


การใช้ผลผลิตของอองโคยีน c-erbB-2 และซีพีเพรสเซอร์ยีน p21  
ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสุนัข



นางสิริขจร ตั้งควัฒนา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2544  
ISBN 974-17-0594-8  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การให้ผลผลิตของอองโคยีน c-erbB-2 และซัพเพรสเซอร์ยีน p21 ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสุนัข

โดย

นางสิริขจร ตั้งควัฒนา

สาขา

พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต

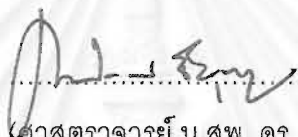
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

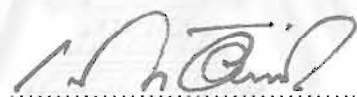
รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ชัยณรงค์ โสहित

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาหมาบัณฑิต




.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



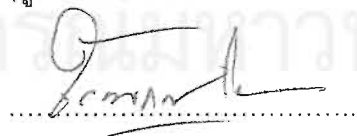
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. เล็ก อิศวพลังชัย)



.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)



.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ชัยณรงค์ โสहित)



.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ  
(นางสาวสุนันทา จริยาเลิศศักดิ์)

สิริขจร ตั้งควัฒนา : การใช้ผลผลิตของอองโคยีน c-erbB-2 และซัพเพรสเซอร์ยีน p21 ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสุนัข (The Use of c-erbB-2 Oncogene and p21 Suppressor Gene Products as a Prognostic Factor in Canine Malignant Mammary Tumor) อ.ที่ปรึกษา : รศ. สพ.ญ. ดร. อัจฉริยา ไสละสูต , อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ , อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. น.สพ. ดร. ชัยณรงค์ โลหิติต , 109 หน้า.  
ISBN 974-17-0594-8

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการใช้ผลผลิตของอองโคยีน c-erbB-2 และซัพเพรสเซอร์ยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสุนัข โดยศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับลักษณะจุลพยาธิวิทยาของมะเร็ง ตามระบบการแบ่งของ WHO การตรวจนับ PCNA และปัจจัยต่างๆ ทางคลินิกจากตัวอย่าง 96 ราย โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

ผลการศึกษาพบว่าผลผลิตของยีน c-erbB-2 ซึ่งพบที่เยื่อหุ้มเซลล์และในไซโตพลาสซึม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับลักษณะจุลพยาธิวิทยา และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การนับ PCNA แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปัจจัยทางคลินิก ได้แก่ ขนาดของมะเร็ง และอายุของสุนัข ( $p < 0.05$ ) สำหรับผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ส่วนใหญ่ตรวจพบในไซโตพลาสซึม และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความรุนแรงและขนาดของก้อนมะเร็ง ( $p < 0.05$ ) ระดับผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับประเภทของมะเร็ง ( $p < 0.05$ ) ผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การนับ PCNA แม้ว่าการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 ไม่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยความร้ายแรงใดๆ ของมะเร็งเต้านมสุนัข แต่สามารถใช้วินิจฉัยจำแนกมะเร็งกลุ่มเยื่อบุได้ จากผลการศึกษานี้ ผลผลิตของยีนทั้งสอง ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสุนัขได้ การตรวจพบผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในมะเร็งเต้านมสุนัขสามารถใช้เป็นแนวทาง ในการพัฒนาการใช้ผลผลิตของยีนในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคในสัตว์ต่อไป

ภาควิชา พยาธิวิทยา  
สาขาวิชา พยาธิชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อผู้คิด .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##4375566731 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEYWORD: MALIGNANT MAMMARY TUMOR / DOG / C-ERBB-2 / P21 / PCNA

SIRIKACHORN TANGKAWATTANA : THE USE OF C-ERBB-2 ONCOGENE AND P21 SUPPRESSOR GENE PRODUCTS AS A PROGNOSTIC FACTOR IN CANINE MALIGNANT MAMMARY TUMOR. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ACHARIYA SAILASUTA, D.V.M., Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. ANUDEP RUNGSIPIPAT, D.V.M., Ph.D., AND ASSOC. PROF. CHAINARONG LOHACHIT, D.V.M., Dr. med. vet.

109 pp. ISBN 974-17-0594-8

The aim of study was to investigate the use of *c-erbB-2* oncogene and *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* suppressor gene products in the prognosis of canine mammary tumors. Expression of the two genes, detected by immunohistochemical technique, was correlated with histopathological grades followed WHO grading category, PCNA count and clinicopathological data obtained from 96 dogs with malignant mammary tumors.

The results showed that membranous and cytoplasmic *c-erbB-2* protein did not have statistical difference with histopathological characteristics and averaged PCNA percentage of the tumor except with some clinical factors e.g., tumor size and patient's age ( $p < 0.05$ ). The product of *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>*, mostly found in cytoplasmic form, exhibited a statistical significance with malignancy grades and size of the tumors ( $p < 0.05$ ). Level of the gene expression had statistical difference with histopathological grades of the tumors ( $p < 0.05$ ). In addition, the product of this gene did not show any statistical significance with averaged PCNA percentage. Although the detection of *c-erbB-2* product did not have any relationship with the tumor malignancy, it somehow was beneficial to the differential diagnosis of epithelial type of mammary tumor. In conclusion, it was unable to use both gene products in the prognosis of the canine mammary tumor. However, the product of *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* might be useful for the diagnosis and prognosis of cancers in domestic animals.

ภาควิชา พยาธิวิทยา

สาขาวิชา พยาธิสัตววิทยา

ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของท่านอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และท่านอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทั้งสามท่าน รวมทั้งท่านกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิซึ่งได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้โอกาสได้รับการสนับสนุนทุนการศึกษาพัฒนาสาขาขาดแคลนในระดับปริญญาโท-เอก

ขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความร่วมมือจนสำเร็จได้ดังนี้

- ทบวงมหาวิทยาลัยในการสนับสนุนเงินทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ประจำปีงบประมาณ 2544
- บัณฑิตวิทยาลัย และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอนุมัติเงินสนับสนุนงานวิจัยระดับปริญญาโท
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในการอนุเคราะห์ตัวอย่างควบคุมและสนับสนุนเทคนิค
- ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ในการใช้เครื่องอบไอน้ำความดันสูง และเจ้าหน้าที่ในการควบคุมเครื่อง
- ภาควิชาสัตวศาสตร์ เภสัชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในการอำนวยความสะดวกการเก็บตัวอย่าง และประวัติทางคลินิก
- ภาควิชาพยาธิวิทยา ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี
- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุพา อ่อนท้วม สถาบันวิจัยทางการแพทย์ และอาจารย์ ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- คุณสุประดิษฐ์ หวังในธรรม คุณสามารถ ธีรชูศรี คุณโสภณ วุฒธา คุณชไมพร อุงเงินโต คุณดวงจันทร์ แก้วเกลี้ยง น.สพ.พิสุทธิ เพ็ญสิทธิพร และคุณประกอบ แยมรุ่ง ในการอำนวยความสะดวกด้านห้องปฏิบัติการ การสืบค้นข้อมูลและตัวอย่างย้อนหลัง และการติดต่อประสานงาน
- Dr. P. L. Fernandez จาก Department of Anatomical Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, University of Barcelona, Spain ในการให้คำปรึกษาและข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา บรรดาพี่ ๆ และที่สำคัญสามีและบุตรในการให้กำลังใจจนทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ .....	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฎ
บทที่	
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
บทที่ 4 การวิเคราะห์ รายงานผล .....	33
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย .....	83
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะและข้อเสนอนแนะ .....	93
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	107
ประวัติผู้เขียน.....	109

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 การตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	35
ตารางที่ 2 แสดงระดับผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกระดับตาม Jing และคณะ (1999).....	35
ตารางที่ 3 แสดงประเภทของมะเร็งเต้านมสุนัขและจำนวนรายที่ตรวจพบ (ผลบวก) และไม่พบ (ผลลบ) ผลผลิตของอองโคยีน c-erbB-2 .....	39
ตารางที่ 4 ประเภทมะเร็งเต้านมสุนัขที่ตรวจพบและจำนวนการตรวจพบผลผลิตการย้อมผลผลิตของยีน c-erbB-2 จำแนกระดับตาม Jing และคณะ (1999).....	40
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบแยกตามระดับความรุนแรงของมะเร็ง..	44
ตารางที่ 6 ระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมสุนัขและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 จำแนกตาม Jing และคณะ (1999) .....	44
ตารางที่ 7 แสดงจำนวนตัวอย่างการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 เปรียบเทียบกับลักษณะการพัฒนานิวเคลียสระดับต่าง ๆ.....	48
ตารางที่ 8 แสดงจำนวนตัวอย่างระดับผลผลิตของยีน c-erbB-2 ในแต่ละระดับ ตามการจำแนกของ Jing และคณะ (1999) แบ่งตามลักษณะการพัฒนานิวเคลียส.....	48
ตารางที่ 9 แสดงประเภทของมะเร็งเต้านมสุนัขและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (ผลบวก) และไม่พบ (ผลลบ) ผลผลิตของซัพเพรสเซอร์ยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	50
ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตการย้อมผลผลิตของซัพเพรสเซอร์ยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนก ตาม Jing และคณะ(1999)ในมะเร็งเต้านมแต่ละชนิด.....	52
ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในระดับความรุนแรงต่าง ๆ ของมะเร็งเต้านมสุนัข .....	53
ตารางที่ 12 จำนวนตัวอย่างมะเร็งเต้านมสุนัขที่ตรวจพบผลผลิตของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกตาม Jing และคณะ (1999) ในตัวอย่างที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ.....	54
ตารางที่ 13 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบต่อผลผลิตของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> กับลักษณะการพัฒนานิวเคลียส .....	56
ตารางที่ 14 จำนวนตัวอย่างแบ่งตามระดับผลผลิตของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ตาม Jing และคณะ (1999) เปรียบเทียบกับลักษณะการพัฒนานิวเคลียส.....	54

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของการนับ PCNA ที่ตรวจในเซลล์มะเร็ง 1,500 เซลล์  
เปรียบเทียบในระดับความร้ายแรงของมะเร็งเต้านม.....58

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ  
*p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ที่ตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี.....58

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA เปรียบเทียบกับระดับผลผลิตของ  
ยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* โดยการจำแนกตาม Jing และคณะ(1999) .....60

ตารางที่ 18 แสดงผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ ยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* แบ่งตามประเภท  
พันธุ์สุนัข.....62

ตารางที่ 19 ระดับของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จำแนกตาม  
Jing และคณะ (1999) กับพันธุ์สุนัขต่าง ๆ .....62

ตารางที่ 20 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* เปรียบเทียบระหว่างสุนัขเพศเมีย  
ที่ทำหมันกับไม่ได้ทำหมัน.....63

ตารางที่ 21 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ตามการแบ่งของ  
Jing และคณะ(1999) ในสุนัขเพศเมียที่ทำหมันและยังไม่ได้ทำหมัน.....64

ตารางที่ 22 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ในช่วงอายุต่าง ๆ ของสุนัขที่เป็น  
มะเร็งเต้านม.....66

ตารางที่ 23 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ตามแบบของ  
Jing และคณะ (1999) ในช่วงอายุต่าง ๆ ของสุนัขที่ป่วยด้วยมะเร็งเต้านม .....67

ตารางที่ 24 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ในก้อนมะเร็งเต้านม  
ขนาดต่าง ๆ ที่จำแนกตามระบบ TNM system.....69

ตารางที่ 25 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ตามแบบของ  
Jing และคณะ(1999) ในก้อนมะเร็งเต้านมขนาดต่าง ๆ จำแนกตามระบบ TNM system.....69

ตารางที่ 26 การตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จำแนกตามรูปร่าง  
และความแน่นของมะเร็ง .....71

ตารางที่ 27 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จำแนกตาม  
Jing และคณะ (1999) เปรียบเทียบกับรูปร่างและความแน่นของมะเร็ง.....72

ตารางที่ 28 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* เปรียบเทียบกับการพบรอยโรค  
ที่พบที่ก้อนมะเร็ง.....76



ตารางที่ 29 ผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> และ $p21^{WAF1/CIP1}$ จำแนกตาม Jing และคณะ(1999) เปรียบเทียบกับการพบการตกเลือด เนื้อตาย และหนอง.....	77
ตารางที่ 30 การตรวจพบแผลหลุมและถุงน้ำ.....	78
ตารางที่ 31 ผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> และ $p21^{WAF1/CIP1}$ เปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลง ของต่อมน้ำเหลืองและการพบการแพร่กระจาย.....	79
ตารางที่ 32 ผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> และ $p21^{WAF1/CIP1}$ จำแนกตาม Jing และคณะ(1999) เปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองและการพบ การแพร่กระจาย.....	80
ตารางที่ 33 ผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> และ $p21^{WAF1/CIP1}$ เปรียบเทียบกับการมีชีวิตและ เสียชีวิตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านม.....	82
ตารางที่ 34 ระดับผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> และ $p21^{WAF1/CIP1}$ จำแนกตาม Jing และคณะ(1999) เปรียบเทียบกับการมีชีวิตและเสียชีวิตของสุนัขที่ป่วยด้วยโรค มะเร็งเต้านม.....	82

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนตัวรับจำเพาะในกลุ่ม EGF family (ซ้าย) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย extracellular, transmembrane และ intracellular domain (Pawson, 1996).....	15
รูปที่ 2 แสดงสมมติฐานความเกี่ยวข้องของ p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ในวัฏจักรของเซลล์โดยจับกับ CDK/D1 ก่อนผ่าน retinoblastoma gene product pathway (ดัดแปลงจาก Fernandez et al., 1998).....	17
รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งของต่อมน้ำเหลืองที่ใกล้เคียงกับเต้านมสุนัข (Owen, 1979).....	20
รูปที่ 4 ภาพการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมสุนัขด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ABC; DAB) และย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin .....	36
รูปที่ 5 ผลบวกของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมสุนัขด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ABC; DAB) และย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin .....	37
รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนประเภทมะเร็งเต้านมสุนัขจำแนกตาม WHO (Hampe and Misdorp, 1974) ในกลุ่มศึกษา .....	41
รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตาม WHO ( Hampe and Misdorp, 1974) ของมะเร็งเต้านมสุนัขแต่ละประเภท (H&E).....	42
รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของระดับความรุนแรงต่าง ๆ ของมะเร็งเต้านมสุนัข....	45
รูปที่ 9 ลักษณะของนิวเคลียสที่มีการพัฒนาระดับต่าง ๆ (H&E) .....	47
รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงผลผลิตของยีน p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> เปรียบเทียบกับประเภทของมะเร็งเต้านมสุนัข .....	51
รูปที่ 11 ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ที่ให้ผลบวก PCNA ในมะเร็งเต้านมสุนัข (DAB) ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin .....	59
รูปที่ 12 แผนภาพแสดงการกระจายความถี่ของสุนัขกลุ่มศึกษาที่เป็นมะเร็งเต้านมตามอายุ.....	65
รูปที่ 13 ลักษณะรูปร่างแบบต่าง ๆ ของมะเร็งเต้านมสุนัข.....	73
รูปที่ 14 ลักษณะรอยโรคที่พบที่ก้อนมะเร็งเต้านมสุนัข .....	74

## สัญลักษณ์และคำย่อ

ABC	: avidin biotin complex system
ACC	: adenocarcinoma
BRCA	: breast and ovarian cancer susceptibility
CA	: carcinoma
c-erbB-2 (ตัวเฉียง)	: ยีนที่ผลิตโปรตีน c-erbB-2 โดยที่ c = cellular erb = erythroblastosis B-2 = type B-2
c-erbB-2 (ตัวตรง)	: โปรตีนตัวรับจำเพาะที่ผลิตมาจากยีน c-erbB-2
ER	: estrogen receptor
HPF	: high power field
p21 <sup>waf1/cip1</sup> (ตัวเฉียง)	: ยีนที่ผลิตโปรตีน p21 <sup>waf1/cip1</sup>
p21 <sup>waf1/cip1</sup>	: protein ขนาดมวลโมเลกุล 21 กิโลดาลตันชนิด waf1 = wide-type activated fragment, cip1 = cyclin-dependent interactive protein 1
CDK	: cyclin-dependent kinase
CDKI	: cyclin-dependent kinase inhibitor
DAB	: 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride
PBS	: phosphate buffer saline
PCNA	: proliferating cell nuclear antigen
PR	: progesterone receptor
Rb	: retinoblastoma
TNM system	: tumor node and metastasis grading system
WHO	: World Health Organization

