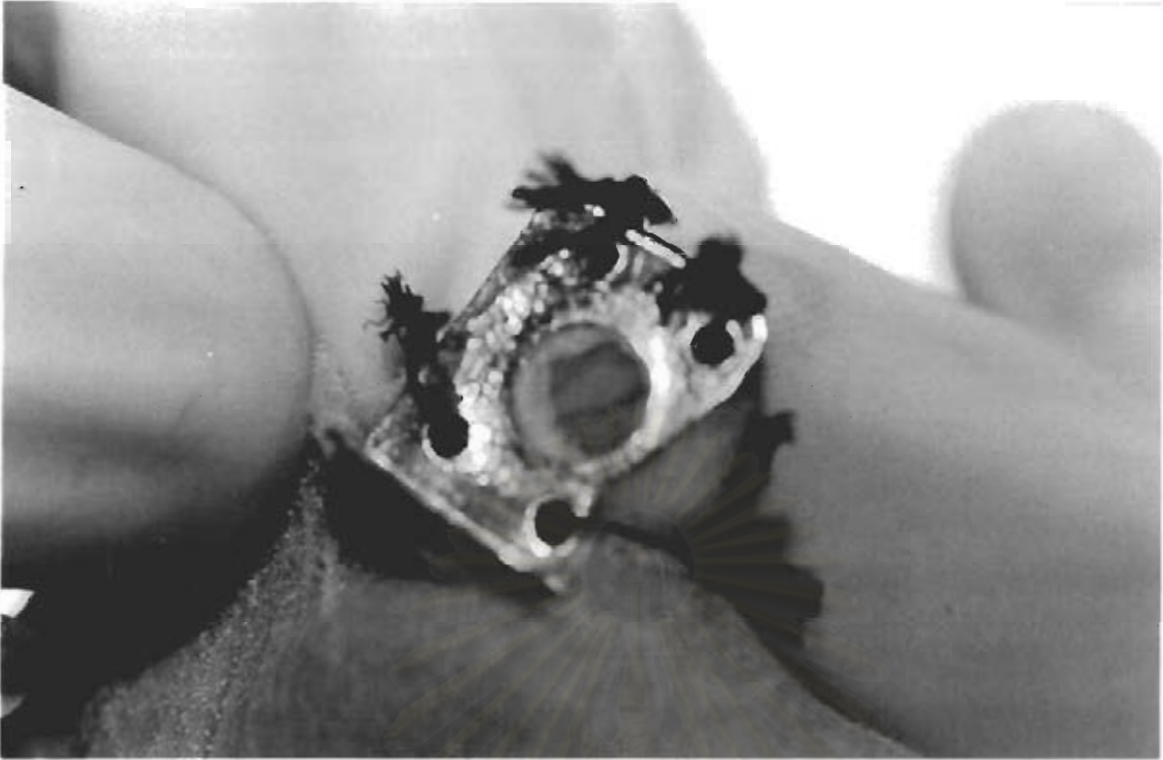
รูปที่ 10 หนูทดลอง nude mice หลังการผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber



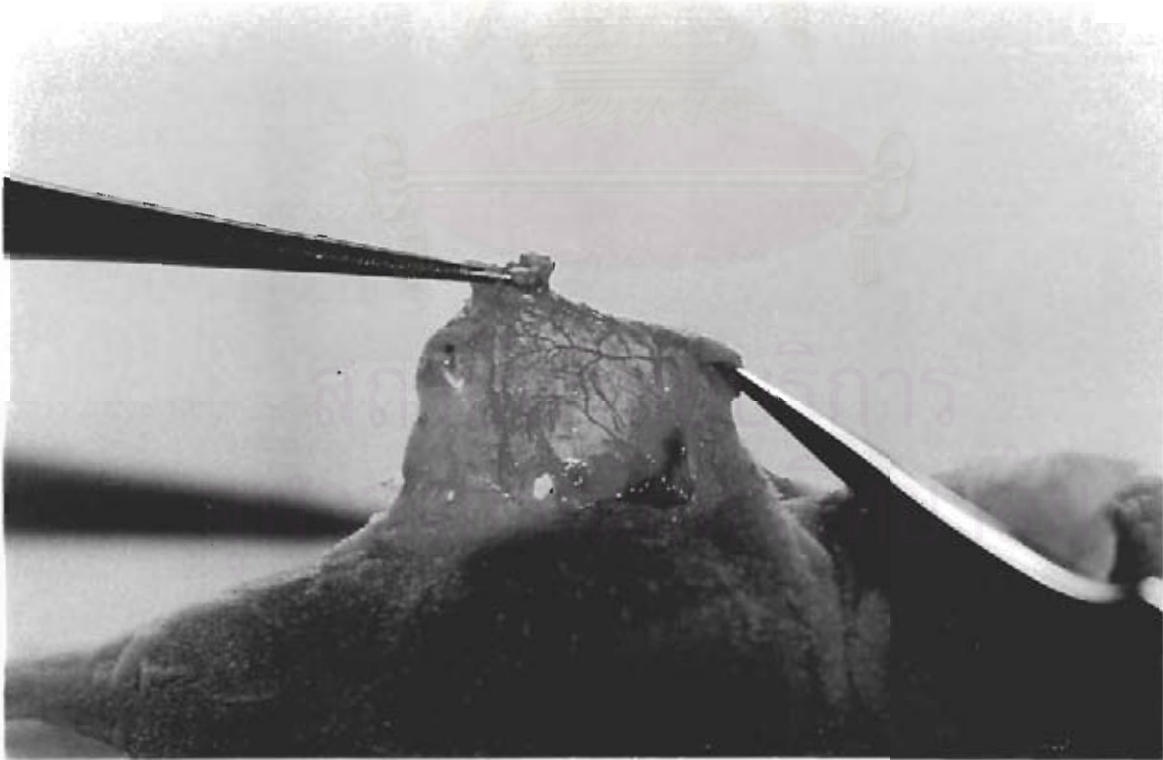
รูปที่ 11 dorsal skin chamber เดิม (ต้นแบบจากประเทศญี่ปุ่น)



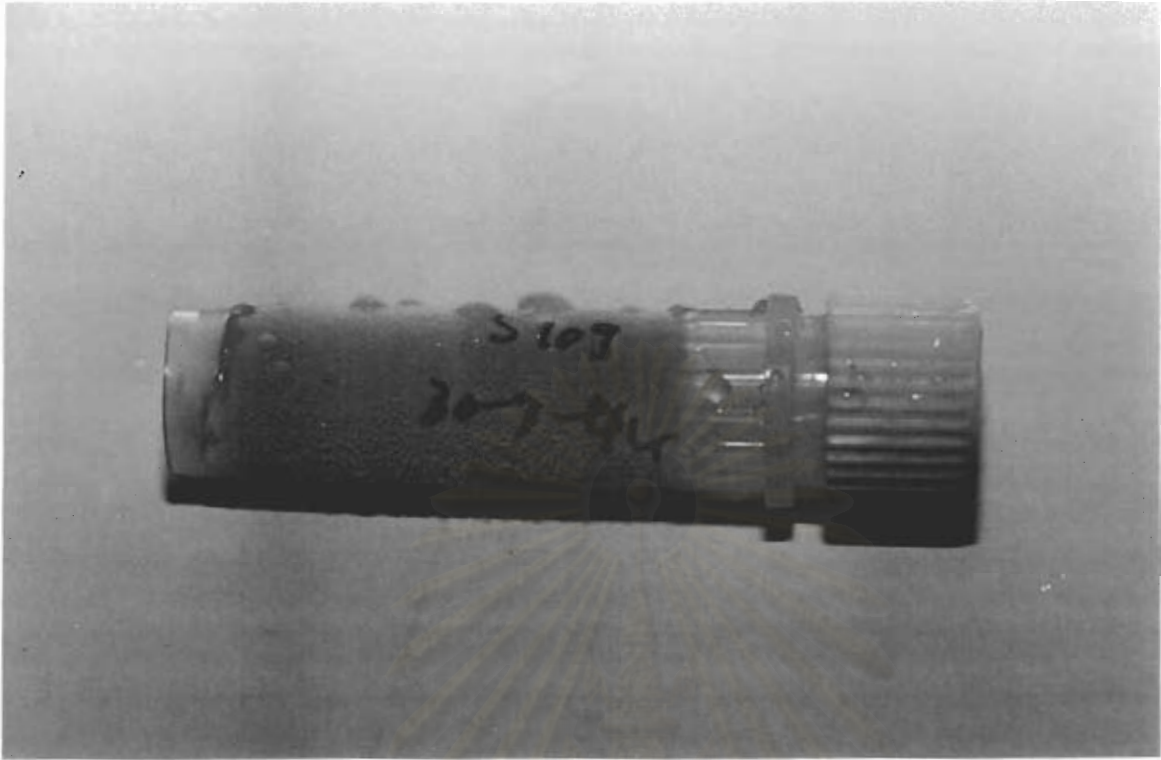
รูปที่ 12 dorsal skin chamber ที่ประยุกต์ขึ้นในการวิจัยครั้งนี้