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากมลพิษต่าง ๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เกิดเจ็บป่วยได้มากขึ้น มะเร็งเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง สำหรับในทางการแพทย์ มะเร็งเต้านมนับเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญในการเสียชีวิตของสตรี ในการรักษานอกจากจะกำจัดมะเร็งที่เป็นสาเหตุแล้ว การตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคโดยพยาธิแพทย์จะมีผลต่อการให้การบำบัดรักษาทางคลินิกได้เป็นอย่างดี

การวินิจฉัยพบมะเร็งเต้านมในระยะแรก จะช่วยในการวางแผนการรักษาเพื่อควบคุมมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ การวินิจฉัยเบื้องต้นกระทำโดยการตรวจทางเซลล์วิทยา (cytology) และจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ซึ่งจะนำไปประกอบกับข้อมูลทางคลินิก การตรวจร่างกาย และการตรวจพิเศษอื่น ๆ เช่น การถ่ายภาพรังสีเต้านม (mammogram) ในบางครั้งเมื่อทำการรักษาแล้วอาจจะมีการงอกขึ้นใหม่ของก้อนมะเร็ง ดังนั้นจำเป็นต้องหา tumor marker ที่สามารถทำให้ตรวจพบมะเร็งรวมทั้งการงอกขึ้นใหม่ ที่มีความไวและได้ผลเร็วที่สุด ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้ในการตรวจองโคจีน (oncogene) รวมทั้งผลผลิตจากยีนอื่นๆ เพื่ออธิบายถึงกลไกการเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ รวมทั้งมะเร็งเต้านมด้วย ซึ่งนำมาใช้ทางคลินิกเพื่อการวินิจฉัยเบื้องต้นและกรณีที่ไม่สามารถตรวจพบโดยวิธีอื่นๆ ตลอดจนการพยากรณ์โรค การติดตามผลการรักษาเพื่อป้องกันหรือจัดการงอกขึ้นใหม่ของมะเร็งอีกด้วย

สำหรับในสัตว์นั้นพบว่า สุนัขซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิดกับมนุษย์ ก็พบอุบัติการณ์ของโรค มะเร็งเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากข้อมูลการสำรวจอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งในสัตว์ พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเต้านมเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งของผิวหนัง ที่สามารถพบได้ในทั้งสองเพศ แต่เพศเมียมีอุบัติการณ์สูงกว่า (Moulton, 1990) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2525 ถึง พ.ศ.2543 พบว่าจากเนื้องอกหรือมะเร็งที่ได้รับการชันสูตร 2,444 ราย เป็นเนื้องอกหรือมะเร็งของเต้านมจำนวน 686 ราย (28.07 เปอร์เซ็นต์) เป็นอันดับสองรองจากเนื้องอกระบบผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน และส่วนใหญ่เป็นสุนัขเพศเมีย สำหรับเนื้องอกจากเต้านมสุนัขที่ถูกส่งมาตรวจพิสูจน์จำนวน 692 รายนั้น พบว่าเป็นมะเร็งชนิดต่าง ๆ จำนวน 428 ราย (61.85 เปอร์เซ็นต์) (อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ และคณะ, 2544) เมื่อศึกษาข้อมูลย้อนหลัง 5 ปี (พ.ศ.2540-2544) พบว่ามีจำนวนตัวอย่างจากสุนัขที่เป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

ปัจจุบันได้พบว่ามีปัจจัยและขั้นตอนมากมายเกี่ยวข้องในขบวนการเกิดมะเร็ง รวมทั้งปัจจัยที่เป็นผลจากความผิดปกติของอองโคยีนและซัพเพรสเซอร์ยีน ซึ่งมีการศึกษาทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในวงการสัตวแพทย์มีความสนใจในการศึกษาของโคยีนมากขึ้น โดยมีรายงานการตรวจพบการแสดงออกของอองโคยีน *c-erbB-2*, *EGFR*, *p53* ที่ผ่าเหล่า, *c-kit*, *c-myc* และ *c-yes* ในมะเร็งเต้านมของสุนัข (Ahern et al., 1996; Donnay et al., 1996; Kubo et al., 1998; Inoue and Shiramizu, 1999; Rungsipat et al., 1999) ซึ่งลักษณะที่พบมีความเกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็งคล้ายคลึงเช่นเดียวกับในทางการแพทย์ สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับอองโคยีนและ ซัพเพรสเซอร์ยีน นี้แล้วยังนับว่ามีน้อยมาก โดยเฉพาะการศึกษาถึงการนำไปใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจบทบาทได้ดียิ่งขึ้นและนำไปใช้ทางคลินิกต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแสดงออกของอองโคยีนและซัพเพรสเซอร์ยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งเต้านมสุนัขโดยเทคนิคทางด้านอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในด้านกรวินิจฉัย การพยากรณ์โรคและการรักษาต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์หลักดังนี้

2.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และซัพเพรสเซอร์ยีนชนิด *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* กับประเภทของมะเร็งโดยการจำแนกระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological grading) ของมะเร็งเต้านมสุนัข

2.2 ศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตจากการแสดงออกระหว่างอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และซัพเพรสเซอร์ยีนชนิด *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จากข้อ 1 กับ proliferative marker ชนิด PCNA (proliferating cell nuclear antigen) เพื่อประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์โรคและเป็นข้อมูลประกอบการรักษา

2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และซัพเพรสเซอร์ยีนชนิด *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* กับลักษณะทางคลินิก

## 3. ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาสัตว์ป่วยแบบย้อนหลัง (retrospective study) และแบบไปข้างหน้า (prospective study) โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อและข้อมูลทางคลินิกของสุนัขที่ป่วยด้วยมะเร็งเต้านมสุนัข โดยเน้นที่ประเภทเยื่อบุต่อมสร้างน้ำนม (mammary epithelial origin) การศึกษาประกอบด้วย การตรวจโปรตีนซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของยีนตัวที่ศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเปรียบเทียบกับ การแบ่งประเภทของมะเร็งจากลักษณะจุลพยาธิวิทยา การย้อมติด PCNA รวมถึงลักษณะทางคลินิกต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติต่อไป

#### 4. ข้อตกลงเบื้องต้น

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาตัวอย่างจากมะเร็งเต้านมสุนัขโดยเน้นที่ประเภทเยื่อบุต่อมสร้างน้ำนม และผลการวิจัยจะตอบคำถามดังต่อไปนี้

4.1 ผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และ ซัพเพรสเซอร์ยีน ชนิด *p21*

*WAF1/CIP1* มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมสุนัข หรือไม่

4.2 ผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และ ซัพเพรสเซอร์ยีน ชนิด *p21*

*WAF1/CIP1* มีความสัมพันธ์กับ proliferative marker ชนิด PCNA หรือไม่

4.3 ผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด *c-erbB-2* และ ซัพเพรสเซอร์ยีนชนิด *p21*

*WAF1/CIP1* มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกหรือไม่

#### 5. ข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดที่ข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย ซึ่งในบางรายขาดข้อมูลทางคลินิกบางอย่างไป ทำให้เกิดข้อมูลที่สูญหาย (missing data) ขึ้นได้ โดยเฉพาะในการศึกษาแบบย้อนหลัง นอกจากนี้ในบางรายสุนัขเสียชีวิตจากอุบัติเหตุ ทำให้การติดตามเพื่อวิเคราะห์การพยากรณ์โรคไม่สมบูรณ์

#### 6. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ไม่มี

#### 7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

7.1.1 ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ผลผลิตจากการแสดงออกของอองโคยีนชนิด

*c-erbB-2* และซัพเพรสเซอร์ยีนชนิด *p21*<sup>*WAF1/CIP1*</sup> กับปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้แก่ ลักษณะ





## 9. ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ประกอบด้วยผลจากการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การนับ PCNA และลักษณะต่างๆ ทางคลินิก เนื้อหาที่น่าสนใจจะนำไปเสนอในงานประชุมทางวิชาการ หรือลงตีพิมพ์ในวารสารเฉพาะทาง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้องอก หรือมะเร็งด้านมพบในสุนัขได้มากกว่าสัตว์เลี้ยงประเภทอื่นๆ โดยพบได้มากในสุนัขเพศเมีย และพบได้ตั้งแต่อายุ 2-16 ปี โดยเริ่มเพิ่มขึ้นสูงอายุประมาณ 6 ปีซึ่งถือเป็นช่วง "cancer age" และช่วงอายุ 10-11 ปีเป็นช่วงที่เกิดขึ้นได้มากที่สุด พบได้เป็นอันดับสองรองจากเนื้องอกหรือมะเร็งของผิวหนังและมีความคล้ายคลึงกับในมนุษย์ (Owen, 1979; Moulton, 1990; Ogilvie and Moore, 1996)

ปัจจัยสำคัญต่างๆ ในการพยากรณ์โรค (prognostic factor) มะเร็งด้านมได้ถูกศึกษาและพัฒนามาเป็นระยะเวลาชาน โดยในระยะแรก ๆ อาศัยการแบ่งระยะ (staging) โดยอาศัยลักษณะทางพยาธิกายวิภาคของโรค รวมทั้งทางลักษณะทางคลินิก ซึ่งนอกจากจะใช้ในการพยากรณ์โรคแล้วยังนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจรักษา การเปรียบเทียบผู้ป่วย และการสื่อสารระหว่างผู้ที่เกี่ยวข้องอย่างถูกต้อง นอกจากนี้ปัจจัยในด้านขนาดและอัตราการเจริญของก้อนมะเร็ง การเกิดแผลหลุม การเจริญแทรกเข้าเนื้อเยื่อ ความสามารถในการแพร่กระจาย ระยะเวลาการเกิดโรค รวมถึงการใช้ DNA ploidy (Misdorp and Hart, 1979; Ferguson, 1985; Hellmén et al., 1993) แม้ว่าปัจจัยดังกล่าวมีประโยชน์อย่างมาก แต่ก็ยังไม่สามารถแยกพิสูจน์มะเร็งที่มีความร้ายแรงสูงในแต่ละระยะได้ กล่าวคือความหลากหลายในศักยภาพด้านชีวภาพ (biological potential) พฤติกรรมทางชีววิทยา (biological behavior) ทำให้ไม่สามารถทำนายช่วงระยะเวลาของโรคที่แท้จริงในผู้ป่วยแต่ละคนได้ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาศึกษาปัจจัยอื่นที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจพบการแพร่กระจายของมะเร็งและความรวดเร็วในการเจริญของมะเร็งซึ่งจะทำให้พยากรณ์โรคได้แม่นยำและเที่ยงตรง ซึ่งส่งผลต่อการตัด

สิ้นใจรักษาและการเลือกวิธีการรักษาให้มีประสิทธิภาพ รวมทั้งป้องกันผู้ป่วยจากผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ไม่เหมาะสมกับสภาวะโรค (Donegan, 1992; McGuire et al., 1992; Woldman et al., 1992) แม้ว่าเทคโนโลยีในปัจจุบันสามารถศึกษาลงไปได้ลึกถึงระดับโมเลกุล แต่พบว่าการศึกษา DNA ploidy ยังมีข้อด้อยในการศึกษาพยาธิสภาพที่ไม่ร้ายแรงและเนื้อเยื่อก่อนที่จะพัฒนาเป็นมะเร็ง สำหรับการศึกษาลoss of heterozygosity หรือการศึกษา selective gene amplification จะให้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนได้มาก แต่ก็ต้องอาศัยขั้นตอนและอุปกรณ์ในการวิจัยเครื่องมือหลายชนิด (Woldman et al., 1992) ดังนั้นการศึกษาที่มีประสิทธิภาพและสามารถที่จะนำมาใช้ในทางคลินิกได้นั้น น่าจะเป็นการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ tumor marker ต่าง ๆ ได้เช่นกัน ตัวอย่าง เช่น ตัวรับจำเพาะต่อฮอร์โมน (hormone receptor) proliferative marker ผลผลิตจากยีนที่เกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็ง เป็นต้น

ในทางการแพทย์ได้มีการศึกษาเพื่อหาปัจจัยการพยากรณ์โรคหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสตรี อาทิเช่น ระยะของโรคแบ่งตาม TNM system (Tumor Node Metastasis system; Owen, 1980) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ขนาดของก้อนมะเร็ง รวมถึง biological marker ต่างๆ เช่น proliferative markers ต่างๆ ผลผลิตจากยีน ตัวรับจำเพาะต่อฮอร์โมน เป็นต้น ซึ่งในทางสัตวแพทย์พบว่า ปัจจัยการพยากรณ์โรคเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้เช่นกัน (Masood, 1993; Schwartz and Schwarting, 1998)

Proliferative marker ได้ถูกนำมาใช้เพื่อบ่งบอกความรุนแรงของมะเร็งที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ตัวอย่างของ proliferative marker นี้ได้แก่ thymidine-labeling index (TLI), Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ agyrophillic nucleolar organizer

regions (AgNORs) เป็นต้น PCNA เป็นโปรตีนแอนติเจนของนิวเคลียสที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์เป็น cell cycle regulated nuclear protein มีขนาด 36 กิโลดาลตัน เป็น co-factor ของเอนไซม์ polymerase delta ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ระยะ replication ซึ่งจะมีปริมาณมากที่สุดในระยะ S-phase ของวัฏจักรเซลล์ (Bedrossian, 1993) นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมทางการแพทย์และสัตวแพทย์ Preziosi และคณะ (1995) รายงานการตรวจวัดบริเวณที่ PCNA ให้ผลบวก พบว่าสามารถนำมาวัด proliferative activity ของเนื้องอกทั้งชนิดไม่ร้ายแรงและมะเร็งได้ Löhr และคณะ (1997) รายงานว่าสามารถนำ PCNA มาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ดีเช่นเดียวกับการแบ่งชนิดตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา Funakoshi และคณะ (2000) ระบุว่า ดัชนี PCNA มีประโยชน์มากในการตัดสินความร้ายแรงของเนื้องอกเต้านมในสุนัข นอกเหนือไปจากนั้นมีการค้นพบว่า PCNA เป็นหนึ่งในสิ่งค้ำประกอบของ quaternary complex เช่นเดียวกับ p21, cyclin D และ cyclin-dependent kinase (CDK) (Zhang et al., 1993; Cooper et al., 1999) ดังนั้นการนำ PCNA มาใช้ศึกษาและให้ผลในการวินิจฉัยได้ดี จึงควรนำมาใช้เปรียบเทียบกับการศึกษาคุณค่าในการพยากรณ์โรคของโปรตีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในมะเร็งเต้านมของสุนัข

องโคยีนมีความเกี่ยวข้องในพยาธิกำเนิดของมะเร็งเต้านมทั้งด้านที่เป็น initiator และ promotor องโคยีนกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อ epidermal growth factor (EGF) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทสำคัญในขบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติของเซลล์ ซึ่งเซลล์จะอยู่ในสภาพที่ถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา และส่งผลให้เกิดมะเร็งได้ในที่สุด สำหรับในอีกขบวนการหนึ่งการเกิดมะเร็งเต้านมเป็นผลมาจากความผิดปกติหรือบกพร่องในขบวนการ apoptosis ซึ่งทำให้เซลล์ไม่มีการตายตามอายุขัยส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ขึ้นจนกลายเป็นมะเร็งได้เช่นกัน ในการศึกษาทางการแพทย์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ยีน c-erbB-2 ซึ่งเป็น องโคยีนกลุ่ม epidermal

growth factor receptor และยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ซึ่งเป็นซัพเพรสเซอร์ยีนตัวหนึ่งที่เกี่ยวข้องในขบวนการ apoptosis มีบทบาทในการเจริญและการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านม

อองโคยีนเป็นยีนหรือรหัสพันธุกรรมที่มีความสามารถในการทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์เนื้องอกหรือมะเร็งได้ ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นโดยเป็นผลจากการผ่าเหล่า (mutation) หรือถูกเหนี่ยวนำ (transduce) ด้วยไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม retrovirus ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติ สำหรับโปรโตอองโคยีน (protooncogene) นั้นถือได้ว่าเป็นยีนที่มาจากอองโคยีนนั่นเอง การที่อองโคยีนกลุ่ม EGF มีความเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากยีนของตัวรับจำเพาะเกิดการเปลี่ยนไปเป็นอองโคยีน คือเกิดการผ่าเหล่าและการเปลี่ยนแปลงของยีน หรือโครโมโซม ได้แก่ point mutation, insertion, mutagenesis, chromosomal translocation หรือ gene amplification สำหรับในกลุ่ม EGF แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบการผ่าเหล่าเฉพาะที่ (point mutation) หรือการคัดลอกของยีนหรือดีเอ็นเอ (gene amplification หรือ DNA amplification) (Bishop and Hanafusa, 1996, Fearson, 1996) การคัดลอกของสายดีเอ็นเอดังกล่าวในส่วนของโครโมโซมเกิดการ reduplication อย่างผิดปกติ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอหลายๆ เท่า หรือเรียกว่าเกิด amplification นั่นเอง ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ เนื้องอก glioblastomas ที่มีการเพิ่มจำนวนของยีน EGFR และ *c-erbB-2* จากการเกิด amplification และ overexpression ของโปรตีน (Leon et al., 1994) และจากการศึกษาในเนื้องอกของสัตว์จำพวกฟันแทะ (rodents) มีการเกิดการผ่าเหล่าเฉพาะที่กระตุ้นให้เกิด amplification และ overexpression ของ *c-erbB-2* สำหรับ *c-erbB-2* แล้วยังพบอีกว่าการเกิดการผ่าเหล่าแบบ point mutation ที่ตำแหน่ง 664 เมื่อเกิดการแทนที่กรดอะมิโนวาเลีน (valine) ด้วยกรดอะมิโน กลูตามีน (glutamic acid หรือ glutamine) ก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูป (transformation) จากยีนปกติเป็นอองโคยีนได้ (Bragmann et al., 1986)

## EGF receptor ในขบวนการเกิดมะเร็ง

การเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของตัวรับจำเพาะ (*erbB*) ให้กลายเป็นอองโคยีนเกิดได้กับตัวรับจำเพาะทั้ง 4 ชนิด ซึ่งถ้าหากกล่าวถึงบทบาทของ EGF ในขบวนการเกิดมะเร็งแล้ว ส่วนที่มีบทบาทโดดเด่นก็คือตัวรับจำเพาะของ EGF นั่นเอง การเปลี่ยนแปลงยีนของตัวรับจำเพาะเหล่านี้ไปเป็นยีนก่อมะเร็งนั่นเองที่เป็นจุดสำคัญ กล่าวคือ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนตัวรับจำเพาะ (*erbB*) นี้ อาจจะเริ่มจากโปรโตอองโคยีน โดยที่อาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของตัวรับภายในเซลล์เอง โดยเรียกว่า *c-erbB* หรือเกิดจาก viral transduction (*v-erbB*) การเปลี่ยนแปลงในระดับยีนนี้ทำให้เกิดการสร้าง RNA เพิ่มขึ้นจากปกติ และเกิดการสร้างโปรตีนในปริมาณมาก หรือเกิดการสร้างสัญญาณแบบ autocrine หรือ paracrine signaling (Pawson, 1996) ภายหลังเมื่อยีนของตัวรับนี้เปลี่ยนเป็นอองโคยีนแล้ว เกิดการเข้าคู่กัน (dimerization) ของตัวรับ เกิดความผิดปกติในส่วน extracellular domain (Shibuya et al., 1987) โดยอาจจะเกิดการจับแน่นในสภาพที่กระตุ้นการทำงานตลอดเวลา หรือ อาจมีการเพิ่มจำนวนของตัวรับมากขึ้นและเกิดการเข้าคู่กันเองเกิด dimerization การเข้าคู่กันนี้สามารถเกิดได้ทั้งแบบ homodimerization ของตัวรับที่เหมือนกัน หรือเกิดแบบ heterodimerization ของตัวรับต่างชนิดแต่อยู่ในกลุ่ม *erbB* family เดียวกัน (Bishop and Hanafusa, 1996) เมื่อเกิดการเข้าคู่กันแล้ว จะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต autophosphorylation ในส่วน intracellular domain กระตุ้นให้ตัวรับทำงาน เกิดการแลกเปลี่ยนของโปรตีนภายในที่มีส่วนประกอบของ *src*-homology region 2 (SH2) ทำให้ส่งสัญญาณต่อไปยังนิวเคลียส เกิด transformation ของเซลล์เป็นเนื้องอก หรือมะเร็งต่อไป ปัจจุบันได้มีการศึกษาบทบาทของตัวรับจำเพาะของ EGF อย่างกว้างขวาง ทำให้ทราบว่าในแต่ละประเภทย่อยก็มีความแตกต่างกัน และยังคงศึกษาถึงการนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

## การเปลี่ยนแปลงของยีน *erb-B2*

มีข้อพิงว่า *neu/HER2, ERBB2* โดยคำว่า *erb* มาจากการค้นพบยีน *erbB* จากไวรัสที่ทำให้เกิด avian erythroblastosis และกระตุ้น cellular oncogene โดยวิธี insertional mutagenesis ใน chicken erythroleukemia ยีน *erbB-2* นี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 ภายหลังค้นพบว่ามีความเหมือน (homology) กับยีน *neu* (มาจากชื่อเนื้องอก neuroglioblastoma ที่ค้นพบยีนจากการ transfection กับดีเอ็นเอ จึงชื่อเรียกควบคู่กันไป สำหรับ *HER* นั้นมาจาก heregulin ที่สามารถกระตุ้นโปรตีนตัวรับนี้ได้ (Hesketh, 1994, Jallal and Ullrich, 1995) โปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 185 กิโลดาลตัน (Cooper, 1995) เป็นตัวรับที่ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนที่อยู่ที่ยี่เยื่อหุ้มเซลล์ ที่มี intrinsic PTK (protein tyrosine kinase) activity (รูปที่ 1) โครงสร้างส่วนใหญ่คล้าย *erbB-1* หรือ EGFR เมื่อพิจารณาจากรูปแบบการแสดงออกในสัตว์ทะเลและเนื้อเยื่อที่เจริญสมบูรณ์ กล่าวได้ว่ามีบทบาทในการพัฒนาเป็นเซลล์มากกว่าที่จะเป็น lineage-specific receptor (Jallal and Ullrich, 1995)

ตัวรับ *erb-B2* นี้ถูกกระตุ้นได้จาก NDF (neu differentiation factor) heregulins และ glial-growth factor NDF ถูกกระตุ้นให้ express ได้ด้วย Ras และ NDF สามารถกระตุ้น tyrosine phosphorylation ของตัวรับ *erb-B2* รวมทั้งการเกิดการพัฒนารูปแบบเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งในร่างกาย (*in vitro*) (Peles et al., 1991) NDF precursor เป็น transmembrane protein ที่มี extracellular domain คล้ายกับ EGF domain และ immunoglobulin homology domain มีทั้งน้ำตาลที่ต่อกับตำแหน่ง O- และ N- พบว่าตัวรับ *erbB-2* จับกับไกลโคโปรตีนขนาด 30 กิโลดาลตัน ที่หลั่งออกมาจากมะเร็งเต้านมของคน และจับกับเปปไทด์ขนาด 25 กิโลดาลตัน ที่หลั่งออกมาจากโครมาตินที่ถูกกระตุ้น (Tarakhovsky et al., 1991)

ในการศึกษาตัวรับจำเพาะ c-erbB-2 บนเซลล์มะเร็งนั้น พบว่ายีน c-erbB-2 มีในการคัดลอกสายดีเอ็นเอเฉพาะตำแหน่ง และเกิดการแสดงออกมาก พบได้ในมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุ เช่น มะเร็งเต้านม และรังไข่ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่พบว่ามีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองนั้นพบว่าสัมพันธ์กับ *erbB-2* amplification และบ่งถึงการพยากรณ์โรคที่แย่ง แต่ไม่พบว่าการแสดงออกของยีน *erbB-2* เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง สำหรับในสัตว์นั้นพบการแสดงออกของยีน *oncogenic erbB-2* ในเยื่อต่อมสร้างน้ำนม (alveolar epithelium) ทำให้เกิด ductal carcinoma ซึ่งสามารถโน้มนำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อบุประเภทเดียวกับใน human sclerosing adenosis และ atypical hyperplasia ซึ่งพยาธิสภาพเหล่านี้เป็น precursor ของมะเร็งชนิด ductal carcinoma (Hesketh, 1995)

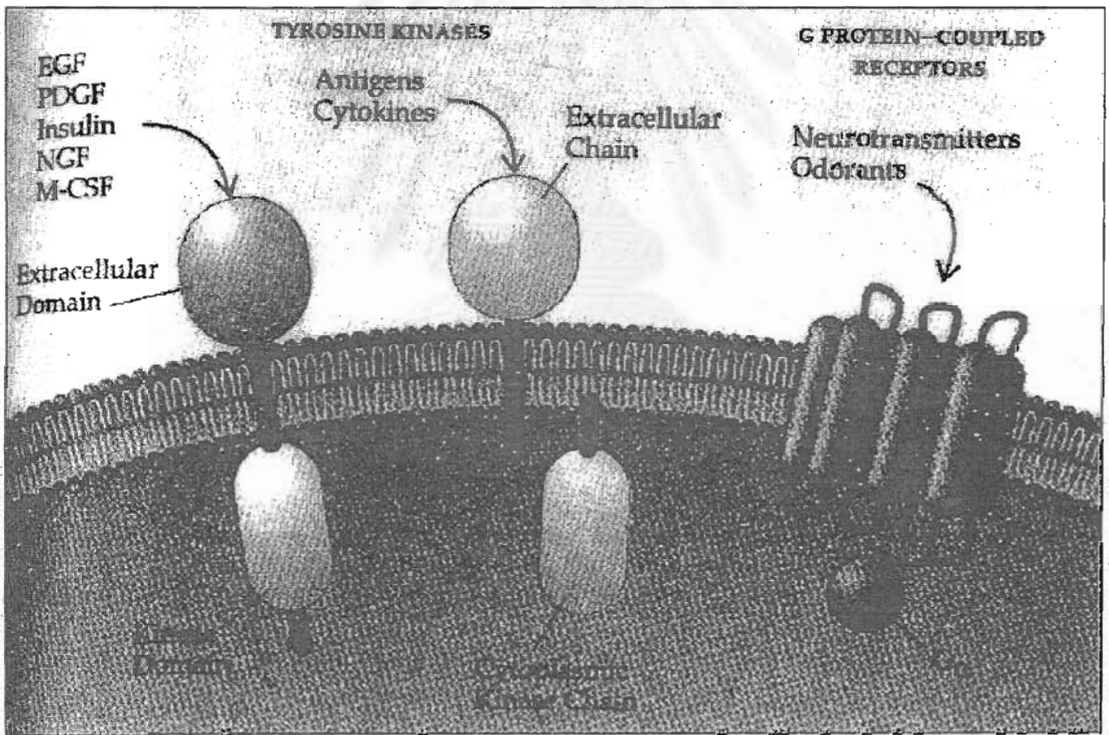
การตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว รวมทั้งเทคนิค ELISA เทคนิคคอลลีวีโมเลกุล อาทิ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) และอื่นๆ การตรวจพบ amplification ของยีน และการแสดงออกมาก ของผลผลิตจากยีน *erbB-2* มีการนำมาใช้ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมากที่สุดในกลุ่ม ยีน *erbB-2* ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลง point mutation ทำให้เซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์เนื้ออก หรือมะเร็งได้ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง รวมทั้งปัจจัยในการพยากรณ์โรค โดยพบว่าการตรวจพบความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบกับความรุนแรงของมะเร็งเป็นไปในทางเดียวกัน (Slamon, Clark, et al., 1987; Slamon, Godolphin, et al., 1989; Quenel et al., 1995) ทำให้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบหาช่วงระยะเวลาของผู้ป่วยที่ปลอดโรค หรือหายจากโรค (relapse-free survival, metastases-free survival และ overall survival) McCann และคณะ (1991) รายงานการตรวจพบโปรตีนของตัวรับจำเพาะในต่อมน้ำเหลืองข้างรักแร้ที่มีการแพร่กระจาย บ่งถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) การศึกษาล่าสุด พบว่าการคัดลอกสายดีเอ็นเอเฉพาะ



ตำแหน่งของยีนยังมีความเกี่ยวข้องกับการต้านยารวมทั้งความไวต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดและฮอร์โมนบำบัด (Sahin, 2000) นอกจากนี้การแสดงออกของยีนมีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายไปยังระบบน้ำเหลืองและเลือด (Jing et al., 1999) ผลจากการศึกษาทางการแพทย์แสดงให้เห็นคุณค่าของยีน *c-erbB-2* ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคและได้ถูกนำไปใช้เป็น prognostic factor ในการตรวจมะเร็งเต้านมสตรีอย่างแพร่หลาย ส่วนการศึกษาโปรตีนตัวรับจำเพาะ *c-erbB-2* ในมะเร็งเต้านมสุนัขเช่นเดียวกัน โดยพบการแสดงออกก่อนที่จะมีการแพร่กระจาย (Ahern et al., 1996; Rungsipat et al., 1999) ฉะนั้นการตรวจพบและการแสดงออกน่าจะนำมาใช้บ่งชี้ถึงความรุนแรงและความสามารถในการแพร่กระจายของมะเร็งได้เช่นเดียวกับทางการแพทย์

สำหรับยีน *p21* นั้นมีการศึกษายังไม่แพร่หลายเท่ายีน *c-erbB-2* ยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  เป็นยีนที่มีการศึกษาในมะเร็งเต้านมทางการแพทย์ มีชื่อเรียกหลายอย่างได้แก่ WAF1 (wild-typed activated fragment) / CIP1 (CDK interactive protein 1) / Sdi1 / Cap20 (Cai and Dynlacht, 1998) โดยยีนจะสร้างโปรตีน *p21* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับขบวนการ apoptosis (รูปที่ 2) สร้างจากยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่เป็น ซัพเพรสเซอร์ยีน ตัวหนึ่งที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ภายในนิวเคลียส โปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  นี้มีบทบาทในการควบคุมจุด checkpoint ของวัฏจักรเซลล์ในช่วงระหว่าง G1 ถึง S-phase โดยทำหน้าที่เป็น cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) ตัวหนึ่ง โดยพบว่าการแสดงออกของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ใ้มนำ cyclin D1 ที่เป็นส่วนประกอบของ G1-checkpoint และเป็นตัวกลางของการทำงานของโปรตีนใน tumor suppression (Chen et al., 1995; Fernandez et al., 1998; Rey et al., 1998) หรือมีความสำคัญต่อ p53-mediated G1 arrest นั้นเอง (Waldman et al., 1995) กล่าวคือ โปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ทำหน้าที่ขัดขวาง cyclin-dependent kinase (CDK) ทำให้วัฏจักรเซลล์ดำเนินไปได้ช้าลงซึ่งเป็นผลจากระยะพัก เพื่อให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ก่อนเข้าสู่ระยะ S-phase นอกจากนี้โปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด cell differentiation และ p53 specific growth arrest pathway โดย  $p21^{WAF1/CIP1}$  ถูกควบคุมขบวน

การคัดลอกโดยจับกับโปรตีน p53 เพื่อทำให้เกิดขบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (Chen et al., 1995; Rey et al., 1998) โปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ยังสามารถใช้แยกความแตกต่างของโปรตีน p53 ระหว่างชนิดปกติ (wild type) และชนิดที่เกิดการผ่าเหล่า (mutated type) (Schwartz and Schwarting, 1998)



รูปที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนตัวรับจำเพาะในกลุ่ม EGF family (ซ้าย) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย extracellular, transmembrane และ intracellular domain (Pawson, 1996)

ในระยะหลังได้มีการค้นพบโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในไซโตพลาสซึมชนิด subcellular localization หรือ ectopic expression หรือ cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์อ่อนและมะเร็งชนิดต่างๆ รวมถึงมะเร็งเต้านม และพบว่าโปรตีน p21 ที่สะสมในนิวเคลียสช่วยทำให้เกิด cell arrest ขณะที่โปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในไซโตพลาสซึมนั้นขัดขวางการเกิด apoptosis (Asada et al., 1999, Winters et al., 2001, Zhou et al., 2001)

การศึกษาการนำไปใช้ในการพยากรณ์โรค พบว่าการแสดงออกของโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ที่นิวเคลียสในระดับสูงมีความสัมพันธ์กับลักษณะความร้ายแรงทางจุลพยาธิวิทยา (Barbareschi et al., 1996) อีกทั้งการพบในไซโตพลาสซึมสามารถนำไปพยากรณ์โรคร่วมกับซัพเพรสเซอร์ยีน หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ apoptosis ได้ (Winter et al., 2001) ดังนั้นการแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> น่าจะนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ต่อไป (Loignon et al., 1997; Wakasugi et al., 1997; Elledge and Allred, 1998) สำหรับการศึกษาโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในสุนัขนั้นพบว่ามีรายงานการแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเนื้องอกของอวัยวะและเนื้องอกผิวหนังชนิดเมลาโนมา พบว่าระดับโปรตีน p53 ชนิดปกติที่สูง และสะสมในนิวเคลียสสามารถที่จะกระตุ้นการทำงานของยีน และพบว่าการสูญเสียโปรตีนนี้ในเซลล์เมลาโนไซต์ อันเนื่องมาจากการผ่าเหล่าของยีนทำให้เกิดเนื้องอกเมลาโนมาได้ (Ritt et al., 1998; Inoue and Wada, 2000)