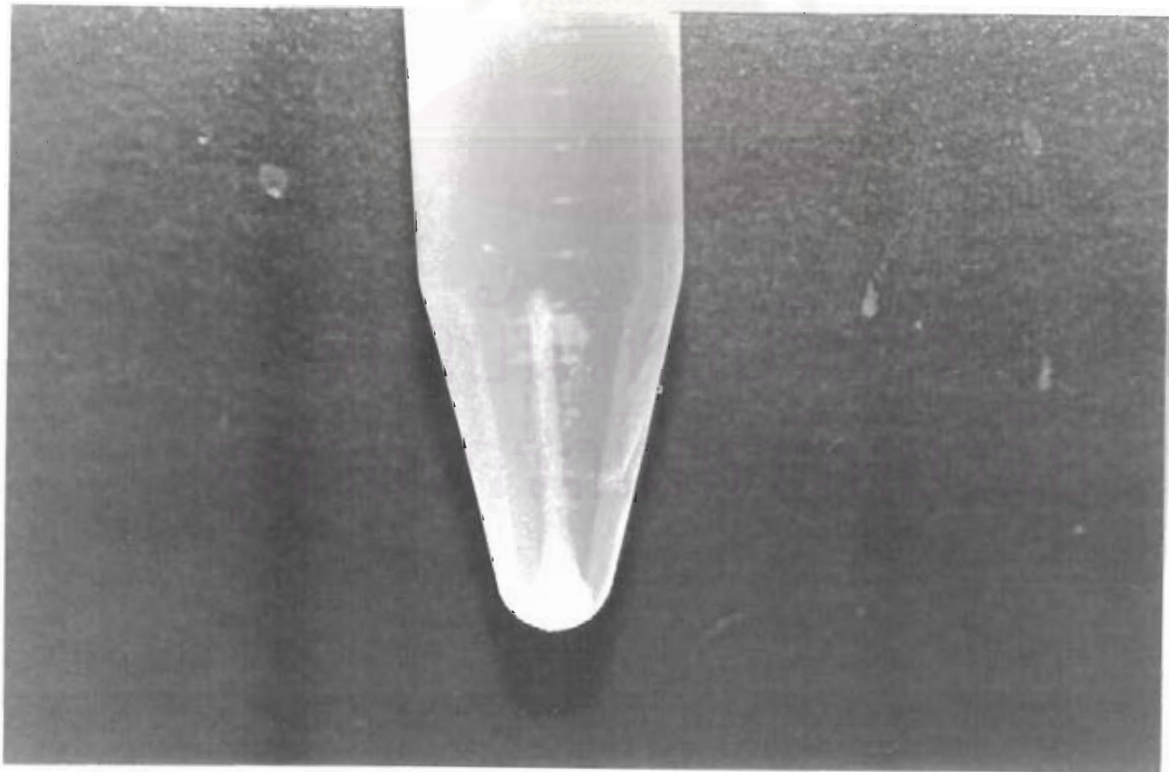
รูปที่ 13 แสดงหลอดเลือดบริเวณสันหลังของหนูทดลองที่เห็นภายใน chamber



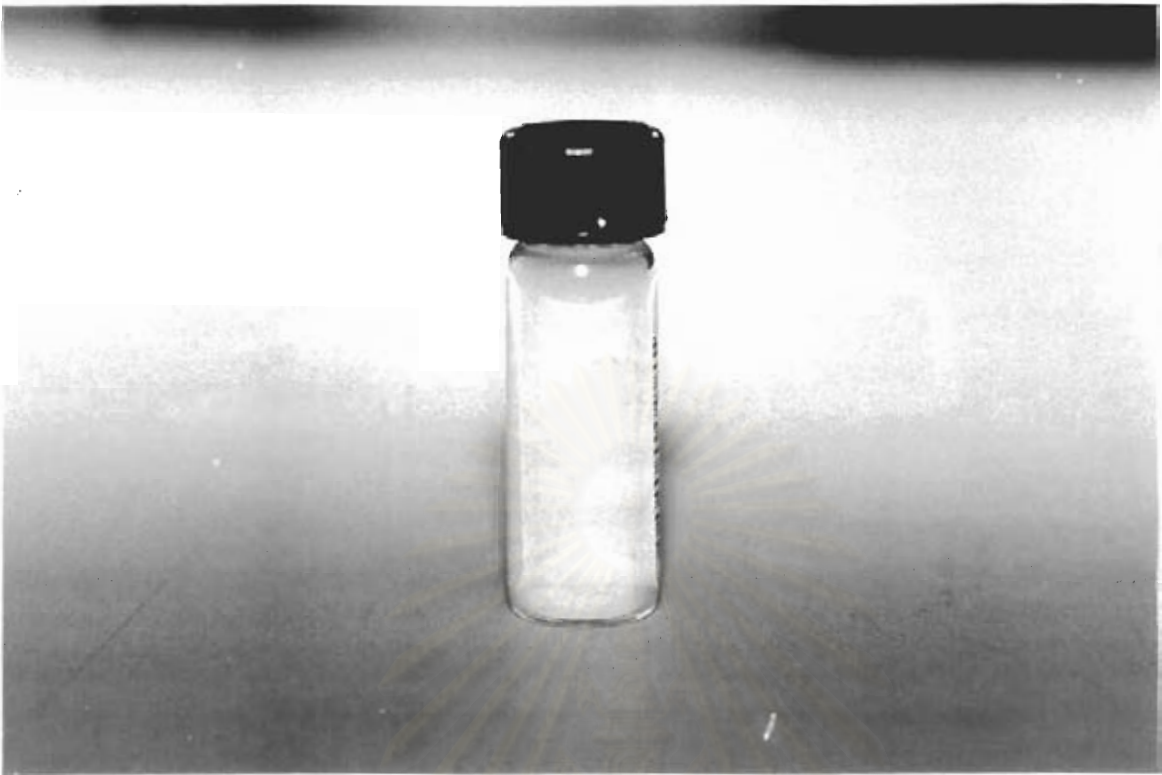
รูปที่ 14 แสดงความชัดเจนของหลอดเลือดที่ตรวจได้โดยตรงบริเวณสันหลังของหนูทดลอง



รูปที่ 15 เซลล์ต้นแบบของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับในสภาพแช่แข็ง



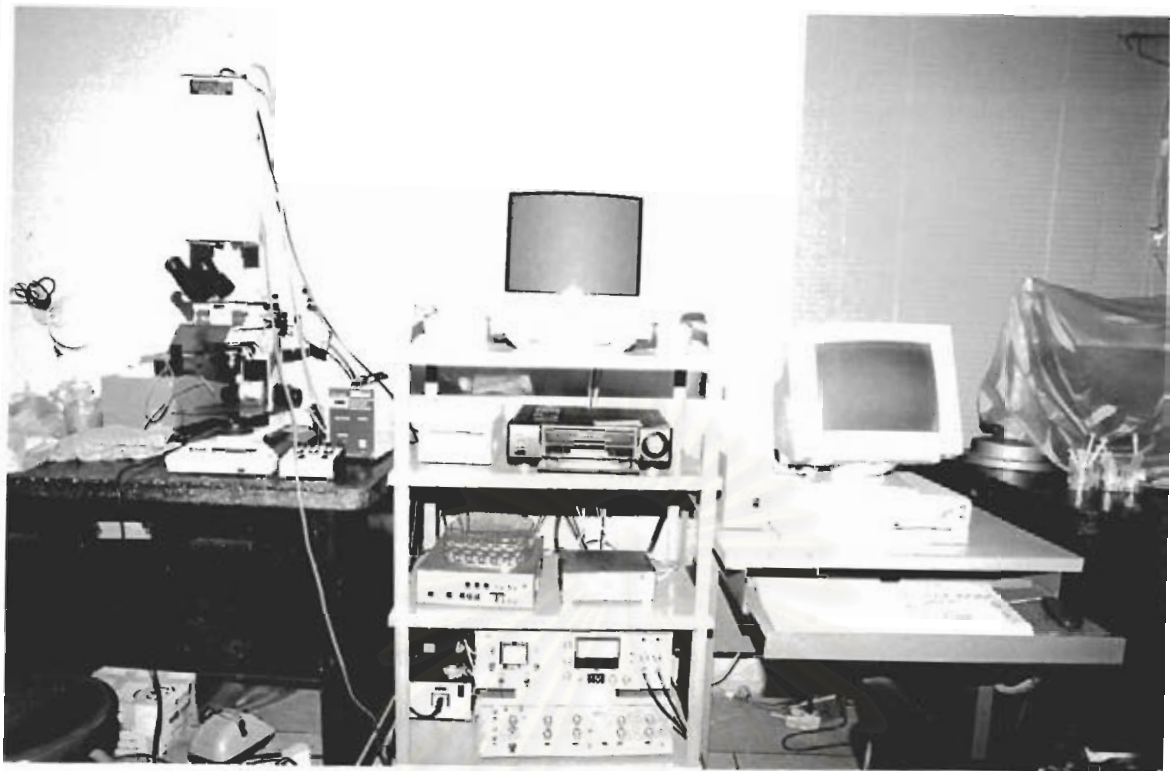
รูปที่ 16 เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับที่ได้รับการเพาะเลี้ยงแล้วนำมาปั่นให้ตกตะกอน