จากการศึกษาข้างต้นบ่งชี้ถึงการนำยีนทั้งสองมาใช้ในการพยากรณ์โรค อีกทั้งงานวิจัยใหม่ๆ ยังมุ่งเน้นการนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค การวางแผนการรักษาตลอดจนการประเมินผลการรักษาในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามข้อมูลในการนำองโคยีนทั้งสองประเภทมาใช้ทางสัตวแพทย์นั้นยังมีข้อจำกัด แม้ว่าจะมีรายงานการตรวจพบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมและเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งมีแนวโน้มการแสดงออกเช่นเดียวกับการศึกษาทางการแพทย์ (Aherm et al., 1996; Donnay et al., 1996; Rungsipipat et al., 1999) งานวิจัยทางสัตวแพทย์



ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ ซัพเพรสเซอร์ยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  มาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมในสุนัขจึงน่าสนใจในแง่ที่ยังไม่มีผู้ศึกษาในมะเร็งเต้านมของสุนัขมาก่อน โดยศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิด โดยการตรวจผลผลิตโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีเปรียบเทียบกับลักษณะจุลพยาธิวิทยา การใช้ proliferative marker และลักษณะทางคลินิก



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

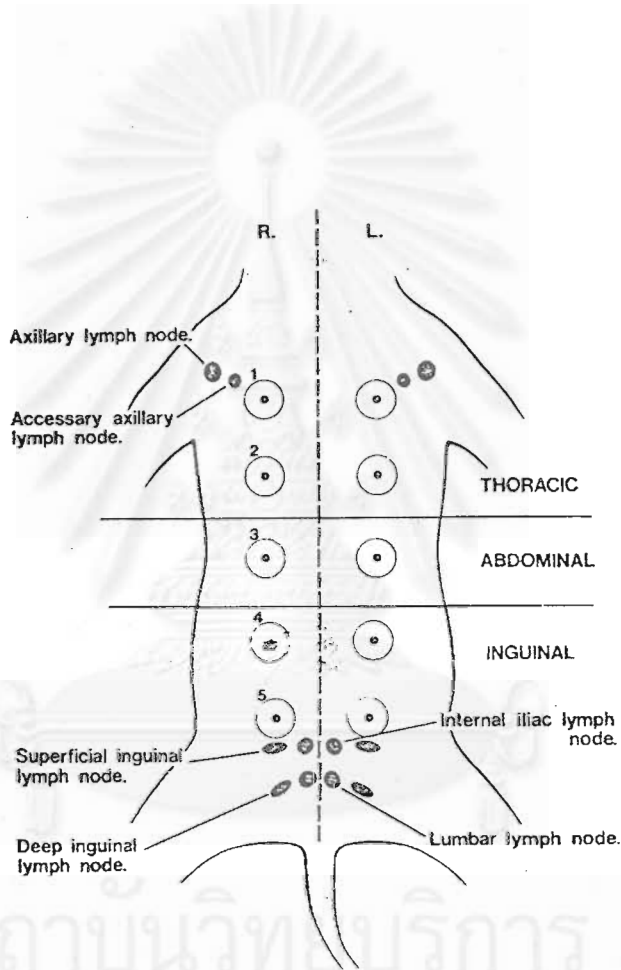
#### 1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้ออกเต้านมสุ่ม และ/หรือต่อมน้ำเหลืองในบริเวณข้างเคียง จากสุนัขที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้วินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งของเต้านม โดยเก็บตัวอย่างทั้งแบบย้อนหลัง (retrospective) จำนวน 63 รายและแบบไปข้างหน้า (prospective) จำนวน 33 ราย รวมจำนวนทั้งสิ้น 96 ราย ตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 ถึง 2544 และรวบรวมข้อมูลทางพยาธิวิทยาอื่น ๆ ประกอบด้วย เช่น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองในบริเวณข้างเคียง ลักษณะและขนาดมะเร็งเมื่อตรวจดูด้วยตาเปล่า เป็นต้น

1.2 เก็บรวบรวมข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย อาทิ พันธุ์ เพศ อายุ ขนาดก้อนมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง (รูปที่ 3) ระยะเวลาการเกิดโรค การตรวจวินิจฉัยทางคลินิก และข้อมูลการรักษาเบื้องต้น (ภาคผนวก : แบบฟอร์มที่ 1) ซึ่งบ่งถึงลักษณะทางคลินิกที่สามารถนำมาประกอบการวิเคราะห์ปัจจัยในการพยากรณ์โรค

1.3 ตัวอย่างที่ได้เลือกจากบริเวณที่ไม่มีเนื้อตาย การตกเลือด และเนื้อเยื่อไขมัน แล้วเก็บรักษาในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วดำเนินการตามขั้นตอนเทคนิคฮิสโตวิทยา ซึ่งเริ่มจากดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้แอลกอฮอล์ 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผ่านไชลินและเซในพาราฟินซึ่งเนื้อเยื่อฝังในบล็อก หลังจากนั้นตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4-5 ไมครอน และย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E) โดยผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffinization) โดยใช้ไชลิน เติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydration) โดยแช่ในแอลกอฮอล์จาก absolute 95 85 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และย้อมสี H&E เพื่อศึกษา

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา นอกจากนี้ตัวอย่างบางราย ใช้การย้อมสีพิเศษเข้ามาช่วยในการวินิจฉัยแยกแยะชนิด หรือใช้การย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อวินิจฉัยแยกชนิดตามแหล่งกำเนิด โดยตัวอย่างที่ใช้ได้เลือกจากตำแหน่งที่มีความรุนแรงมากที่สุดในแต่ละราย



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งต่อมน้ำเหลืองในบริเวณข้างเคียงด้านบนแต่ละคู่ของสุนัข (Owen, 1979)

ต่อมน้ำเหลือง accessory axillary node รับน้ำเหลืองจากด้านบนคู่ที่ 1-3

ต่อมน้ำเหลือง superficial inguinal node รับน้ำเหลืองจากด้านบนคู่ที่ 4-5

## 2. การตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อจำแนกประเภท

2.1. ตรวจลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อจำแนกประเภท histological type ตาม World Health Organization classification of tumor in domestic animal (WHO) (Hampe and Misdorp, 1974) ได้แก่

2.1.1 Simple tubular adenocarcinoma เซลล์มะเร็งจัดตัวเป็นท่อ เซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์เยื่อบุท่อ พบ pleomorphism และดัชนีการแบ่งตัว (mitotic activity) จากระดับต่ำจนสูง เนื้อเยื่อค้ำจุน (stroma) มีปริมาณน้อยจนถึงปานกลาง

2.1.2 Complex tubular adenocarcinoma การจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งเป็นลักษณะท่อเป็นหลัก แต่เซลล์มะเร็งประกอบด้วยเซลล์สองประเภท ได้แก่เซลล์ที่มีลักษณะ cuboidal หรือ columnar เหมือนเซลล์บุท่อและเซลล์ myoepithelial มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย

2.1.3 Simple papillary adenocarcinoma การจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งเป็นแบบ sessile หรือ pedunculated papillary มีเนื้อเยื่อค้ำจุนน้อย

2.1.4 Complex papillary adenocarcinoma การจัดเรียงตัวเช่นเดียวกับ 2.1.3 แต่ประกอบด้วยเซลล์เหมือนเซลล์บุท่อ และเซลล์ myoepithelial ส่วน papillae ไปด้วยเซลล์รูปร่าง cuboidal หรือ columnar

2.1.5 Solid carcinoma การจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งเป็นลักษณะ solid sheet หรือ cord หรือกลุ่มก้อน ไม่มีการจัดเป็นท่อ หรือมีช่อง

2.1.6 Malignant mixed tumor ประกอบด้วยเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะคล้ายเซลล์เยื่อบุ เช่น เซลล์บุท่อ หรือ myoepithelial cell หรือทั้งสองอย่าง และเซลล์ที่คล้ายกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน



## 2.2 ระดับความรุนแรง (histologic malignancy grade) (Gilbertson et al., 1983)

แบ่งเป็น 3 ระดับได้แก่ grade 0 I และ II ทั้งนี้โดยสังเกตรูปร่าง ลักษณะไซโตพลาสซึม ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ เนื้อตาย การแทรกเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และอื่นๆ ซึ่งหากลักษณะเซลล์มีลักษณะจำเพาะน้อยเพียงใดก็ยิ่งมีความร้ายแรงขึ้นเท่านั้น

Grade 0 เซลล์มีรูปร่างคล้ายเซลล์ปกติ มีการเพิ่มจำนวนแบบ malignant proliferation แต่มีการจำกัดขอบเขตลักษณะของระบบท่อน้ำนม

Grade I เซลล์มีรูปร่างคล้ายเซลล์ปกติ มีการเพิ่มจำนวนแบบ malignant proliferation โดยขยายลงจากลักษณะทางกายวิภาคของท่อน้ำนมไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบ

Grade II เซลล์มะเร็งดังกล่าวเจริญแทรกเข้าไปยังหลอดเลือดและท่อน้ำเหลือง

## 2.3. การแบ่งตามลักษณะของนิวเคลียส (nuclear differentiation grading)

การแบ่งตามลักษณะดังกล่าวจะช่วยบ่งบอกถึงความร้ายแรงจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ตามวิธีของ Gilbertson และคณะ (1983) ทั้งนี้สามารถแบ่งลักษณะการพัฒนาของนิวเคลียสแบ่งได้เป็นเกรด (nuclear grade) ได้เป็นระดับต่างๆ ทั้งนี้ในกรณีที่มีตัวอย่างเนื้อเยื่อใดที่พบว่ามีหลายระดับจะใช้ระดับที่ต่ำสุดเป็นตัวแทน

Poorly differentiated grade (nuclear grade 1) : มีลักษณะ undifferentiated, anaplastic or poorly differentiated

Moderated differentiated grade (nuclear grade 2) : มีลักษณะ moderately differentiated

Well differentiated grade (nuclear grade 3) : มีลักษณะ well differentiated

### 3. เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

#### 3.1. การเคลือบสไลด์สำหรับการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (slide preparation)

เนื่องจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีมักประสบปัญหาขึ้นเนื้อเยื่อ มักจะหลุดลอกออกจากแผ่นสไลด์ ดังนั้นควรเคลือบสไลด์ด้วยสารที่ทำให้มีการเกาะยึดดีขึ้นซึ่งใช้

3-aminopropyltriethoxysilane (Silane<sup>®</sup>, Sigma, USA) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. แช่สไลด์เปล่าลงในภาชนะที่น้ำประปาไหลผ่านนาน 30 นาที
2. แช่ลงในน้ำกลั่นนาน 5 นาที 2 ครั้ง
3. แช่ในแอลกอฮอล์ (95% ethanol) นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง
4. ผึ่งในอากาศให้แห้ง ประมาณ 10 นาที
5. เติมน้ำสไลด์ลงในตัวแขวนจุ่มลงในภาชนะที่บรรจุ 3-aminopropyltriethoxysilane (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ใน acetone นาน 30-60 วินาที)
6. ล้างด้วย acetone ประมาณ 2 ครั้ง
7. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วอบให้แห้งในตู้อบ 40-60 °ซ.

#### 3.2. ระบบ Avidin Biotin Complex (ABC)

วิธีการย้อม ABC ที่ใช้เป็นการจับกันของสารไกลโคโปรตีนเอวิดิน (avidin) กับไบโอติน (biotin) สารเอวิดินเป็นโปรตีนจากไข่ขาว ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 4 ยูนิตย่อยเป็น hydrophobic socket ที่สามารถจับกับไบโอตินได้ 4 โมเลกุล และจับกับแอนติบอดี และเอนไซม์ที่เป็น marker แอนติบอดี 1 โมเลกุลสามารถจับกับไบโอติน ได้ถึง 150 โมเลกุลโดยใช้ spacer arms ซึ่งทำให้เอวิดินมีที่ว่างพอที่จะจับกับไบโอตินได้อย่างแข็งแรง เป็นผลให้เพิ่มความไวเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ และสามารถเจือจางแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ได้มากขึ้น (Miller, 1996)

### 3.3. วิธีการตรวจติดตามแอนติเจน (Antigen retrieval method)

ในขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาทางจุลพยาธิวิทยานั้น แอนติเจนอาจถูกทำลายหรือหายไป ดังนั้นขั้นตอนนี้จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี วิธีการมีหลายวิธีไม่ว่าจะใช้เอนไซม์ย่อย หรือการใช้ความร้อน ในการศึกษานี้ เลือกใช้การใช้ความร้อนเนื่องจากการตรวจติดตามแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพสูง ต้องใช้ความร้อนอย่างฉับพลันและในรูปแบบเดียวกันทั้งหมด ซึ่งได้เลือกใช้สองวิธีด้วยกัน ได้แก่

- การใช้ความร้อนจากตู้อบไมโครเวฟ (microwave retrieval technique) วิธีนี้ทำให้เกิดความร้อนกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แช่สไลด์ที่มีชิ้นเนื้อ จากการปล่อยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า
- การใช้ความร้อนจากเครื่องอบไอน้ำความดันสูง (autoclave retrieval technique) วิธีนี้เหมาะกับแอนติเจนที่ต้องใช้ความร้อนสูงในการตรวจติดตาม หรือตัวอย่างนั้นไม่ควรมีการเดือด เช่น โปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup>
- วิธีการติดตามแอนติเจนของ PCNA และ c-erbB-2 นั้นสามารถกระทำได้ง่าย โดยการติดตาม PCNA นั้นใช้น้ำกลั่นในขั้นตอนการให้ความร้อนจากวิธี microwave technique (Hitachi<sup>®</sup>, ขนาด 900 วัตต์) ที่ระดับความร้อนระดับปานกลาง นาน 5 นาที จำนวน 2 รอบ ซึ่งจะให้ความร้อนประมาณ 95°C. และเกิดการเดือด สำหรับการติดตามโปรตีน c-erbB-2 ใช้สภาวะเดียวกันแต่เปลี่ยนใช้บัฟเฟอร์ 0.01M citrate buffer แทน

วิธีการติดตามแอนติเจนของโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.01M sodium citrate buffer ใช้ระดับความร้อนสูงที่เหมาะสมโดยหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการเดือด มีความเหมาะสมที่นำไปใช้เนื่องจากจะทำให้ทำลายแอนติเจนและทำให้ตรวจไม่พบได้ ในการศึกษานี้ได้มีการทดลองการติดตามแอนติเจนด้วยวิธี microwave technique วิธีการใช้เอนไซม์ย่อย และวิธี autoclave

technique ในลักษณะและเวลาต่าง ๆ พบว่า วิธีการใช้เอนไซม์ย่อย โดยการใส่เอนไซม์ trypsin ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ย่อยนาน 5-10 นาที ไม่ประสบผลสำเร็จ สำหรับวิธี microwave technique สามารถติดตามแอนติเจนได้แต่ยังให้ผลที่ไม่คงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี autoclave technique ซึ่งให้ผลที่คงที่กว่ามากแม้ว่าจะต้องใช้เวลาในขั้นตอนนี้นานกว่า สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองนี้อยู่ที่อุณหภูมิคงที่  $121^{\circ}\text{C}$ . ความดัน 15 บาร์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30-60 วินาที

### 3.4. การระงับ endogenous enzymes

เอนไซม์เหล่านี้อาจมีปฏิกิริยากับสารซับซ้อนที่ใช้ในการย้อมและทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) เอนไซม์ peroxidase และ substances ทำให้เกิดปฏิกิริยา pseudoperoxidase reaction ในเนื้อเยื่อ เอนไซม์เหล่านี้พบได้ในเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว การบ่มเนื้อเยื่อตัวอย่าง ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล สามารถระงับปฏิกิริยานี้ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการจับแอนติเจนของแอนติบอดี