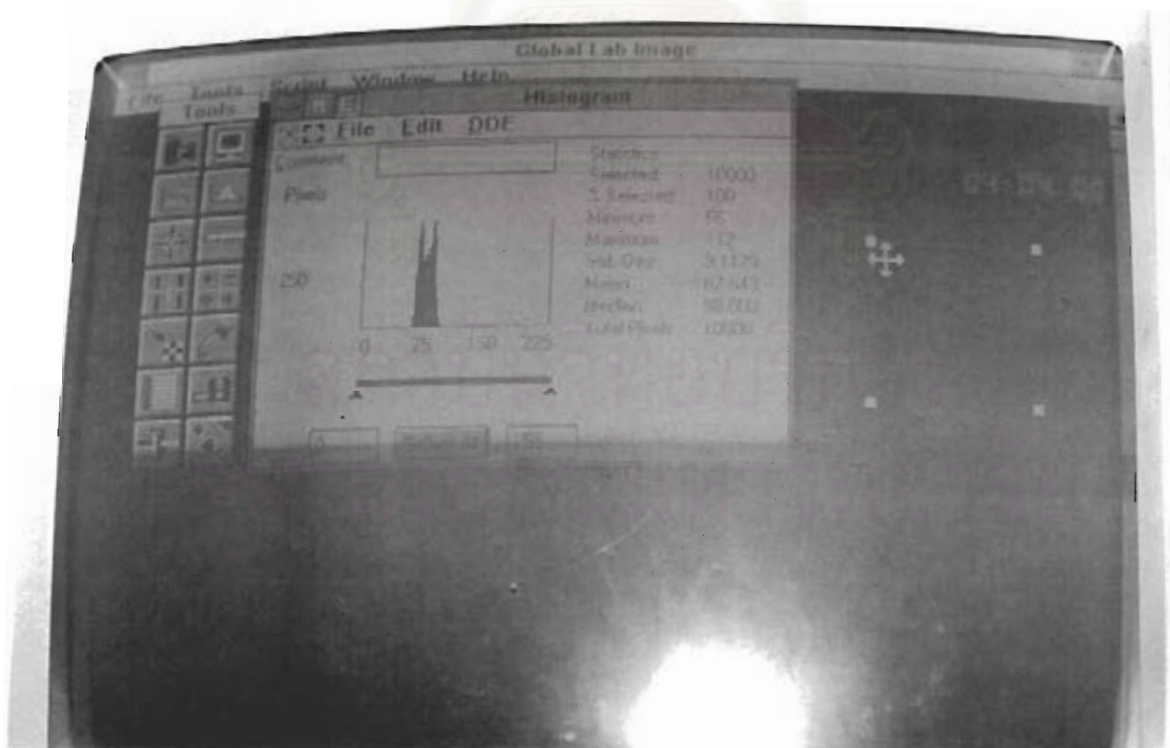
รูปที่ 17 ยามาริมาสแตท



รูปที่ 18 แสดงการป้อนยาแก่หนูทดลอง

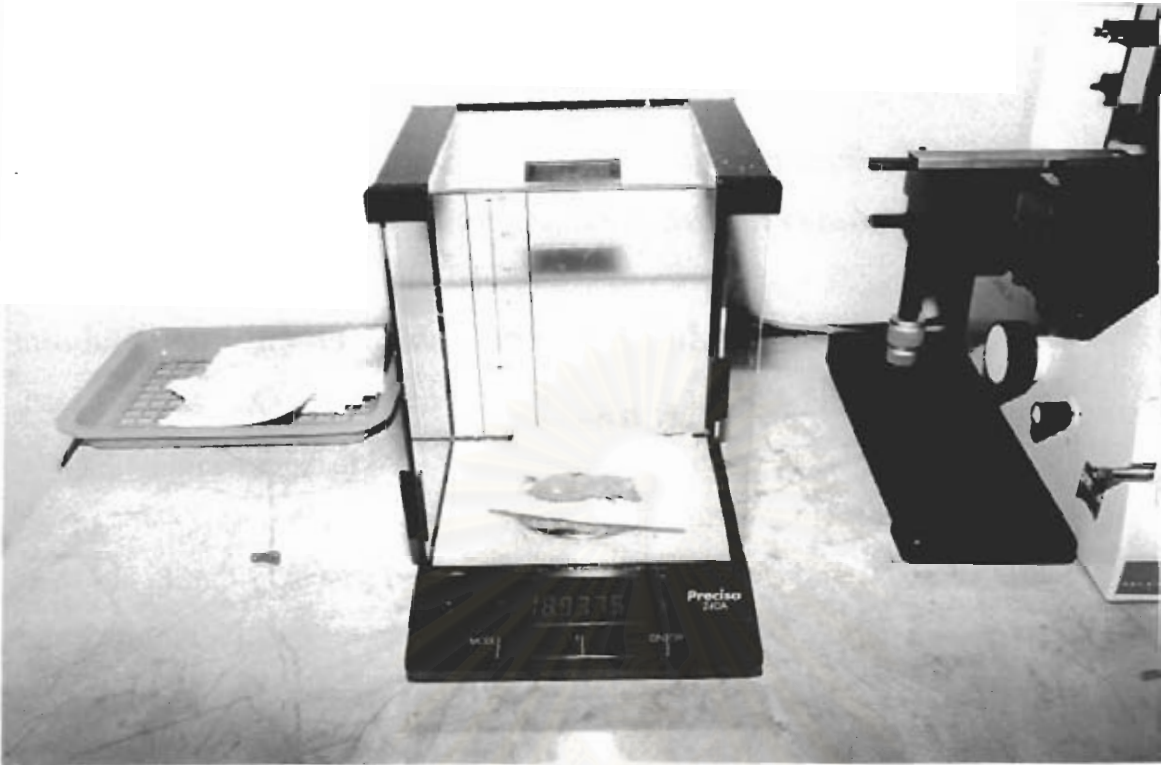


รูปที่ 19 แสดงเครื่องมือ intravital video microscopy และคอมพิวเตอร์ซึ่งใช้วิเคราะห์ภาพด้วย image program

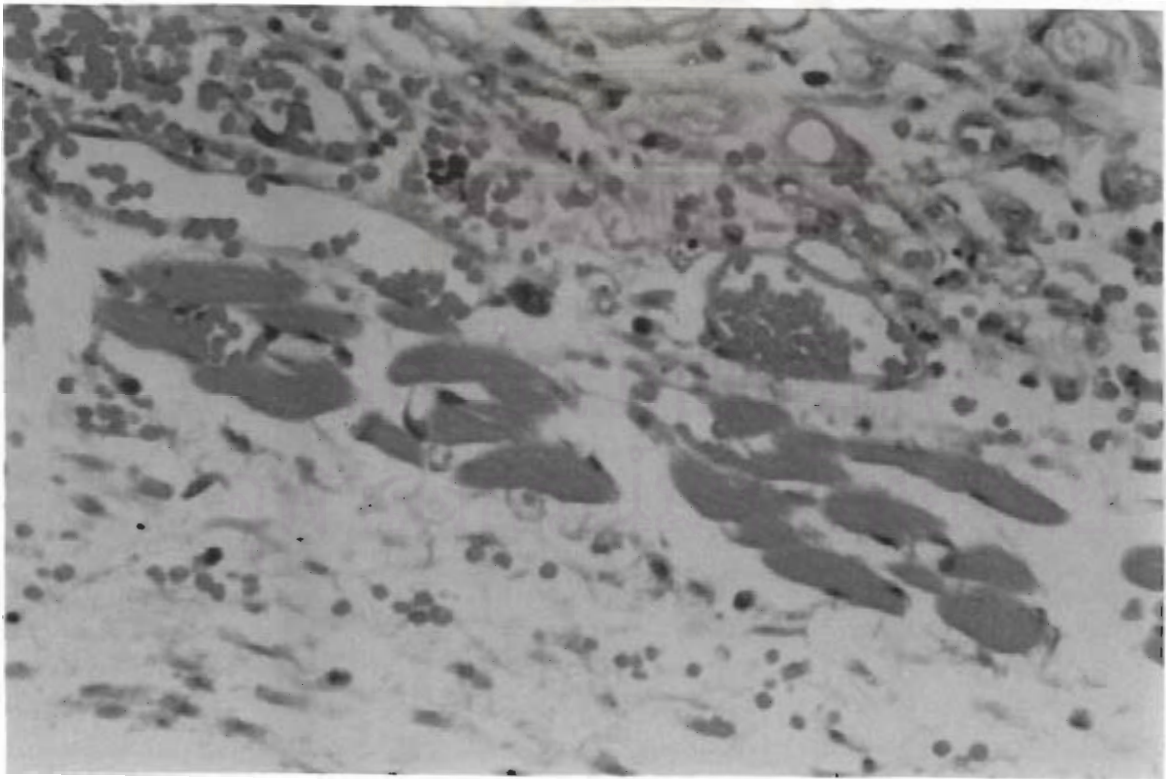


รูปที่ 20 แสดงการใช้ image program ในการหาความหนาแน่นของหลอดเลือดและกลุ่มเซลล์มะเร็ง





รูปที่ 21 แสดงการชั่งน้ำหนักหนูกทดลอง



รูปที่ 22 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของผิวหนังของหนูกทดลองและเซลล์มะเร็งตับซึ่งฝังตัวในชั้นใต้ผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อของหนูกทดลอง

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

การวิจัยนี้เริ่มต้นขึ้นในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ 2543 หลังจากการค้นคว้าข้อมูลในด้านการเลี้ยงหนูทดลอง nude mice และความเป็นไปได้ในการทำการทดลองด้วยอุปกรณ์ที่มีอยู่

ในการทดลองจริงหนูทดลองนี้ใช้เป็นหนู nude mice เพศผู้ 7 ตัวและเพศเมีย 2 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้ปลูกเซลล์มะเร็งตั้งซึ่งเรียกว่ากลุ่มมาตรฐาน กลุ่มทดลอง (case) และกลุ่มควบคุม (control) สาเหตุที่ไม่ได้ใช้หนูทดลองเพศเมียตามที่กำหนดไว้เดิม เนื่องจากหนูเสียชีวิตก่อนกำหนด

หลังการทดลองทั้งหมดเสร็จสิ้น การตรวจหาความหนาแน่นของหลอดเลือดของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม และความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งตั้งของหนูทดลองในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมนั้น ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วัดความเข้มของแสงในเทปบันทึกภาพที่แตกต่างกันระหว่างหลอดเลือด กลุ่มเซลล์มะเร็ง และเนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนังของหนูทดลอง การหาความหนาแน่นของหลอดเลือดนั้นได้เลือกภาพที่แสดงหลอดเลือดขนาดเล็กและหลอดเลือดฝอยเท่านั้น ซึ่งน่าจะเป็นหลอดเลือดที่มีโอกาสสร้างขึ้นใหม่จากเซลล์มะเร็งตั้งมากกว่าหลอดเลือดขนาดใหญ่ ส่วนการเลือกภาพที่วัดความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งนั้นได้เลือกภาพที่มีเซลล์มะเร็งปรากฏอยู่ ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว ยังคงมีปัญหาอยู่บ้างในเรื่องความชัดเจนของภาพ เนื่องจากปัญหาทางเทคนิคในการทดลอง จำนวนภาพที่นำมาวิเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 6

	หมายเลขของหนูทดลอง								
	กลุ่มมาตรฐาน			กลุ่มควบคุม			กลุ่มทดสอบ		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
จำนวนภาพที่วัดความหนาแน่นของหลอดเลือด	8	5	8	8	3	10	9	7	6
จำนวนภาพที่วัดความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็ง	-	-	-	7	3	4	8	5	6

ตารางที่ 6 จำนวนภาพที่มีความชัดเจนเพียงพอในการนำมาวิเคราะห์ด้วย image program

ผลการวัดความหนาแน่นของหลอดเลือดนั้นจะแสดงในรูปของอัตราส่วนของพื้นที่ที่มีความเข้มของแสงในพิสัยที่ทำการวัดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ดังกล่าว แล้วว่าเป็นความเข้มของแสงของหลอดเลือด เทียบกับพื้นที่ที่เหลือทั้งหมดในกรอบของภาพที่กำหนด คิดเป็นอัตราส่วนต่อร้อย ส่วนผลการวัดความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งก็ใช้วิธีการเดียวกันโดยหาพื้นที่ที่มีความเข้มของแสงในพิสัยที่วัดแล้วว่าเป็นความเข้มของกลุ่มเซลล์มะเร็งเทียบกับพื้นที่ที่เหลือทั้งหมด คิดเป็นอัตราส่วนต่อร้อยเช่นเดียวกัน

ผลค่าเฉลี่ย (mean) ของการวัดความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งและความหนาแน่นของหลอดเลือดของหนูแต่ละตัวได้แสดงไว้ในตารางที่ 7

ค่าเฉลี่ย	หมายเลขของหนูทดลอง								
	กลุ่มมาตรฐาน			กลุ่มควบคุม			กลุ่มทดสอบ		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ความหนาแน่นหลอดเลือด (ร้อยละ)	60.2	66.8	59.25	71.25	68.33	71.6	55.8	48.14	49.67
ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	62.08			70.39			51.20		
กลุ่มเซลล์มะเร็ง (ร้อยละ)	-	-	-	52.21	65.41	66.88	19.18	14.5	18.21
ค่าเฉลี่ย (ร้อยละ)	-			61.5			17.29		

ตารางที่ 7 ความหนาแน่นของหลอดเลือดและกลุ่มเซลล์มะเร็งในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม

เพศและน้ำหนักของหนูทดลองหลังการทดลองเสร็จสิ้นและค่าเฉลี่ย (mean) ของน้ำหนักในแต่ละกลุ่มได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว ด้วยวิธี unpaired t-test ผลดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 9 ตารางที่ 10 และ 11 ทั้งนี้ค่า  $t_{0.05}$  ที่ degree of freedom เป็น 4 คือ 2.776

	หมายเลขของหนูทดลอง								
	กลุ่มมาตรฐาน			กลุ่มควบคุม			กลุ่มทดสอบ		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
เพศ	ผู้	ผู้	เมีย	ผู้	ผู้	ผู้	ผู้	ผู้	เมีย
น้ำหนัก (กรัม)	14.8	15.1	17.3	20	16.8	14.6	17.3	18.2	14.59
น้ำหนักรวมเฉลี่ย (กรัม)	15.73			17.13			16.69		

ตารางที่ 8 น้ำหนักหลังเสร็จสิ้นการทดลองและเพศของหนูทดลองแต่ละหมายเลข

	ค่า t ของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของหลอดเลือดระหว่างกลุ่ม (degree of freedom =4)
กลุ่มมาตรฐานและกลุ่มควบคุม	-3.22 (P<0.05)
กลุ่มมาตรฐานและกลุ่มทดสอบ	3.26 (p<0.05)
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ	7.50 (p<0.05)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของหลอดเลือดระหว่างทั้ง 3 กลุ่มของหนูทดลอง

	ค่า t ของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งระหว่างกลุ่ม (degree of freedom =4)
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ	9.06 (p<0.05)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

	ค่า t ของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักของหนูทดลองระหว่างกลุ่ม (degree of freedom =4)
กลุ่มมาตรฐานกลุ่มควบคุม	-0.8 (p>0.05)
กลุ่มมาตรฐานและกลุ่มทดสอบ	-0.71 (0.05)
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ	0.23 (p>0.05)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักของหนูทดลองระหว่างทั้ง 3 กลุ่มของหนูทดลอง

โดยสรุปแล้ว ผลจากการศึกษานี้พบว่า การให้ยามาริมาสแดทมีผลทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแม้จะเทียบกับกลุ่มมาตรฐานก็ตาม การให้ยามาริมาสแดทยังมีผลทำให้ความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ส่วนน้ำหนักของหนูทดลองนั้นไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใดๆ อย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับปัญหาเรื่องผลข้างเคียงของยามาริมาสแดทนั้น ในระหว่างการทดลองไม่พบว่า มีหนูทดลองในกลุ่มทดลองซึ่งได้รับยามาริมาสแดทตัวใดมีอาการผิดปกติของการเคลื่อนไหว ซึ่งเป็นอาการของเส้นเอ็นอักเสบแต่อย่างใดทั้งสิ้น

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

โรคมะเร็งตับเป็นโรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของผู้ป่วยชาวไทยและภูมิภาคนี้ และยังไม่มียุทธวิธีรักษาวิธีใดที่ได้ผลดีนอกจากการผ่าตัด การวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อเป็นการวิจัยยาชนิดใหม่ในการรักษาโรคมะเร็งตับ ผลการวิจัยพบว่ายามาริมาสแตทได้ผลดีในการรักษาโรคมะเร็งตับ โดยใช้ตัววัดผลคือความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็กและความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์มะเร็งที่ปลูกในหนูทดลองโดยไม่พบผลข้างเคียงใด ๆ