#### 3.4.1. การระงับการย้อมติดสีของพื้นหลัง (blocking background staining)

ขั้นตอนนี้ลดการย้อมติดสีของพื้นหลังที่เป็นผลมาจากการจับที่ไม่จำเพาะของแอนติเจนที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของ immune sera โดยแรง hydrophobic และ electrostatic ในบางตำแหน่งของชิ้นเนื้อ ซึ่งมีลักษณะมีสีพื้นหลังแบบไม่สม่ำเสมอ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในการศึกษานี้ได้ใช้ bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลด non-specific binding ที่ส่วน  $F_c$  และช่วยลดปัญหาในกรณีที่เนื้อเยื่อมีการอักเสบ หรือบริเวณที่มีเนื้อตาย

#### 3.4.2. ตัวควบคุม

ในการย้อมภูมิคุ้มกันไนฮิสโตเคมีต้องมีตัวควบคุม (control) สำหรับการทดลองโดยแบ่งเป็นตัวควบคุมลบ (negative control) และตัวควบคุมบวก (positive control)

ตัวควบคุมลบประกอบด้วย

- ตัวควบคุมลบ สำหรับเทคนิคการย้อม ทำโดยการหยุดบัพเฟอร์แทนที่แอนติบอดีปฐมภูมิ หรือ
  - ตัวควบคุมลบที่เนื้อเยื่อนั้นไม่มีแอนติเจนที่ศึกษา แต่ดำเนินการย้อมเช่นเดียวกับตัวอย่าง สำหรับยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ใช้เนื้อเยื่อเต้านมปกติของสุนัข
- ตัวควบคุมบวกต้องมีแอนติเจนที่ต้องการศึกษาและให้ผลบวกอย่างชัดเจน ได้แก่
- ตัวควบคุมบวกสำหรับโปรตีน c-erbB-2 ได้แก่ human invasive ductal carcinoma (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ)
  - ตัวควบคุมบวกสำหรับโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ได้ใช้เนื้อเยื่ออวัยวะของหนูแรท (rat) และแมว

#### 4. การตรวจสอบ proliferative marker เพื่อตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์มะเร็ง

โดยใช้ PCNA ซึ่งอาศัยหลักการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้ monoclonal mouse anti-PCNA antibody (DAKO, Denmark) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ

##### 4.1. วิธีการตรวจ PCNA

- ทำการละลายพาราฟินและผ่านขบวนการเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับข้างต้น
- Pretreatment สไลด์ในน้ำกลั่นโดยใช้เทคนิค microwave method โดยทำให้ร้อนโดยเริ่ม prewarming ที่ระดับปานกลาง นาน 5 นาที จำนวน 2 รอบ โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ Hitachi® ที่มีกำลัง 900 วัตต์
- ระวังผลของปฏิกิริยาจาก non-specific endogenous peroxidase binding โดยแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในเมทานอลบริสุทธิ์ (absolute methanol) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-5 นาที 1 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) นาน 3-5 นาที 2 ครั้ง
- ระวังผลของปฏิกิริยาจากการติดสีที่ไม่จำเพาะอื่นๆ โดยการใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) (Fluka, Switzerland) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน PBS ป่มที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที
- หยด monoclonal mouse anti-PCNA antibody ความเข้มข้น 1 ต่อ 200 ส่วน (DAKO, Denmark) ป่มที่อุณหภูมิ 4°C. นานข้ามคืน (ประมาณ 14-15 ชั่วโมง) ล้างด้วย PBS นาน 3-5 นาที 3 ครั้ง
- แล้วยหยด biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (DAKO, Denmark) ในขนาดความเข้มข้น 1 ส่วนต่อ 400 ส่วน ป่มอบไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที ล้างด้วย PBS นาน 3-5 นาที 3 ครั้ง
- หยดสารละลาย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit<sup>®</sup>, DAKO, Denmark) ป่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที
- ล้างด้วย PBS นาน 3-5 นาที 3 ครั้ง
- ทำให้เกิดสี โดยจุ่มใน สารละลาย 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, USA) in 0.05 M Tris HCl pH7.6 and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- ล้างด้วย PBS นาน 3-5 นาที 3 ครั้ง
- ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin ตรวจสอบผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง โดยใช้กำลังขยาย 40x โดยเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวก นับเซลล์มะเร็งจำนวน 1,500 เซลล์ ใน 3 บริเวณรวมกัน คำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์

5. การตรวจการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ ซัพเพรสเซอร์ยีน p21 ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) จากเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน

5.1. การเคลือบสไลด์สำหรับการอิมมูโนฮิสโตเคมี เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.1

5.2. ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟินเพื่อทำสไลด์ตามความหนา 4-5 ไมครอน เพื่อทำการย้อมตรวจการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

5.3. การย้อมโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี ABC ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

5.3.1. การย้อมเพื่อตรวจสอบโปรตีน c-erbB-2

- ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ในไซลีน และจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 95 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

- ทำการ pretreatment ในสารละลาย citrate buffer pH 6.0 โดยใช้เทคนิค microwave method ที่ระดับปานกลาง (Hitachi<sup>®</sup>, 900 w) นาน 5 นาที จำนวน 2 รอบ แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- ล้างด้วย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการขจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ในเมธานอล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 3-5 นาที 1 ครั้ง และสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที 2 ครั้ง

- ทำการระงับ nonspecific background ด้วยการใส่ bovine serum albumin ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- หยดแอนติบอดีปฐุมภูมิ rabbit polyclonal anti-human c-erbB2 oncoprotein (DAKO, Denmark) ความเข้มข้น 1: 200 ลงบนสไลด์ (Rungsipat *et al.*, 1999) ป่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C. แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ Biotinylated goat anti-rabbit Ig ในอัตราส่วน 1:400 ทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- เตรียม avidin-biotin complex peroxidase solution (ABC DAKO®, Denmark) ก่อนใช้ประมาณ 30 นาที (ในสัดส่วนสารละลาย A 45 ไมโครลิตรและสารละลาย B 45 ไมโครลิตร ผสมในสารละลาย PBS 5 มล. หยดลงบนสไลด์ ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาทีแล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- ทำปฏิกิริยาให้เกิดสี โดยจุ่มใน สารละลาย 0.05% 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, USA) in 0.05 M Tris HCl pH7.6 and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> นาน 5 นาทีแล้วล้างด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- ย้อมสีทับ (counterstain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin นาน 20-25 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

- ตี้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

- ปิดทับด้วย cover glass ด้วยน้ำยา mounting media

- สำหรับตัวควบคุมบวก ใช้เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมชนิด invasive ductal carcinoma ในคน

- สำหรับตัวควบคุมลบ ใช้เนื้อเยื่อเต้านมปกติของสุนัข และตัวควบคุมลบสำหรับเทคนิค โดยละเว้นการหยดแอนติบอดีปฐุมภูมิ



### 5.3.2. การย้อมเพื่อตรวจสอบโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

- ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ใน xylene และจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 95 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
- ทำการ pretreatment ในสารละลาย sodium citrate buffer pH 6.0 โดยใช้เทคนิค autoclave method ที่อุณหภูมิ 121°C. ระดับความดัน 15 บาร์ นาน 30 นาที โดยจับเวลาหลังอุณหภูมิคงที่ แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย PBS 3-5 นาที จำนวน 3 ครั้ง
- ทำการระงับเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเมธานอล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 3-5 นาที 1 ครั้งและสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที 2 ครั้ง
- ทำการลด nonspecific background ด้วยการใส่ bovine serum albumin ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS นาน 3-5 นาที 3 ครั้ง
- หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit polyclonal anti-p21 antibody C-19 (Santa Cruz Biotech., USA) ความเข้มข้น 1:100 (Inoue and Wada, 2000) ลงบนสไลด์ บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4°C. แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3-5 นาที 3 ครั้ง
- หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated goat anti-rabbit Ig ในอัตราส่วน 1:200 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3-5 นาที 3 ครั้ง
- นำ avidin-biotin complex peroxidase solution ที่เตรียมเช่นเดียวกับการย้อม c-erbB-2 หยดลงบนสไลด์ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS 3-5 นาที 3 ครั้ง

- ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วยสารละลาย DAB (0.05%

diaminobenzidinetetrachloride ละลายใน 0.05 M Tris HCl pH 7.6 และเติม 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS 3-5 นาที 3 ครั้ง

- ย้อมสีทับ (counterstain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin นาน 20-25 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

- ตังน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วแช่ในไซลีน

- ปิดทับด้วย cover glass ด้วยน้ำยา mounting media

- สำหรับตัวควบคุมบวก ใช้ เนื้อเยื่ออวัยวะของหนูแรทและแมว

- สำหรับตัวควบคุมลบ ใช้การข้ามขั้นตอนการหยดแอนติบอดีปฐมภูมิ

## 6. การวัดและวิเคราะห์ผล

แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา การแสดงออกของยีน c-erbB-2 และการแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> โดยประเมินการย้อมติดสีตัวรับจำเพาะตามการประเมินแบบ semiquantitative (Jing et al., 1999) โดยการนับจำนวนเซลล์มะเร็งที่ให้ผลบวกในชิ้นเนื้อมะเร็งด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

- เกรด - : เซลล์มะเร็งให้ผลบวกลดกว่า 10 เปอร์เซ็นต์
- เกรด + : เซลล์มะเร็งให้ผลบวกลดกว่า 30 เปอร์เซ็นต์
- เกรด ++ : เซลล์มะเร็งให้ผลบวกประมาณ 30 -70 เปอร์เซ็นต์
- เกรด +++ : เซลล์มะเร็งให้ผลบวกมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

หรือประเมินการแสดงออกเป็น

- negative : เมื่อไม่พบการติดสี DAB ในเซลล์มะเร็งเลย
- positive : เมื่อตรวจพบการติดสี DAB ในเซลล์มะเร็ง

6.1. การประเมินผลจากเซลล์ที่ย้อม PCNA โดยนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากเซลล์มะเร็ง 1,500 เซลล์ สุ่มจาก 5 บริเวณ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

6.2. ประเมินความสัมพันธ์ร่วมระหว่างการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* หรือ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา proliferative marker และปัจจัยอื่น ๆ ทางคลินิกโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธีดังนี้

6.2.1. วิธี chi-square หรือ Fisher exact test ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการแสดงออกของยีนที่ตรวจพบ

6.2.2. วิธี Cochran-Mantel-Haenszel สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการแสดงออกของยีนที่ตรวจพบในแง่แนวโน้ม (in trend)

6.2.3. วิธี Spearman correlation coefficient test สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่เป็นข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) กับการแสดงออกของยีนที่ตรวจพบ

6.2.4. วิธี logistic regression analysis ใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบเซลล์ที่ย้อมติด PCNA กับการแสดงออกของยีนที่ตรวจพบ

## บทที่ 4

### การวิเคราะห์และรายงานผล

#### 1. การแสดงออกของผลผลิตของโคยีน c-erbB-2 และซีฟเพรสเซอร์ยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

ลักษณะการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่าผลผลิตของยีน c-erbB-2 ที่ให้ผลบวกติดสีเหลืองน้ำตาลจนถึงน้ำตาล (รูปที่ 4) ปรากฏอยู่ที่เซลล์ ซึ่งนิวเคลียสติดสีฟ้าน้ำเงิน จากการย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin สำหรับผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> พบสีน้ำตาลปรากฏอยู่ในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึม (รูปที่ 5)

##### 1.1 Oncogene product c-erbB-2

โดยทั่วไปแล้วการเกิด overexpression ซึ่งต่างจาก expression ของยีน c-erbB-2 ทำให้ตรวจพบโปรตีน c-erbB-2 ได้โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

สำหรับการศึกษานี้พบว่าโปรตีน c-erbB-2 สะสมในเซลล์มะเร็งเต้านมสุนัขเป็นส่วนใหญ่ 74 % (71/96)(ตารางที่ 1) โดยพบการติดสีเฉพาะในส่วนเซลล์เยื่อ (epithelial region) เช่นเดียวกับในมะเร็งเต้านมสตรี นอกจากนี้พบได้ทั้งบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์และในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 4) โดยพบที่เซลล์มะเร็งส่วนที่เป็นเยื่อต่อมสร้างน้ำนมและส่วนท่อ (duct) รวมถึงแสดงเด่นชัดในส่วนเยื่อที่เกิดขึ้น squamous metaplasia เมื่อเปรียบเทียบกับสไลด์ชิ้นเนื้อควบคุมบวกแล้วพบว่าติดสีจางกว่า

## 1.2 Tumor suppressor gene product p21

สำหรับการศึกษาในมะเร็งเต้านมสุนัขพบการแสดงออกส่วนใหญ่เป็นแทรนสคริปต์ขนาดเล็กกระจายในไซโทพลาสซึมของเซลล์มะเร็งเยื่อบุ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับในเนื้อเยื่ออื่นที่ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก มีการกระจายตำแหน่งในเนื้อเยื่อไม่แน่นอน มักจะพบในเซลล์บุท่อที่ well differentiated ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางที่ 1) ไม่พบการแสดงออกทั้งในนิวเคลียส และไซโทพลาสซึมภายในเซลล์เดียวกัน สำหรับการศึกษานี้พบว่ามิโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> สะสมในเซลล์มะเร็งเต้านมสุนัข 53.13 % (51/96) (ตารางที่ 1) เมื่อจำแนกตาม Jing และคณะ (1999) พบการแสดงออกดังใน ตารางที่ 2

ผลการศึกษานี้พบว่าพบผลผลิตจากการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* ส่วนใหญ่ในมะเร็งเต้านมสุนัข และเมื่อจำแนกระดับตาม Jing et al., 1999 พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 0 และเพิ่มระดับจาก + ไปจนถึง +++ สำหรับผลบวกการพบผลผลิตจากการแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> อยู่ในสัดส่วนใกล้เคียงกับการสูญเสียการแสดงออก (loss of expression) และเมื่อจำแนกตาม Jing และคณะ (1999) พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 0 ซึ่งบ่งชี้การสูญเสียการแสดงออก และเปอร์เซ็นต์ลดลงเมื่อระดับสูงขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

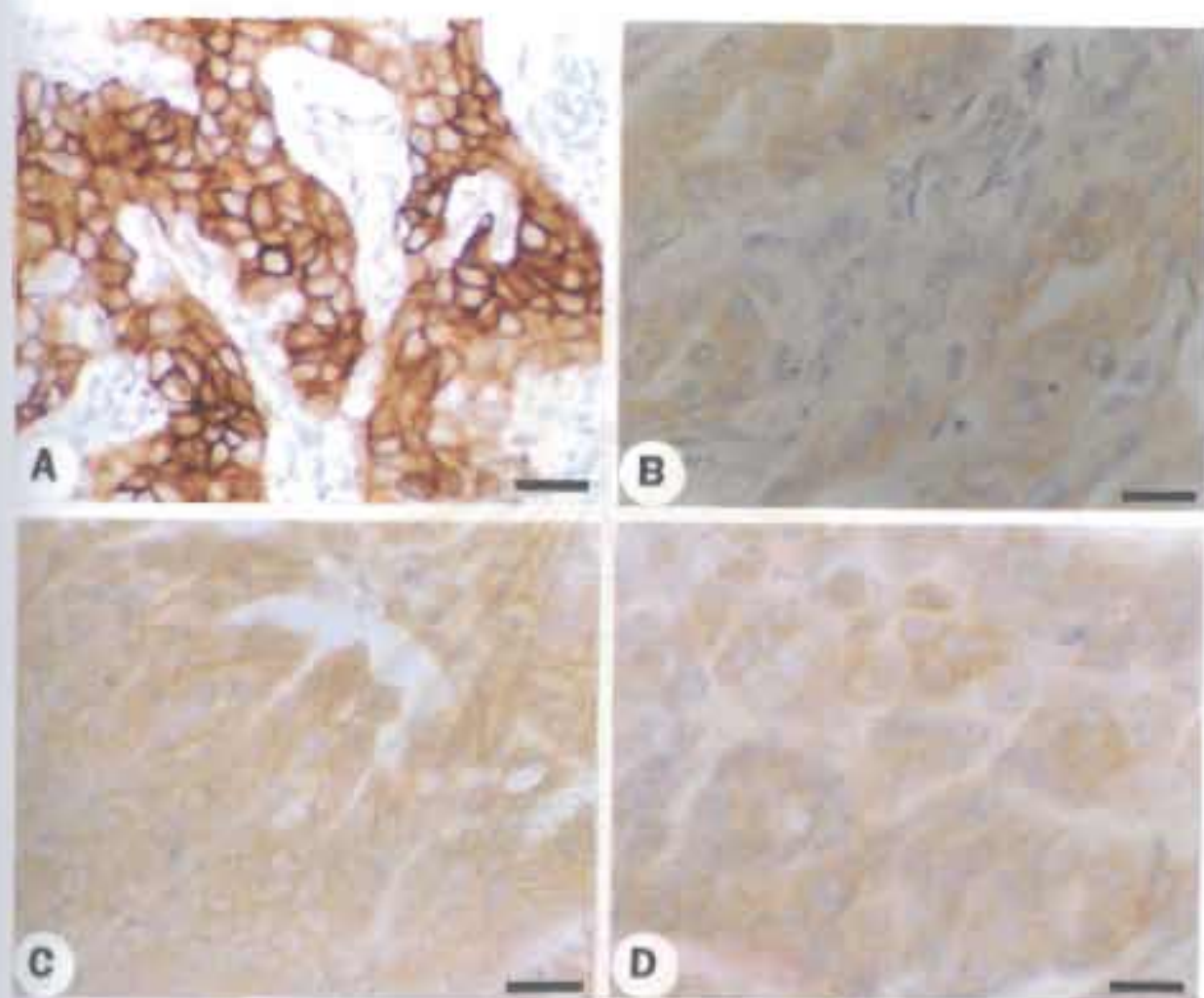
ตารางที่ 1 การตรวจพบผลผลิตจากการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