ในการศึกษานี้การให้ยามาริมาสแตทใช้วิธีการป้อนยาทางปาก ซึ่งตรงกับวิธีการใช้ยานี้จริงในผู้ป่วย อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยานี้นั้นในสัตว์ทดลองนั้นไม่มีข้อมูลในหนู nude mice ขณะที่การทดลองนี้ก็ไม่มีภาวะเจาะเลือดหนูทดลองเพื่อวัดระดับยาในกระแสเลือดเนื่องจากไม่มีเครื่องมือที่จะสามารถทำได้ และขนาดยาที่ใช้ก็ยังไม่ตรงกับขนาดยาที่แนะนำในผู้ป่วยจริง ดังนั้นการประยุกต์ใช้ผลการทดลองนี้ในผู้ป่วยจึงยังต้องการการศึกษาในระดับคลินิกเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาทางด้านมะเร็งวิทยาโดยการใช้อวัยวะ dorsal skin chamber และ intravital microscope นั้นมีในต่างประเทศอยู่จำนวนหนึ่ง<sup>136-138</sup> แต่เพิ่งกระทำเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในการวิจัยนี้ รวมทั้งยังเป็นหนึ่งในการวิจัยจำนวนน้อยมากในประเทศไทยที่ใช้หนูทดลอง nude mice ดังนั้น จึงมีปัญหามากในหลายด้านตลอดการวิจัยอันอาจจะทำให้การวิจัยนี้ไม่สมบูรณ์พร้อมในเรื่องระเบียบวิธีการวิจัย ความไม่สมบูรณ์ในเรื่องระเบียบวิธีการวิจัยที่สำคัญมีดังนี้

1. การทดลองในกลุ่มทดลองและควบคุมไม่ได้ใช้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งตับสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด เนื่องจากปัญหาทางเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่ได้แก้ไขปัญหานี้แล้วด้วยการจัดให้หนูทดลอง 1 ตัวในทั้ง 2 กลุ่มได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งตับ HEP G2 หนูทดลองที่เหลือในทั้ง 2 กลุ่มได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งตับ S 109 จึงน่าจะไม่มีผลต่อผลการวิจัยมากนัก
2. ไม่ได้มีการกระจายเพศของหนูทดลองในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมอย่างเท่าเทียมกันตามที่วางแผนไว้แต่แรก สาเหตุเนื่องจากหนูทดลองที่วางแผนไว้เสียชีวิตไปก่อนครบกำหนดจากการวางยาสลบ และไม่สามารถหาหนูทดลองเพศเดียวกันมาทดแทนได้จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติภายในเวลาที่จำกัด ปัญหานี้ อาจมีผลต่อการศึกษาได้ เนื่องจากโรคมะเร็งตับเป็นโรคที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศ ดังที่พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับเกือบทั้งหมดเป็นผู้ป่วยชาย ปัญหานี้

จะสามารถแก้ไขได้ถ้ามีเวลาในการทำวิจัยมากขึ้นเพื่อรอให้ได้หนูทดลองรุ่นใหม่จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ

3. ปัญหาความไม่ชัดเจนของภาพที่บันทึกได้จากการตรวจด้วย intravital microscope สาเหตุจากปัญหาทางเทคนิคอื่น ๆ ในการผ่าตัดใส่ dorsal skin chamber ปัญหานี้เกิดขึ้นในหนูทดลองที่นำมาผ่าตัดในช่วงแรก ดังที่จะพบว่าหนูทดลองบางตัวในตารางที่ 6 มีจำนวนภาพที่ชัดเจนพอจะนำมาวิเคราะห์ได้ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ได้ในตารางที่ 7,8 ก็มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มอย่างชัดเจน จึงเชื่อว่าปัญหาในข้อนี้ไม่น่าจะมีผลต่อการทดลองแต่อย่างใด

ผลการทดลองซึ่งพบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดในกลุ่มทดลองนั้นน้อยกว่ากลุ่มมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญนั้น นอกจากเกิดจากผลของยามาริมาสแตทแล้วเชื่อว่าอาจเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหนูกลุ่มทดลองมีผลทำให้การถ่ายภาพหลอดเลือดของหนูมีความชัดเจนน้อยลงด้วย

สำหรับน้ำหนักของหนูทดลองซึ่งไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ไม่ว่าจะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใด ๆ ก็ตามนั้น เป็นผลที่ตรงกับความต้องการของผู้วิจัย เนื่องจากต้องการปลูกเซลล์มะเร็งในปริมาณน้อยและใช้เวลาในการทดลองสั้น เพื่อไม่ให้โรคมะเร็งตับที่เกิดจากการปลูกเซลล์มีปริมาณมากจนเกิดผลเสียต่อสุขภาพโดยรวมของหนูทดลองนั่นเอง

สารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดนั้นเป็นยากกลุ่มใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่นานนี้ และยังไม่ผ่านการจดทะเบียนและรับรองสำหรับการรักษาผู้ป่วยจริง ดังนั้น แม้ว่าจะจะเป็นยาที่มีผลข้างเคียงน้อยและอาจมีประโยชน์อย่างมากในการรักษาโรคหลายชนิดทั้งโรคมะเร็งและโรคกลุ่มอื่นๆ แต่ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในขั้นคลินิก (clinical phase) โดยเฉพาะการใช้ยานี้รักษาโรคมะเร็งตับต่อไป

ผลการทดลองใช้ยาในกลุ่มสารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดหลายชนิดในการรักษาโรคมะเร็งทั้งในการวิจัยกับสัตว์ทดลองซึ่งเป็นการวิจัยในระดับก่อนคลินิกดังเช่นการวิจัยนี้ และในการวิจัยกับผู้ป่วยจริงซึ่งเป็นการวิจัยในระดับคลินิก ล้วนพบว่ายาในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งหลายชนิดที่ทำการศึกษาได้ดีทั้งที่ใช้เป็นยาขนานเดียวในการรักษาและที่ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด โดยไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรงใดๆ

ยามาริมาสแตท (marimastat) เป็นยาชนิดแรกที่สุดชนิดหนึ่งในกลุ่มสารยับยั้งการสร้างงานของเอนไซม์ในกลุ่ม matrix metalloproteinases (matrix metalloproteinase inhibitors) ดังกล่าวได้อย่างกว้างขวาง (broad spectrum) มีการทดลองนำยานี้นี้ไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ทั้งในขั้นการทดลองยาระดับก่อนคลินิก (preclinical phase)

และในระดับคลินิก (clinical phase) เป็นเวลาหลายปีมาแล้ว แต่ยังไม่ปรากฏรายงานการทดลองใช้ยาชนิดนี้ในการรักษามะเร็งตับ ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วน่าจะมีโอกาสได้ผลดี เนื่องจากมะเร็งตับเป็นมะเร็งที่มีการสร้างเส้นเลือดใหม่อย่างมากดังกล่าวแล้ว การศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันสมมติฐานดังกล่าวว่าน่าจะเป็นความจริง

การศึกษาเรื่องการใช้ยามาริมาสแตทในโรคมะเร็งอื่นๆที่เคยมีรายงานไว้ที่สำคัญ ได้แก่ การใช้ยามาริมาสแตทรักษาโรคเนื้องอกสมอง (brain tumor) โดยเฉพาะที่เกิดจากการแพร่กระจายมาจากโรคมะเร็งปฐมภูมิในบริเวณอื่น<sup>139</sup> การใช้ยามาริมาสแตทรักษาโรคมะเร็งตับอ่อน<sup>140</sup> การใช้ยามาริมาสแตทในการรักษาโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร<sup>12</sup> การใช้ยาชนิดนี้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>141</sup> และการใช้ยาชนิดนี้ในการรักษาโรคมะเร็งปอดระยะลุกลาม (advanced lung cancer)<sup>142</sup> การวิจัยเหล่านี้เป็นการวิจัยในระดับคลินิกซึ่งพบว่าการใช้ยามาริมาสแตทสามารถรักษาโรคเนื้องอกสมองโดยเฉพาะชนิดทุติยภูมิ โรคมะเร็งตับอ่อน โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ผลดี การวิจัยเรื่องการใช้ยานี้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ยังพบว่าควรให้ยาชนิดนี้วันละสองครั้งจะได้ผลดีมากกว่าการให้ยาวันละครั้ง โดยการวัดผลด้วยระดับ carcinoembryonic antigen (CEA) ในเลือดของผู้ป่วย<sup>141</sup> ส่วนการวิจัยการใช้ยาชนิดนี้ในโรคมะเร็งปอดนั้นยังเป็นเพียงการวิจัยในระยะที่ 1 (phase I clinical trial) และยังไม่ทราบประสิทธิภาพของยา นอกจากนี้ยังมีการวิจัยการใช้ยามาริมาสแตทในการรักษาโรคมะเร็งรังไข่<sup>143</sup> และโรคมะเร็งต่อมธัยรอยด์ชนิด follicular ในระยะแพร่กระจาย<sup>144</sup> อีกด้วย แต่การวิจัยเหล่านี้ยังคงเป็นเพียงการวิจัยในหลอดทดลอง (in vitro) เท่านั้น

## สรุปผลการศึกษา (conclusion)

การศึกษานี้สรุปผลได้ดังนี้

1. ยามาริมาสแตทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. ยามาริมาสแตทสามารถลดปริมาณการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งตับที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ยังเป็นการวิจัยนำร่องของการวิจัยในหนูทดลอง nude mice โดยเฉพาะสำหรับสาขามะเร็งวิทยาในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเป็นที่ยืนยันว่าการวิจัยด้วยหนูทดลอง nude mice สามารถทำได้จริงด้วยห้องทดลองและเครื่องมือที่มีอยู่ ซึ่งจะเป็นตัวอย่างในการวิจัยอื่นทั้งในสาขามะเร็งวิทยาและสาขาอื่นๆที่จะทำได้ อย่างกว้างขวางตามมาเมื่อใช้หนูทดลองชนิดนี้ในการศึกษา



## รายการอ้างอิง

1. Lotze MT, Flickinger JC, Carr BI. Hepatobiliary Neoplasms. In: Devita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. Philadelphia : JB Lippincott 1993 : 883-914.
2. Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Chulalongkorn Hospital, The Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand. **Tumor Registry Statistical Report 1995**.
3. Pawardoe A, Voravud N. Primary hepatocellular carcinoma. **Chula Med J** 1997; 41” 297-329
4. Pawarode A, Sriuranpong V, Voravud N. Treatment of hepatocellular carcinoma in Chulalongkorn Hospital. **Proceeding 37<sup>th</sup> annual scientific meeting, Chulalongkorn hospital 1996**(submitted)
5. Gastrointestinal Tumor Study Group. A prospective of recombinant interferon alpha 2b in previously untreated patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer** 1990; 66:135-9
6. Patt YZ, Yoffe B, Charnsangavej C. Low serum aplha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma as apredictor of response to 5-FU and interferon alpha-2b. **Cancer** 1993;72: 2574-82
7. Melia WM, Johnson PJ, Williams R. Controlled clinical trial of doxorubicin and tamoxifen versus doxorubicin alone in hepatocellular carcinoma. **Cancer Treat Rep** 1987; 71:1213-6
8. Engstrom PF, Levin B, Moertel CG. A phase II trial of tamoxifen in hepatocellular carcinoma. **Cancer** 1990; 65:2641-3
9. Forbes A, Wilkinson ML, Iqbal MJ, et al. Response to cyproterone acetate treatment in primary hepatocellular carcinoma is related to fall in free 5a-dihydrotestosterone. **Eur J Cancer Clin Oncol** 1987; 23: 1659-64
10. Gupta S, Korula J. Failure of ketoconazole as antiandrogen therapy in nonresectable primary hepatocellular casrcinoma. **J Clin Gastroenteral** 1988; 10 :651-4.

11. Bleiberg H, Grimadi CH, Gay F. Double blind clinical trial of antiandrogen therapy vs placebo in unresectable hepatocellular carcinoma. **Proc AM Soc Clin Oncol** 1993; 12 :193-9
12. Watson SA, Morris TM, Collins HM. Inhibition of tumor growth by marimastat in a human xenograft model of gastric cancer: relationship with levels of circulating CEA. **Br J Cancer** 1999; 81:19-23
13. Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MH and Balkwill FR. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. **Cancer Res.** 1993; 53:2087-2091
14. Eccles SA, Box GM, Court WJ, Bone EA, Thomas W and Brown PD. Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). **Cancer Res.** 1996; 56:2815-2822
15. Sledge GW Jr, Qulali , Goulet R, Bone EA and Fife R. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. **J Natl Cancer Inst.** 1995; 87 :1546-1550
16. Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ and Joffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient –like orthopic model in nude mice. **Cancer Res.** 1994; 54:4726-4728
17. Nemunaitis J, Poole C, Primrose J, Rose murgy A, Malfetano J, Brown P, Berrington A, Cornish A, Lynch K, Rasmussen H, Kerr D, Cox D and Millar A. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumour markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies. **Clin Cancer Res.** 1998; 4:1101-1109
18. Primrose JN, Bleiberg H, Daniel F, Van Belle S, Mansi JL, Seymour M, Johnson PW, Neoptolomos JP, Baillet M, Barker K, Berrington A, Brown PD, Milalr AW and Lynch KP. Pilot study of oral marimastat in recurrent colorectal cancer: and evaluation of biological activity by measurement of carcinoembryonic antigen. **Br J Cancer.** 1999; 79:509-514

19. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nat Med.**1995;1(2):149-53
20. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Eng J Med.** 1995;333(26): 1757-63
21. Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst.** 1990;82:4-6
22. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** 1996;86(3):353-64
23. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Mol Cell Biol,** 1996;16(9):4604-13
24. Bunn HF, Poyton RO, Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. **Physiol Rev.** 1996;76:839-85
25. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1995;92 (3): 768-72
26. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia –mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. **Nature** 1996;379:88-91
27. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. **Science** 1994;265(5178):1582-4
28. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. **Cancer Res.** 1995;55 (20):4575-80
29. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth-factor gene-expression. **Cancer Res.** 1995;55:6161-65
30. Brooks PC. Cell –adhesion molecules in angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** 1996;15:187-94

31. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72(6):835-46
32. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Feta liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(16):7533-7
33. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255(5047):989-91
34. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6(9):1677-83
35. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996;7(3):259-70
36. Kim KJ, Li B, Winer J et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362 (6423):841-4
37. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-d1 mutant. *Nature*. 1994;367 (6463):576-9
38. Millauer B, Longhi MP, Plate KH et al. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res*. 1996;56(7):1615-20
39. Lin P, Buxton JA, Acheson A et al. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95 (15):8826-34
40. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulation cellular ecology. *Cell* 1997;91 (4):439-42
41. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion : from correlation and causality to the clinic. *Semin Cancer Biol*. 1996;7 (3):147-54

42. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. **Thromb Haemost.** 1997;78(1):285-96
43. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science.** 1997;264 (5158):569-71
44. Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** 1996;15 (2): 187-94
45. Denekamp J, Hobson B. Endothelial –cell proliferation in expermental tumours. **Br J Cancer.** 1982;46 (5):711-20
46. Denekamp J. Vascular attack as therapeutic strategy for cancer. **Cancer Metastasis Rev.** 1990;9(3)267-82
47. Denekamp J. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. **Br J Cancer.** 1982;45(1):136-9
48. Isaacson, J.H. and Cattanaach, B.M., Report, **Mouse News Lett.** 27,31,1962.
49. Flanagan, S.P.'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse, **Gen.Res. (Camb.)**,8,295,1966.
50. Pantelouris, E.M., Absence of thymus in a mouse mutant, **Nature (London)** 217,370,1968.
51. DeSousa, M.A.B.,Parrott,D.V.M., and Pantelouris, E.M., The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus, **Clin.Exp.Immunol.** 4,637,1969.
52. Rygaard, J. and Povlsen, C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice, **Acta.Path. Microbiol.Scand.** 77,758,1969.
53. Povlsen, C.O., Heterotransplants of human tumors in nude mice, **Antibiotics Chemothre.** 28,15,1980
54. Jewett, M.A.S., Testis carcinoma; transplantation into nude mice, **Natl.Cancer Inst. Monogr.** 49,65,1970
55. Shimosato, Y., Kamey, T., Nagai,K., Hirohashi,S.,Koide,T.,Hayashi,H., and Nomura, T., Transplantation of human tumors in nude mice. **J.Natl.Cancer Inst.** 56,1251,1976