การตรวจพบผลผลิตของยีน	c-erbB-2	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>
ผลลบ	25 (26%)	45 (46.875%)
ผลบวก	71 (74%)	51 (53.125%)
รวม (เปอร์เซ็นต์)	96 (100%)	96 (100%)

ตารางที่ 2 แสดงระดับผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกระดับตาม Jing และคณะ (1999)

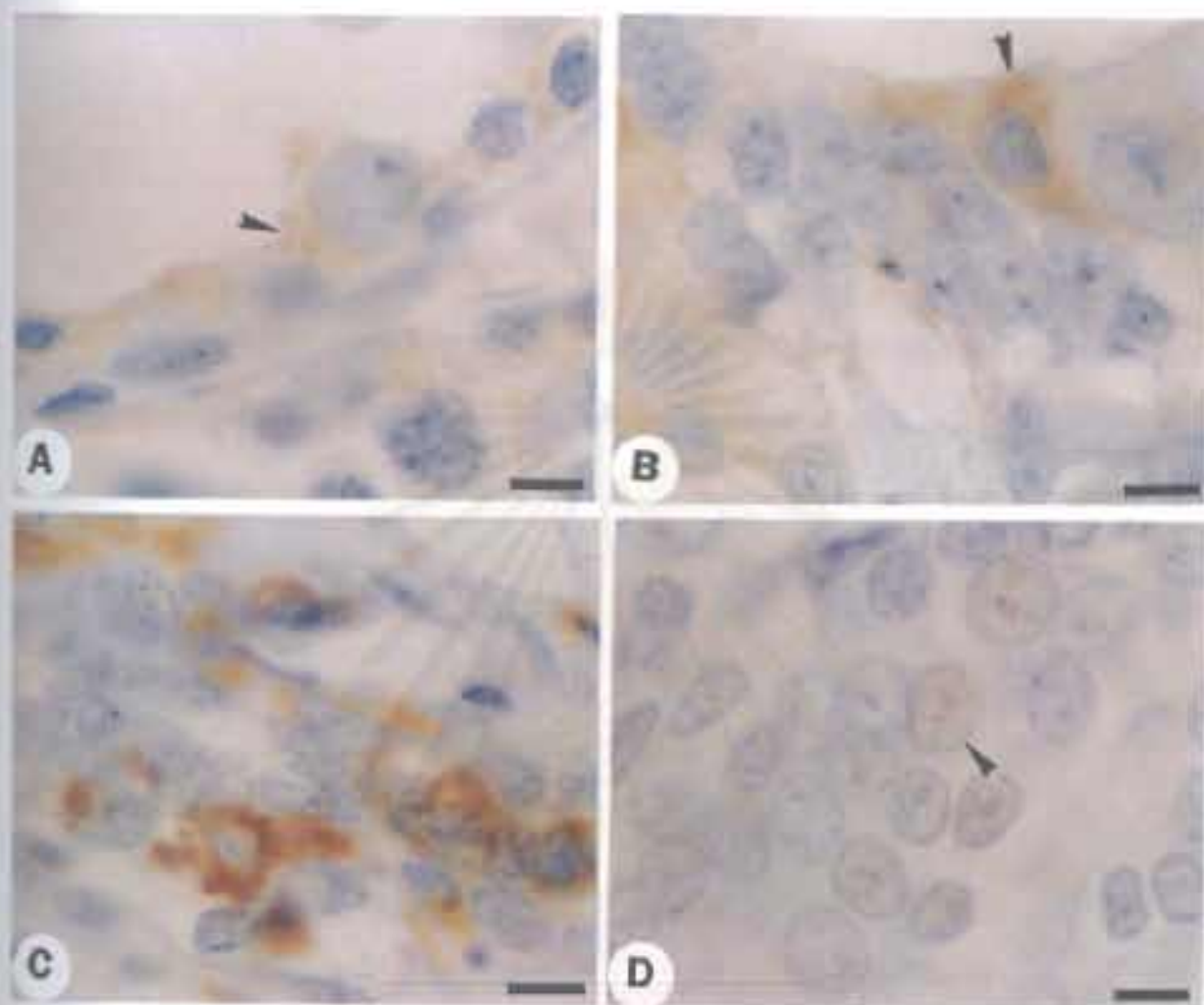
ระดับผลผลิตของยีน	c-erbB-2	p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>
0	45 (46.9%)	74 (77.08%)
+	9 (9.4%)	10 (10.42%)
++	13 (13.5%)	6 (6.25%)
+++	29 (30.2%)	6 (6.25%)
รวม (เปอร์เซ็นต์)	96 (100%)	96 (100%)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ผลการย้อมของยีน c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ABC; DAB) และย้อมกับ  
ด้วย Mayer's hematoxylin (bar = 25  $\mu$ m)

- A) ผลบวกของยีน c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็งเยื่อใยในท่อน ชนิด invasive ductal carcinoma (ตัวอย่างควบคุม)  
โดยพบการคิดสีน้ำตาลที่เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาสซึม (bar = 50  $\mu$ m)
- B) ผลบวกของยีน c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็งเยื่อใยที่ท่อในท่อนชนิด tubular adenocarcinoma (D6934M)
- C) ผลบวกของยีน c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็งเยื่อใยที่ท่อในท่อนชนิด papillary adenocarcinoma (D6703N)
- D) ผลบวกของยีน c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็งเยื่อใยที่ท่อในท่อนชนิด solid carcinoma (R1913N)



รูปที่ 5 แสดงการย้อม p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ โดยใช้วิธีย้อมในฮิสโตเคมี (ABC, DAB) และย้อม

สีด้วย Mayer's hematoxylin (bar = 10 μm)

- A) แสดงการย้อม p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเนื้อเยื่อปกติของเต้านม (ที่ควบคุมขนาด) โดยพบการย้อมสีน้ำตาลในไซโตพลาสม (pHugnet)
- B) แสดงการย้อม p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดท่อในชนิด tubular adenocarcinoma (ที่ควบคุม, D00745)
- C) แสดงการย้อม p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดท่อในชนิด papillary adenocarcinoma (D0703M)
- D) แสดงการย้อม p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิดท่อในชนิด tubular adenocarcinoma โดยพบการย้อมสีน้ำตาลที่ขอบของนิวเคลียส (ที่ควบคุม, D0812A)



## 2. ความสัมพันธ์ของการตรวจพบผลผลิตจากแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

ต่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งเต้านม

(Relationship between oncogene product c-erbB-2 and suppressor gene p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

product and histopathological grading)

### 2.1 การศึกษาการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตาม

WHO (Hampe and Misdorp, 1974) (Relationship of c-erbB-2 expression and WHO

histopathological grading)

จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา สามารถจำแนกตัวอย่างตามการแบ่งของ WHO จาก มะเร็งของเยื่อบุได้ 6 ประเภท (รูปที่ 7) โดยไม่พบประเภท malignant mixed mammary tumor นั้นในกลุ่มศึกษา ได้แก่ ประเภท simple tubular adenocarcinoma 58.33 เปอร์เซ็นต์ (56/96) ประเภท solid carcinoma 22.92 เปอร์เซ็นต์ (22/96) ประเภท complex tubular adenocarcinoma 10.42 เปอร์เซ็นต์ (10/96) ประเภท simple papillary adenocarcinoma 6.25 เปอร์เซ็นต์ (6/96) ตามลำดับ ส่วนประเภท cystic papillary adenocarcinoma พบเพียง 1.04 เปอร์เซ็นต์ (1/96) และประเภทอื่นๆ เป็นชนิด secretory cell carcinoma 1.04 เปอร์เซ็นต์ (1/96) (รูปที่ 6) นอกจากนี้ภายในตัวอย่างเดียวกันสามารถพบมะเร็งประเภทอื่น ปะปนในลักษณะเป็น หย่อม ซึ่งนับว่าเป็นประชากรเซลล์มะเร็งส่วนน้อย รวมทั้งพบ benign lesion ปะปนได้

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ได้จำแนกเป็น 2 ประเภททั้งการพบการแสดงออกเป็นค่าบวกลบ และการจำแนกระดับตามวิธีการของ Jing และคณะ (1999)

ตารางที่ 3 แสดงประเภทของมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆและจำนวนรายที่ตรวจพบ (ผลบวก) และไม่พบ (ผลลบ) ผลผลิตของยีน c-erbB-2.

ประเภท	ผลผลิตของยีน c-erbB-2 (%)		รวม
	ผลลบ (%)	ผลบวก (%)	
Simple tubular ACC	15 (26.8%)	41 (73.2%)	56 (100%)
Complex tubular ACC	3 (30%)	7 (70%)	10 (100%)
Simple papillary ACC	1 (16.7%)	5 (83.3%)	6 (100%)
Cystic papillary ACC	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Solid CA	5 (22.7%)	17 (77.3%)	22 (100%)
Others	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>รวม (ราย)</b>	<b>25</b>	<b>71</b>	<b>96</b>

หมายเหตุ : ACC: adenocarcinoma, CA: carcinoma

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ประเภทมะเร็งเต้านมชนิดที่ตรวจพบและจำนวนการย้อมผลผลิตของยีน c-erbB-2 จำแนกระดับตาม Jing และคณะ (1999)

ประเภท	ผลการย้อมผลผลิตของยีน c-erbB-2 (%)				รวม
	0	+	++	+++	
Simple tubular ACC	26(46.4%)	4 (7.1%)	6 (10.7%)	20 (35.7%)	56 (100%)
Complex tubular ACC	5 (50.0%)	0 (0%)	3 (30.0%)	2 (20.0%)	10 (100%)
Simple papillary ACC	2 (33.3%)	0 (0%)	2 (33.3%)	2 (33.3%)	6 (100%)
Cystic papillary ACC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Solid CA	11 (50.0%)	5 (22.7%)	2 (9.1%)	4 (18.2%)	22 (100%)
Others	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
รวม	45	9	13	29	96

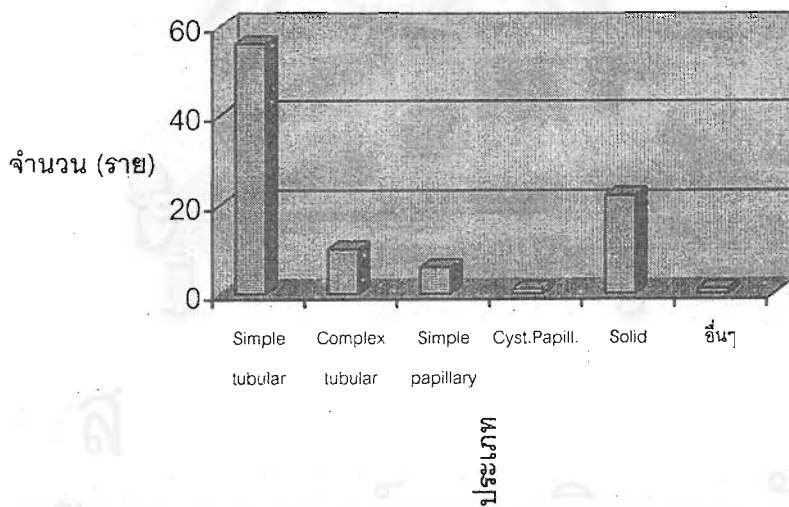
หมายเหตุ : ACC: adenocarcinoma, CA: carcinoma

จากตารางที่ 3 ตรวจพบการแสดงออกถึง 73.96 เปอร์เซ็นต์ (71/96) เมื่อจำแนกประเภททางจุลพยาธิวิทยาแล้ว พบว่าตรวจพบผลผลิตในชนิด simple tubular adenocarcinoma 73.2 เปอร์เซ็นต์ (41/56) ชนิด complex tubular adenocarcinoma 70.0 เปอร์เซ็นต์ (7/10) ชนิด solid carcinoma 77.3 เปอร์เซ็นต์ (17/22) ชนิด simple papillary adenocarcinoma 83.3 เปอร์เซ็นต์ (5/6) ชนิด cystic papillary adenocarcinoma 100 เปอร์เซ็นต์ (1/1) และอื่น ๆ คือ secretory cell carcinoma 0 เปอร์เซ็นต์ (0/1) เมื่อแบ่งระดับการแสดงออกของยีนตาม Jing และคณะ (1999) แล้วพบว่าในประเภท simple tubular adenocarcinoma (46.4%; 26/56), complex tubular adenocarcinoma (50.0%; 5/10), solid carcinoma (50.0%; 11/22) และ secretory cell carcinoma (100%; 1/1) นั้น ส่วนใหญ่อยู่ในเกรด 0 สำหรับ simple papillary

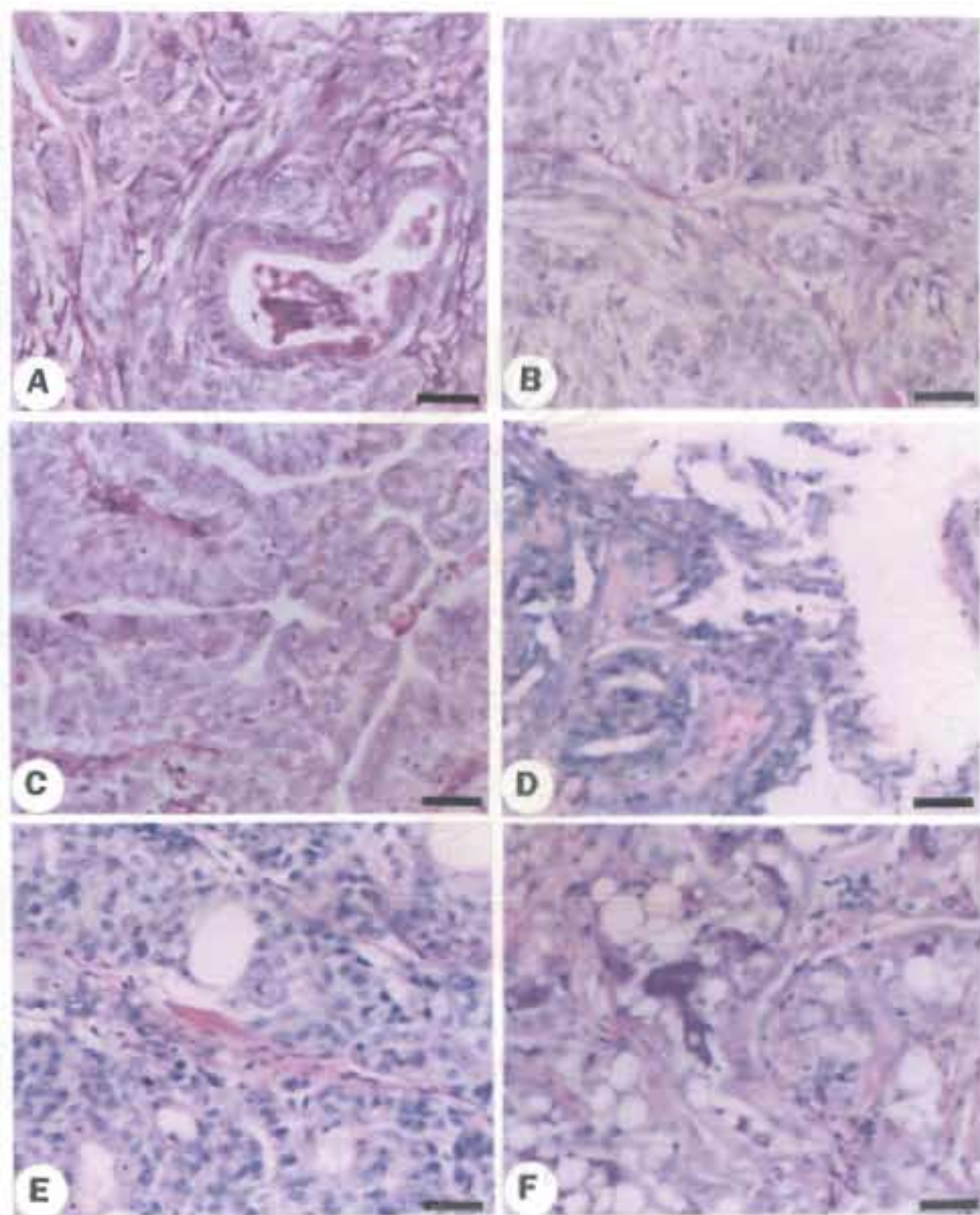
adenocarcinoma นั้นพบการแสดงออกในเกรด ++ (33.33%; 2/6) และ +++ (33.33%; 2/6) เท่ากับเกรด 0 (33.33%; 2/6) และพบว่าผลผลิตของยีนใน cystic papillary adenocarcinoma อยู่ในเกรด +++ (100%; 1/1)

ทำการวิเคราะห์ประเภทของมะเร็งทางจุลพยาธิวิทยากับการตรวจพบผลผลิตและระดับของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* ด้วย chi-square test หรือ Fisher's exact test ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

### ประเภทของมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ จำแนกตาม WHO (Hampe and Misdorp, 1974)



รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนประเภทมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ จำแนกตาม WHO (Hampe and Misdorp, 1974) ในกลุ่มศึกษา (n = 96)



รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตาม WHO (Hampe and Misdorp, 1974) ของมะเร็งตับอ่อนชนิดต่าง ๆ (H&E) (bar = 50 µm)

- |                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| A) Simple tubular adenocarcinoma   | B) Complex tubular adenocarcinoma  |
| C) Simple papillary adenocarcinoma | D) Cystic papillary adenocarcinoma |
| E) Solid carcinoma                 | F) Secretory cell carcinoma        |

## 2.2 การศึกษาผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และระดับความรุนแรง (Relationship between *c-erbB-2* product and malignancy grading)

จากการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบระดับความรุนแรงของมะเร็งทั้งสามระดับ (รูปที่ 7) โดยพบความรุนแรงในเกรด I มีการแทรกกลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง 60.64 เปอร์เซ็นต์ (57/94) เกรด 0 21.28 เปอร์เซ็นต์ (20/94) และเกรด II 18.09 เปอร์เซ็นต์ (17/94) ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาการตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* พบว่าพบผลผลิตได้มากในทุกเกรด โดยเฉพาะในเกรด I (88.2%; 15/17) สำหรับกลุ่มเซลล์มะเร็ง (tumor emboli) พบส่วนใหญ่ในหลอดน้ำเหลืองและมีการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* ได้เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็งปฐมภูมิ เมื่อจำแนกการตรวจพบผลผลิตของยีนในระดับต่างๆ ตาม Jing และคณะ (1999) พบว่ามีการกระจายในเกือบทุกระดับ โดยพบว่าความรุนแรงในเกรด 0 (45.0%; 9/20) และเกรด I (52.6%; 30/57) ตรวจพบผลผลิตในระดับ 0 เป็นส่วนใหญ่ สำหรับในเกรด II พบผลผลิตในระดับ +++ (41.2%; 7/17) (ตารางที่ 6) จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และระดับความรุนแรงไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบแยกตามระดับความรุนแรงของมะเร็ง

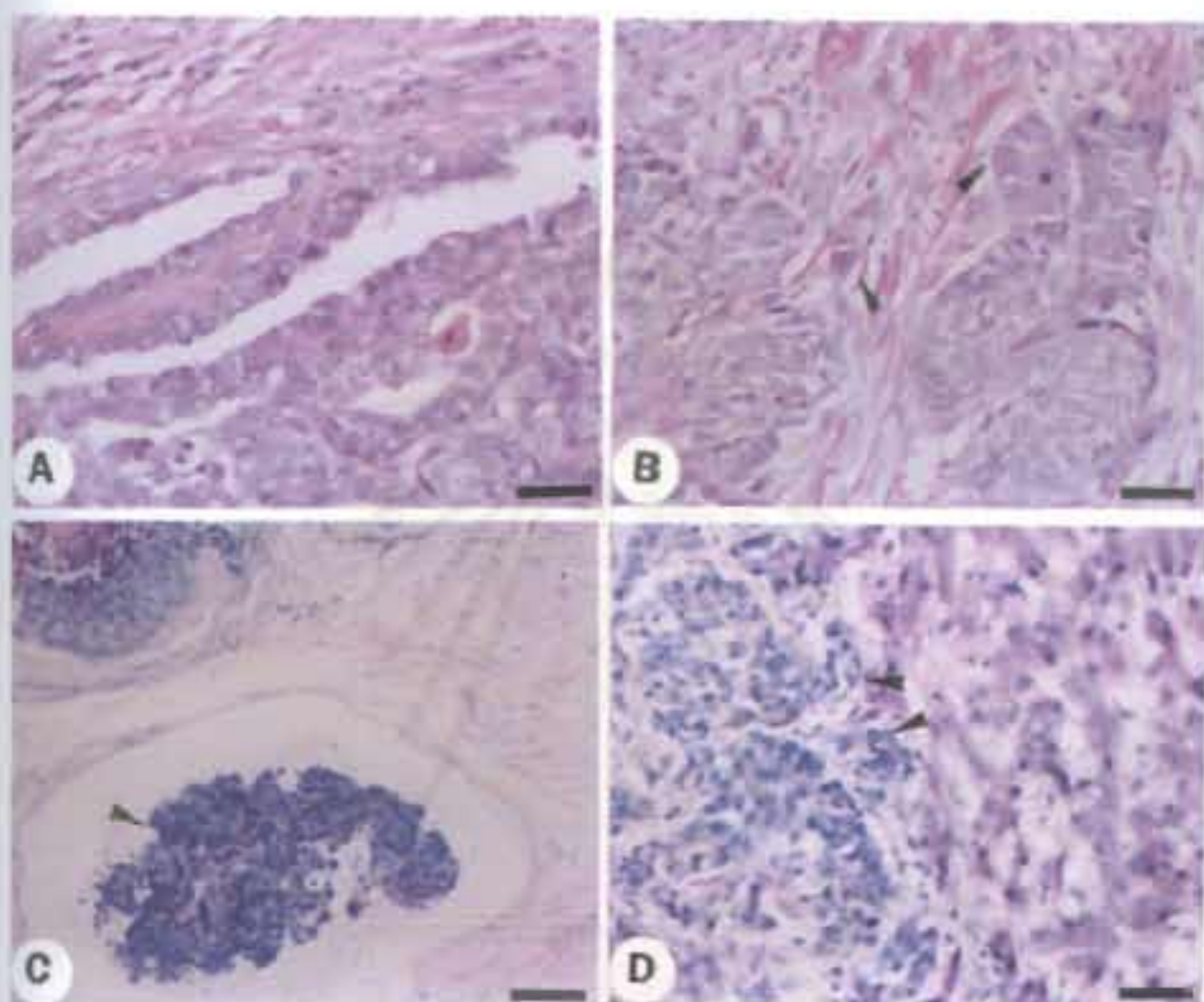
ระดับ	การย้อมผลผลิตของยีน c-erbB-2 (%)		รวม
	ผลลบ	ผลบวก	
Grade 0	4 (20.0%)	16 (80.0%)	20 (100%)
Grade I	19 (33.3%)	38 (66.7%)	57 (100%)
Grade II	2 (11.8%)	15 (88.2%)	17 (100%)
รวม	25	69	94

หมายเหตุ: Not applicable (NA) = 2 ตัวอย่าง (2.08%) จาก punch biopsy

ตารางที่ 6 ระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมสุนัขและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 จำแนกตาม Jing และคณะ (1999)

ระดับ	ระดับการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 (%)				รวม
	0	+	++	+++	
Grade 0	9 (45.0%)	0 (0%)	5 (25%)	6 (30.0%)	20 (100%)
Grade I	30 (52.6%)	7 (12.3%)	6 (10.5%)	14 (24.6%)	57 (100%)
Grade II	6 (35.3%)	2 (11.8%)	2 (11.8%)	7 (41.2%)	17 (100%)
รวม	45	9	13	27	94

หมายเหตุ: NA = 2 ตัวอย่าง (2.08%) จาก punch biopsy



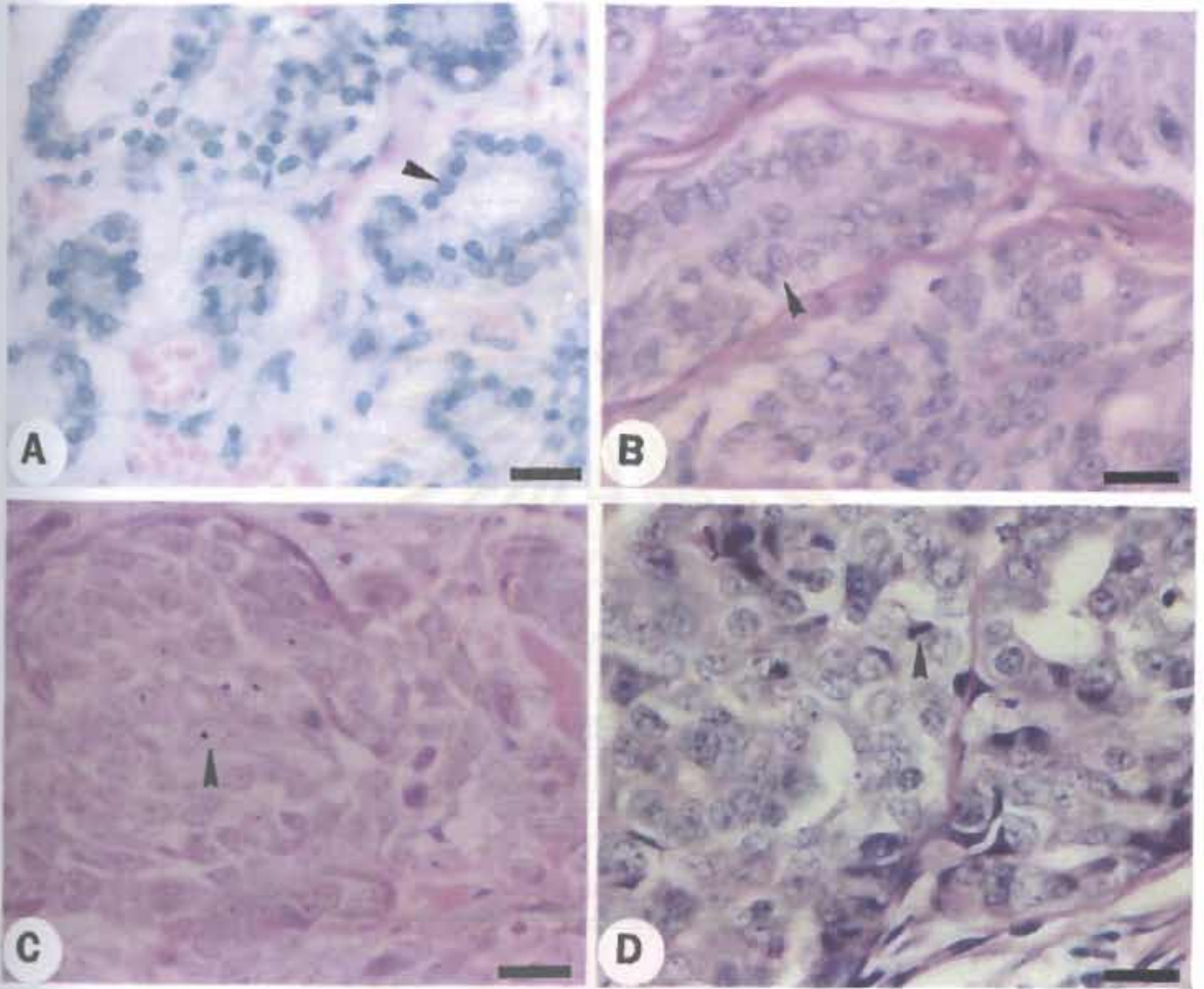
รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของระดับความร้ายแรงต่างๆ ของมะเร็งกระดูก  
(H&E) (bar = 50  $\mu$ m)

- A) Grade 0 **ก้อนมะเร็งมีขอบเขตที่ชัดเจน** (D10054C)  
 B) Grade I **เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง** (หัวลูกศร, D8182A)  
 C) Grade II **เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังหลอดเลือด** (หัวลูกศร, D0664B)  
 D) Grade II **เซลล์มะเร็งมีการลุกลามไปยังเส้น** (หัวลูกศร, P6627Y)



### 2.3 ความสัมพันธ์ของผลผลิตยีน *c-erbB-2* และลักษณะการพัฒนามของนิวเคลียส (Relationship of *c-erbB-2* product and nuclear differentiation)

การศึกษาลักษณะการพัฒนามของนิวเคลียสของมะเร็งเต้านมสุนัขประกอบด้วย ลักษณะ poorly differentiated, moderate differentiated และ well differentiated ตามลำดับ (รูปที่ 9) โดยลักษณะ poorly differentiated พบได้น้อยที่สุด ส่วนใหญ่เป็นแบบ moderate differentiated (51.04%; 49/96) และ well differentiated (41.67%; 40/96) (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ในแต่ละลักษณะการพัฒนามของนิวเคลียสตรวจพบผลผลิตซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* โดยพบผลบวกมากในกลุ่ม well differentiated (82.5%) รองลงมาคือ moderate differentiated (34.38%) และพบผลบวกน้อยที่สุดในกลุ่ม poorly differentiated (5.21%) แต่จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 9 ลักษณะของนิวเคลียสที่มีการพัฒนาในระดับต่าง ๆ (H&E) (bar = 25  $\mu$ m)

- A) ลักษณะนิวเคลียสปกติของเซลล์เยื่อบุเต้านมสุนัข มีรูปร่างกลมรี ขนาดใกล้เคียงกัน (R1581N)
- B) Nuclear grade 1 : poorly differentiated (D7549L)
- C) Nuclear grade 2 : moderated differentiated (D6923A)
- D) Nuclear grade 3 : well differentiated (R1876N)

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนตัวอย่างการตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* แบ่งตามลักษณะการพัฒนานิวเคลียสระดับต่าง ๆ

ลักษณะของนิวเคลียส	การย้อมผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> (%)		รวม
	ผลลบ	ผลบวก	
Well differentiated	7 (17.5%)	33 (82.5%)	40 (100%)
Moderate differentiated	16 (32.65%)	33 (67.35%)	49 (100%)
Poorly differentiated	2 (40%)	5 (60%)	7 (100%)
รวม	25	71	96

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนตัวอย่างระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* ตามการจำแนกของ Jing และคณะ (1999) แบ่งตามลักษณะการพัฒนาของนิวเคลียส

ลักษณะของนิวเคลียส	ผลการตรวจพบผลผลิตของยีน <i>c-erbB-2</i> (%)				รวม
	0	+	++	+++	
Well differentiated	15 (37.5%)	2 (5.0%)	8 (20.0%)	15 (37.5%)	40 (100%)
Moderate differentiated	27 (55.1%)	6 (12.2%)	4 (8.2%)	12 (24.5%)	49 (100%)
Poorly differentiated	3 (42.9%)	1 (14.3%)	1 (1.04%)	2 (28.6%)	7 (100%)
รวม	45	9	13	29	96

2.4 การศึกษาผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาแบบ WHO (Hampe and Misdorp, 1974) (Relationship of  $p21^{WAF1/CIP1}$  product and WHO histopathological grading)

ผลจากการศึกษาพบว่าเซลล์เยื่อบุส่วนใหญ่ให้ผลบวกในไซโตพลาสซึม โดยมีลักษณะเป็นแกรนูล ขณะที่นิวเคลียสติดสีอ่อนกว่าและมีลักษณะเป็นท่อน (fragment) การกระจายตัวเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ พบในเซลล์เยื่อบุ และความเข้มของการติดสีแตกต่างกันไป ภายในท่อเดียวกัน สามารถพบการแสดงออกได้ทั้งในบางเซลล์ หรือทั้งหมด