56. Fogh, J., Tiso, J., Orfeo, T., Sharkey, F. E., Daniels, W.P., and Fogh, J.M., Thirty-four lines of six human tumor categories established in nude mice, **J. Natl. Cancer Inst.** 64,745, 1980
57. Sharkey, F.E., and Fogh, J., Considerations in the use of nude mice for cancer research, **Cancer Metast. Rev.** 3,341, 1984
58. Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T., One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice, **J. Natl. Cancer Inst.** 59,221, 1977
59. Fodstad, O., Brogger, A., Bruland, O., Solheim, O.P., Nesland, J.M., and Pihl, A., Characteristics of a cell line established from a patient with multiple osteosarcoma, appearing 13 years after treatment for bilateral retinoblastoma, **Int. J. Cancer.** 77,1247, 1986
60. Hansen, C.T., The nude gene and its effects, in: **The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research**, Fogh, J. and Giovanella, B.C., Eds., Academic Press, London, 1978, 1.
61. Azar, H.A., Hansen, C.T., and Costa, J., N:NIH(S) II-nu/nu mice with combined immunodeficiency. A new model for human tumor heterotransplantation, **J. Natl. Cancer Inst.** 65,421, 1980
62. Karre, K., Klein, G.O., Kiessling, R., Klein, G., and Roder, J.C., In vitro NK-activity and in vivo resistance to leukemia: studies of beige, beige/nude and wild-type hosts on C57BL background, **Int. J. Cancer.** 26,789, 1980
63. Roder, J.C. and Duwe, A., The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. **Nature** (London), 278,451, 1979
64. Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J., and Starkey, J.R., Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice, **Nature**(London), 284,522, 1980
65. Hanna, N., Role of natural Killer cells in control of cancer metastasis, **Cancer Metast. Rev.** 1,45, 1982
66. Fodstad, O., Hansen, C.T., Cannon, G.B., Statham, C.N., Lichtenstein, G., and Boyd, M.R., Lack of correlation between natural killer activity and tumor growth control in nude mice with different immune defects, **Cancer Res.** 44,4403, 1984
67. Hanna, N. and Fidler, I.J., Expression of metastatic potential of allogeneic and xenogeneic neoplasms in young nude mice, **Cancer Res.** 41,438, 1981

68. Fidler, I.J., Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis, **Cancer Metast. Rev.** 4,29,1986
69. White, A.C., Lelkly, J.A., and McGrath, C.M., Site-selective growth of a hormone-responsive human breast carcinoma in athymic mice, **Cancer Res.** 906,1982
70. McLemore, T.L., Eggleston, J.C., Shoemaker, R.H., Abbott, B.J., Bohman, M.E., Liu, M.C., Fine, D.L., Mayo, J.G. and Boyd, M.R., Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice, **Cancer Res.** 48,2880,1988
71. Povlsen, C.O., Heterotransplantation of human malignant melanomas to the mouse mutant nude, **Acta Path. Microbiol. Scand.** 84,9,1976
72. Epstein, A.L., Herman, M.M., Kim, H., Dorgmann, R.F., and Kaplan, H.S., Biology of the human malignant lymphomas. III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse, **Cancer** 37,2159,1976
73. Fodstad, O., Aamdal, S., McMenamin, M., Nesland, J.M., and Pihl, A., A useful new experimental metastasis model in athymic, nude mice. Characteristics of the LOX human malignant melanoma, **Int. J. Cancer** 41,442,1988
74. Giavazzi, R., Campbell, D.E., Jessup, J.M., Cleary, K., and Fidler, I.J. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted in to different sites in nude mice, **Cancer Res.** 46,1928,1986
75. Naito, S., von Eschenbach, A.C., Giavazzi, R., and Fidler, I.J., Growth and metastasis of tumor cells implanted into different organs of nude mice, **Cancer Res.** 46,4109,1986
76. Kjonniksen, I., Nesland, J.M., Pihl, A., and Fodstad, O., A nude rat model for studying metastasis of human tumor cells to bone and bone marrow, **J. Natl. Cancer Inst.** 82,408,1990
77. Hamilton, T.C., Young, R.C., Louie, K.G., Behrens, B.C., McKoy, W.M., Grotzinger, K.R., and Ozols, R.F., Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice, **Cancer Res.** 44,5286,1984

78. Kozlowski, J.M., Fidler, I.J., Campbell, D., Xu,X.L.,Kaighn,M.E., and Hart, I.R., Metastatic behavior of lhuman tumor cell lines grown in the nude mouse, **Cancer Res.** 44,3522,1984
79. Aamdal, S.,Fodstad, O., Nesland, J.M., and Pihl, A., Characteristics of human tumour xenografts transplanted under the renal capsule of immunocompetent mice, **Br.J.Cancer** 51,347,1985
80. Fodstad,O, Tveit, K.M., Rofstad, E.K., and Pihl, A., Spontaneous alteration in growty rate of two human melanoma xenografts. Concurrent change in chemosensitivity, **Eur .J. Cancer Clin. Oncol.** 19,1175,1983
81. Bennet, D.C., Dexter, T.J., Ormerod, E.J., and Hart, I.R., Increased experimental metastatic capacity of a murine melanoma following induction of differntiation, **Cancer Res.** 3239,1986
82. Clarke , R., Brunner, N., Katzenellenbogen, B.S., Thompson, E. W.,Norman, M.J., Koppi,C.,Paik,S., Lippman, M.C., and Dickson, R.B., Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo, **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 86,3649,1989
83. Steel,G.G., Courtenay,V.D., and Peckham,M.J., The response to chemotherapy of a variety of human tumor xenografts, **Br.J.Cancer** 47,1,1983
84. Nakatani, K., Takahashi, S., Shiratori,T., and Konishi, Y., Heterotransplantation of human gastric carcinomas into nude mice, **World J. Surg.** 3.641,1979
85. Povlsen, C.O. and Tygaard, J., Heterotransplantation of humahn adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantation, **Acta Path. Microbiol,ImmunolScand.** 80,713,1971
86. Auerbach, R., Morrissey,L.W., and Sidky,Y.A., Regional differences in the incidence and growth of mouse tumors following intradermal of subcutaneous inoculation,**Cancer Res.** 38,1739,1978
87. Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix:Rhoads Memorial Award lecture. **Cancer Res.** 1986; 46:1
88. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. **Lab Invest.** 1983; 49:636



89. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cell** 1991; 64:327
90. Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. Matrix metalloproteinases. **J. Biol.Chem.** 1999; 274,21491-21494
91. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. **Physiol Rve.**1993; 73:161
92. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. **Semin Cancer Biol.** 1996; 7:147
93. Pak J, Liu C, Huangpu J, Graham J. Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. **FEBS Lett.**1997; 404:283
94. Lovejoy B, et al. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. **Science** 1994; 263: 375-377
95. Sato H, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. **Nature.** 1994; 370: 61-64
96. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. **Curr Opinion Cell Biol.** 1993; 5:891
97. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase. **J Biol Chem.** 1992; 267:3581
98. Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membranetype subclass in the MMP family. **J Biol Chem.** 1995; 270:23013
99. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2. **FEBS Lett.** 1996; 393:101
100. Massova, I. Et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. **FASEB J.** 1998; 12:1075-1095
101. Brown, P.D. Matrix metalloproteinase inhibitors. **Angiogenesis.** 1997; 1:142-154

102. Edwards, D.R. et al. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int. J. Obes.* 1996; 2:S9-S15
103. Gomez, D.E. et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; 74:111-122
104. Murphy G, et al. Assessment of fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:6632-6636
105. Gross, J. and Lapiere, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1962; 48:1014-1022
106. Jones, L, et al. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Ann. New York Acad. Sci.* 1999; 880:288-307
107. Shalinsky, D.R. et al. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG 3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Ann. New York Acad. Sci.* 1999; 878:236-270
108. Matrisian, L.M. et al. Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 1996; 6:1679-1686
109. Liotta, L.A. et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 1980; 284: 67-68
110. Nakajima, M. et al. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* 1987; 47:4869-4876
111. Murphy, A.N. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell Physiol.* 1993; 157:351-358
112. Alvarez, O.A. et al. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases., *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82:589-595
113. Khokha, R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86:299-304
114. Chambers, A.F. and Matrisian, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89:1260-1270

- 115.Koop, S. et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. **Cancer Res.** 1990; 54:4791-4797
- 116.Xia, T. et al. Comparison of cleavage site specificity of gelatinases A and B using collagenous peptides. **Biochim. Biophys. Acta.** 1996; 1293:259-266
- 117.Biswas , C. et al. The human tumor cell –derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. **Cancer Res.** 1995; 55:434-439
- 118.Sternlicht, M. D. et al. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. **Cell** 1999; 98:137-146
- 119.Rudolph-Owen, L.A. et al. The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis. **Cancer Res.** 1998; 58:5500-5506
- 120.D'Armiento, J. et al. Collagenase expression in transgenic mouse skin causes hyperkeratosis and acanthosis and increases susceptibility to tumorigenesis. **Mol. Cell. Biol.** 1995; 15:5732-5739
- 121.Masson, R, et al. In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. **J. Cell Biol.** 1998; 140:1535-1541
- 122.Brooks,P.C. et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity . **Cell** 1998; 92:391-400
- 123.Itoh, T. et al. Reduced angiogenesis asnd tumor progression in gelatinase A-deficient mice. **Cancer Res.** 1998; 58:1048-1051
- 124.Montgomery, A.M.P. et a. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  rescues melanoma cells from apoptosis in a three-dimensional dermal collagen. **Proc Natl. Acd. Sci. U.S.A.** 1994; 91:8856-8860
- 125.Giannelli, G. et. al. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. **Science** 1997; 277:225-228.
- 126.Imai, K. et. al. Degradation of decorin by matrix metalloproteinase: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta 1 release. **Biochem. J.** 1997; 322:809-814.