การตรวจพบผลผลิตซึ่งบ่งถึงการแสดงออกของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน (46.88%; 45/96 และ 53.13%; 51/96 ตามลำดับ) เมื่อจำแนกตามประเภทของมะเร็ง พบว่าสัดส่วนของการตรวจพบผลผลิตมากใน simple tubular adenocarcinoma (53.6%; 30/56), complex tubular adenocarcinoma (80.0%; 8/10), cystic papillary adenocarcinoma (100%; 1/1) และ secretory cell carcinoma (100%; 1/1) สำหรับประเภท simple papillary adenocarcinoma ตรวจพบผลผลิตของยีนได้เท่ากับการตรวจไม่พบ (50.0%; 3/6 และ 50.0%; 3/6) และในประเภท solid carcinoma นั้น ส่วนใหญ่ตรวจไม่พบ (63.6%; 14/22) การวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบผลผลิตของยีนไม่สัมพันธ์กับประเภทของมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การแบ่งระดับการพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ตาม Jing และคณะ(1999) แล้ว (ตารางที่ 10) พบว่ามีตัวอย่างที่อยู่ในระดับ 0 ถึง 77.08 เปอร์เซ็นต์ (74/96) ระดับ + 10.42 เปอร์เซ็นต์ (10/96) ส่วนระดับ ++ และ +++ มีจำนวนเท่ากันได้แก่อย่างละ 6.25 เปอร์เซ็นต์ (6/96

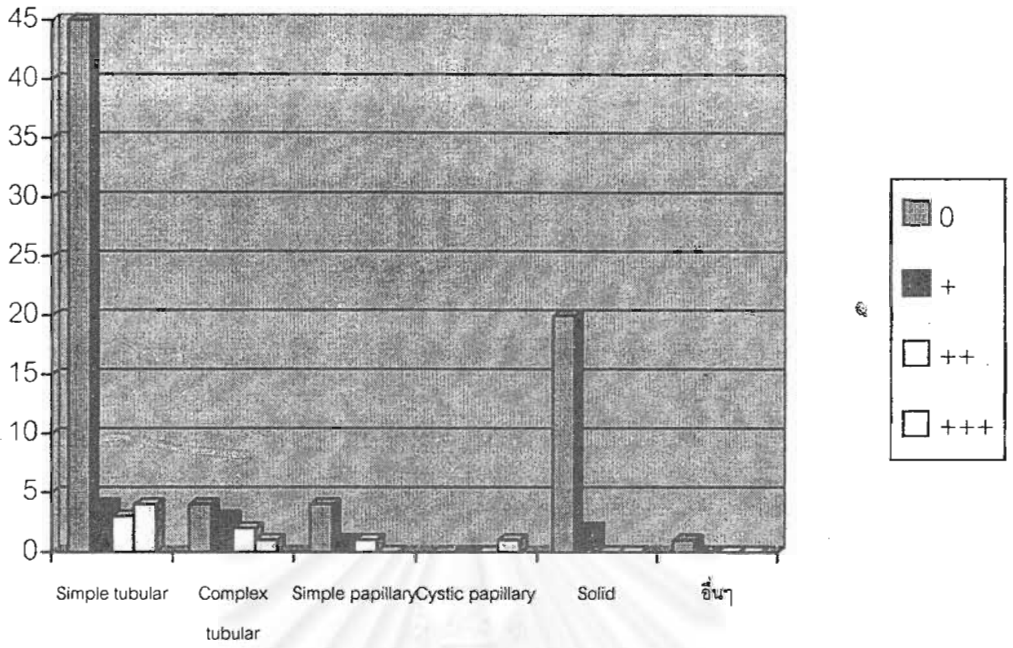
และ 6/96) การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างประเภทของมะเร็งเต้านมสูงกับระดับการตรวจพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่ามีความสัมพันธ์กันที่ระดับ  $p < 0.05$  ( $p=0.028$ )

ตารางที่ 9 แสดงประเภทของมะเร็งเต้านมสูงและจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (ผลบวก) และไม่พบ (ผลลบ) ผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$

ประเภท	การย้อมผลผลิตของยีน $p21$ (ราย)		รวม
	ผลลบ	ผลบวก	
Simple tubular ACC	26 (46.4%)	30 (53.6%)	56 (100%)
Complex tubular ACC	2 (20.0%)	8 (80.0%)	10 (100%)
Simple papillary ACC	3 (50.0%)	3 (50.0%)	6 (100%)
Cystic papillary ACC	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Solid CA	14 (63.6%)	8 (36.4%)	22 (100%)
Secretory cell CA	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
รวม	45	51	96

หมายเหตุ : ACC : adenocarcinoma, CA : carcinoma

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  เปรียบเทียบกับประเภทของมะเร็งไทรอยด์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 10 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตการยับยั้งผลผลิตของซัพเพรสเซอร์อิน p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

จำแนก ตาม Jing และคณะ(1999)ในมะเร็งเต้านมแต่ละชนิด

ประเภท	การยับยั้งผลผลิตของอิน p21 (%)				รวม
	0	+	++	+++	
Simple tubular ACC	45 (80.4%)	4 (7.1%)	3 (5.4%)	4 (7.1%)	56 (100%)
Complex tubular ACC	4 (40%)	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)	10 (100%)
Simple papillary ACC	4 (66.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	0 (0%)	6 (100%)
Cystic papillary ACC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Solid CA	20 (90.9%)	2 (9.1%)	0 (0%)	0 (0%)	22 (100%)
Secretory cell CA	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
รวม	74	10	6	6	96

หมายเหตุ : ACC : adenocarcinoma, CA : carcinoma Fisher exact test  $p < 0.05$ ,  $p = 0.028$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 การศึกษาผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  และระดับความรุนแรง (Relationship of  $p21^{WAF1/CIP1}$  product and malignancy grading)

ตรวจพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่า 45.74 เปอร์เซ็นต์ (43/94) ให้ผลลบ และ 54.26 เปอร์เซ็นต์ (51/94) ให้ผลบวก โดยตรวจพบผลบวกในระดับความรุนแรงเกรด 0 75 เปอร์เซ็นต์ (15/20) และเกรด II 64.7 เปอร์เซ็นต์ (11/17) ส่วนเกรด I พบสัดส่วนที่ต่ำกว่า (43.9%; 25/57)(ตารางที่ 11) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการตรวจพบผลบวกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมสุญฯ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ,  $p = 0.035$ ) สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ตามการแบ่งระดับของ Jing และคณะ (1999) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในระดับความรุนแรงต่าง ๆ ของมะเร็งเต้านมสุญฯ

ระดับความรุนแรง	การย้อมผลผลิตของยีน $p21$ (%)		รวม
	ผลลบ	ผลบวก	
Grade 0	5 (25%)	15 (75%)	20 (100%)
Grade I	32 (56.1%)	25 (43.9%)	57 (100%)
Grade II	6 (35.3%)	11 (64.7%)	17 (100%)
รวม	43	51	94

หมายเหตุ : NA = 2 ราย จาก punch biopsy; Chi-square  $df = 2$  ,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.035$ ; row mean score

differ  $df = 2$ ,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.036$ ; general association  $df = 2$ ,  $p < 0.05$ ,  $p = 0.036$



ตารางที่ 12 จำนวนตัวอย่างมะเร็งเต้านมสุนัขที่ตรวจพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  จำแนกตาม  
Jing และคณะ (1999) ในระดับความรุนแรงต่าง ๆ

ระดับความรุนแรง	ผลผลิตของยีน $p21$ (ราย)				รวม
	0	+	++	+++	
Grade 0	12 (60.0%)	3 (15.0%)	4 (20.0%)	1 (5.0%)	20 (100%)
Grade I	48 (84.2%)	5 (8.8%)	1 (1.8%)	3 (5.3%)	57 (100%)
Grade II	12 (70.6%)	2 (11.8%)	1 (5.9%)	2 (11.8%)	17 (100%)
รวม	72	10	6	6	94

หมายเหตุ: NA = 2 ตัวอย่างจาก punch biopsy

สถาบันวิทยบริการ  
าลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 ความสัมพันธ์ของผลผลิตจากยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  และลักษณะของนิวเคลียส (Relationship between  $p21^{WAF1/CIP1}$  product and nuclear differentiation)

ตรวจพบผลผลิตของยีน 53.13 เปอร์เซ็นต์ (51/96) และไม่พบ 46.88 เปอร์เซ็นต์ (45/ 96) จากตารางที่ 13 พบว่าเปอร์เซ็นต์การตรวจพบในแต่ละลักษณะของนิวเคลียสมีการลดลงจากใน well differentiated (65.0%; 26/40), moderate differentiated (46.9%; 23/49) และ poorly differentiated (28.6%; 2/7) ซึ่งตรงข้ามกับการตรวจไม่พบ ที่มีการเพิ่มขึ้นจาก 35 เปอร์เซ็นต์ (14/40) ใน well differentiated, moderate differentiated (53.1%; 26/49) และ poorly differentiated (71.4%; 5/7) ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าผลการแสดงออกของยีนไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการพัฒนาของนิวเคลียส ต่ำกว่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p = 0.098$ ) และเมื่อจำแนกระดับการแสดงออกของยีนตาม Jing และคณะ (1999) พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบต่อการแสดงออกของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  กับ  
ลักษณะการพัฒนามาของนิวเคลียส

ลักษณะของนิวเคลียส	ผลผลิตของยีน $p21^{WAF1/CIP1}$ (ราย)		รวม
	ผลลบ	ผลบวก	
Well differentiated	14 (35.0%)	26 (65.0%)	40 (100%)
Moderate differentiated	26 (53.1%)	23 (46.9%)	49 (100%)
Poorly differentiated	5 (71.4%)	2 (28.6%)	7 (100%)
รวม	45	51	96

หมายเหตุ : Fisher exact  $p = 0.098$

ตารางที่ 14 จำนวนตัวอย่างแบ่งตามระดับผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ตาม Jing และคณะ  
(1999) เปรียบเทียบกับลักษณะการพัฒนามาของนิวเคลียส

ลักษณะของนิวเคลียส	ผลการตรวจพบผลผลิตของยีน $p21^{WAF1/CIP1}$ (ราย)				รวม
	0	+	++	+++	
Well differentiated	29 (72.5%)	4 (10.0%)	5 (12.5%)	2 (5.0%)	40 (100%)
Moderate differentiated	39 (79.6%)	5 (10.2%)	1 (2.0%)	4 (8.2%)	49 (100%)
Poorly differentiated	6 (85.7%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
รวม	74	10	6	6	96

### 3. ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ $p21^{WAF1/CIP1}$ ต่อการนับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Proliferation Cell Nuclear Antigen Marker

(Relationship of oncogene product *c-erbB-2* and suppressor gene product  $p21^{WAF1/CIP1}$  with proliferation cell nuclear antigen count)

การย้อม proliferation cell nuclear antigen หรือ PCNA ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่ามีการย้อมติดชัดเจนในนิวเคลียส (รูปที่ 11) โดยมีการกระจายทั้งในส่วนเนื้อเยื่อค้ำจุนของมะเร็ง (stroma) และส่วนที่เป็นเซลล์เยื่อใย ภายในนิวเคลียสพบการติดสีบางส่วนหรือทั้งหมดของนิวเคลียส สำหรับในเซลล์ที่มีการแบ่งตัว จะพบการติดสีจางๆ ได้ในไซโตพลาสซึม

เมื่อนำข้อมูลค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของการนับ PCNA (ตารางที่ 15) มาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมผู้วิจัยมีความสัมพันธ์ในทางเดียวกัน ( $p < 0.5$ ,  $p = 0.001$ ) กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การนับ PCNA จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับความร้ายแรงเพิ่มมากขึ้น

ผลของเซลล์มะเร็งที่ย้อมติด PCNA เปรียบเทียบกับผลผลิตจากการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  รวมทั้งการจำแนกระดับตาม Jing และคณะ (1999) ดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17 ตามลำดับ ในตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA ที่นับจากเซลล์มะเร็งจำนวน 1,500 เซลล์พบ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ให้ผลลบ *erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  เป็น 36.25 และ 41.36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าเฉลี่ยในรายที่ให้ผลบวก *erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  เป็น 40.81 และ 38.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการแบ่งระดับการแสดงออกของยีนดังในตารางที่ 17 พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA ในการแสดงออกของยีนที่ระดับต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน แม้ว่าการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* ไม่สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่มี

การแสดงผลออก PCNA แต่พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของการนับ PCNA สัมพันธ์กับระดับความรุนแรง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.001$ ) โดยพบว่าเมื่อระดับความรุนแรงสูงขึ้นค่าเฉลี่ยการนับจะสูงตามไปด้วย (ตารางที่ 15) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี logistic regression analysis พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของการนับ PCNA ที่ตรวจในเซลล์มะเร็ง 1,500 เซลล์เปรียบเทียบ ในระดับความร้ายแรงของมะเร็งเต้านม

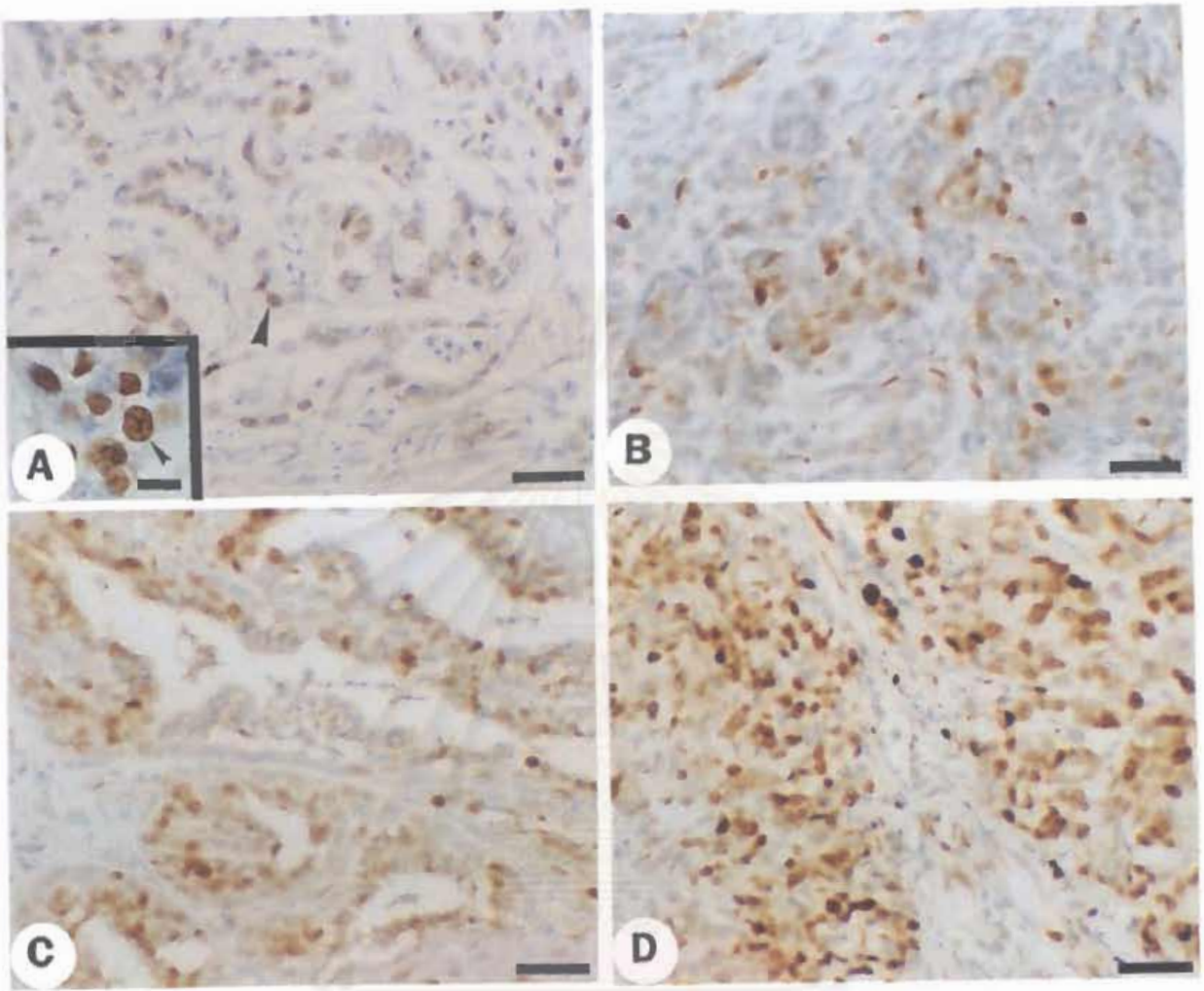
ระดับความร้ายแรง	จำนวน (ราย)	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด PCNA
Grade 0	20	28.91 ± 11.44
Grade I	57	41.0 ± 18.94
Grade II	17	49.58 