127. Ugwu, F, et. al. Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3). **Biochemistry** 1998; 37:7231-7236.
128. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspective of intravital microscopy bridge over from in vitro to in vivo. **Immunol Today**. 1993;14:519-22.
129. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skinfold. **Microvasc Res**. 1979;18:311-8.
130. Lehr HA, Leuning M, Menger MD, Nolte D, Messmer K, Technical advances: Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. **Am J Pathol**. 1993;120:24-5/154/5.
131. Endrich B, Asaishi K, Gotz A. A new chamber technique for microvascular intravital studies in unanesthetized hamsters. **Res Exp Med (Berl)** 1980; 177:125-34.
132. Beckett H, Bone EA, Brown PD. BB-2516: An orally bioavailable matrix metalloproteinase inhibitor with efficacy in animal cancer model. **Proceeding of The American Association for Cancer Research** 1995; 36:100.
133. Committee on Care and Use of the "Nude" Mice. Guide for the care and use of the nude (thymus-deficient) mouse in biomedical research. **LAR news**. 1976; 19(2): M1-M20.
134. Canadian Council on Animal Care. Laboratory mice. In: **Guide to the care and use of experimental animals**. pp. 149-161.
135. Watson SA, Morris TM, Collins HM. Inhibition of tumor growth by marimastat in a human xenograft model of gastric cancer: relationship with levels of circulating CEA. **Br J Cancer** 1999; 81: 19-23.
136. Yanagi K, Ohshima N. Intravital observation of microvasculature of an inoculated tumor under intravital near-infrared fluorescent microscope: a study using peritoneal disseminated model. **J Jpn Coll Angiol**. 1993; 33:437-40.
137. Sasahara K, Endo M, Danjo T. An electron microscopic study on permeability of blood vessels following administration of antitumor agents for induced tongue carcinoma. **Jpn J Oral Maxillofac Surg**. 1991; 37: 433-6.
138. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proc Natl Acad Sci. USA**. 1998; 95:4607-4612.

139. Newton HB. Novel chemotherapeutic agents for the treatment of brain cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000; 9(12): 2815-29.
140. Brammer R, Buckels J, Bramhall S. Advances in non-operative therapy in pancreatic cancer. *Int J Clin Pract*. 2000; 54(6): 373-81.
141. Primrose JN, Bleiberg H, Daniel F, et al. Marimastat in recurrent colorectal cancer: exploratory evaluation of biological activity by measurement of carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer*. 1999; 79(3-4): 509-14.
142. Wojtowicz-Praga S, Torri J, Johnson M, et al. Phase I trial of marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16(6): 2150-6.
143. Neijt JP. Cytostatic treatment of ovarian cancer. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1999; 143(44): 2181-5.
144. Smit JW, van der Pluijm G, Romijn HA, et al. Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid* 1999; 9(9): 913-9.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Ethics of Animal Experimentation

These principles are presented to provide guidance and assistance to all those utilizing vertebrates in the conduct of research, teaching or testing.

In the establishment of ethical principles concerning animal experimentation, an effort has been made to incorporate the majority of the suggestions made by members of the Canadian Council on Animal Care, the Canadian Federation of Humane Societies, and other individuals concerned with the humane treatment of animals.

The polarized views of those at the extreme ends of the spectrum of the question of animal usage have, of necessity, been precluded i.e. those wishing to conduct experiments with little or no constraints regarding infliction of pain; those opposed, on humanitarian principles, to any suffering whatsoever.

Those using conscious animals should apply to their studies such tenets as Russell and Burch's "3R" principle of reduction, replacement and refinement<sup>a</sup>, Dr. Carol Newton's "3S" principle of good science, good sense and good sensibility<sup>b</sup>, and Dr. H.C. Rowsell's "3R" tenet: the right animal for the right reasons<sup>c</sup>.

1. In studies involving animals there must be reasonable expectation that such studies will contribute significantly to knowledge which may eventually lead to the improvement of the health and welfare of either Man or animals.
2. Investigators have a moral obligation to abide by the humanitarian dictate that experimental animals are not to be subjected to unnecessary pain or distress.
3. If pain or distress are necessary concomitants of the experimental study, then these should be minimized both in intensity and duration.
4. An animal that is observed to be in a state of severe pain which cannot be alleviated should be immediately destroyed, using a humane, acceptable method for euthanasia which must include, as an initial action, rapid production of unconsciousness.
5. Studies such as toxicological and biological testing, cancer research and infectious disease investigation may require continuation until the death of the animal. This requirement, in the face of distinct and irreversible signs that toxicity, infectious processes or tumor growth have been reached and are

causing severe pain and distress would clearly violate the principles outlined above. In such cases, alternative end points should be sought which would not only satisfy the objectives of the study but also give humane consideration to the animal.

6. In test procedures the investigator should be especially cautious with tests which may cause pain and distress. Acceptance should not be based on cheapness and ease of application.
7. Experiments involving the withholding of food and water should be short-term and have no detrimental effect on the health of the animal.
8. Prolonged physical restraint procedure which result in distress or ill effects should only be used after alternative procedures have been considered and found inadequate.
9. The use of painful experiments solely for the instruction of students or for the demonstration of established scientific knowledge in e.g. exhibitions, conferences or seminars, cannot be justified.
10. It is accepted that where the animal is anesthetized and insensitive to pain during an entire experimental study and euthanized before regaining consciousness, there is no conflict of opinion concerning the acceptability of experimental procedures as long as the studies abide by the principles enunciated in this document. This applies also to the conduct of an experiment which involves no pain or distress to the animal. However, in the use of conscious animals an informed assessment of the degree of pain and its duration is required, in order to relate these acceptable, or unacceptable, limits. investigators must be especially prudent in their use of the following procedures:
  - a) experiments involving withholding pre and post-operative pain-relieving medication;
  - b) paralyzing and immobilizing experiments .where there is no reduction in the sensation of pain;
  - c) electric shock as negative reinforcement;
  - d) extreme environmental conditions such as low or high temperatures, high humidity, modified atmospheres, etc.



It must be understood that the degree of pain involved should never exceed that determined by the humanitarian importance of the problem to be solved by the experimental study. The following procedures must be restricted and used only when, on the basis of expert opinion it is anticipated that their utilization will undoubtedly contribute knowledge or benefit to Man or animals:

- a) prey killing and fighting experiments;
- b) experimental burn studies and fracture studies.

These studies require anesthesia during procedures, followed by analgesia.

11. Certain experimental procedures are known to inflict excessive pain and are thus unacceptable. These include:

- a) utilization of muscle relaxants or paralytics (curare and curare-like) alone, without anesthetics, during surgical procedures;
- b) traumatizing procedures involving crushing, striking or beating in unanesthetized animals or in animals allowed to recover from the anesthesia.

The above principles should be applied in conjunction with this Guide.

The CCAC, by endorsing and circulating these principles has assumed a responsibility to determine that they are being adhered to nationally and to assure its member agencies through the reports of its assessment panels that this is so. Each local animal care committee and the administrative officer(s) to whom it reports have a similar responsibility within the institution. It is urged that this responsibility be included in the animal care committee terms of reference.

The CCAC through its officers is available to act as arbiters to assist institutional committees and investigators with problems involving ethics of experimentation that prove difficult to resolve at the local level. However, it must be reiterated and emphasized that responsibility for passing judgment on the scientific merit and validity of experimental protocols rests exclusively with the granting agencies and institutional research committees.

- 
- a.** Russell, W.M.S. and Burch, R.L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Charles Thomas, Springfield, Ill.
  - b.** Proceedings of the symposium on *The Future of Animals, Cells, Models and Systems in Research, Development, Education and Testing*, NAS-ILAR, Washington, D.C. 1975
  - c.** Proceedings of the 1978 Convention of the Canadian Association for Laboratory Animal Science (to be published).

## ประวัติผู้ทำวิทยานิพนธ์

นายประสาร ขจรรัตนเดช เกิดเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ.2512 ที่เขตป้อมปราบศัตรูพ่าย กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีแพทยศาสตรบัณฑิตจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2536 หลังจากนั้นทำงานเป็นแพทย์ประจำแผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลเจริญกรุงประชารักษ์ กรุงเทพมหานคร เป็นเวลา 1 ปี แล้วเข้ารับการศึกษาต่อปริญญาโท สาขาวิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี พ.ศ.2538-2541 และสอบได้วุฒิปดตรีผู้มีความรู้ความชำนาญทางวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป เมื่อปีพ.ศ. 2541 หลังจากนั้น ในปีพ.ศ. 2541-2542 ได้กลับไปทำงานเป็นแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ สาขาอายุรศาสตร์ อยู่โรงพยาบาลเจริญกรุงประชารักษ์ กรุงเทพมหานคร เป็นเวลา 1 ปี ปัจจุบันอยู่ระหว่างการฝึกอบรม แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์โรคมะเร็ง สาขาวิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย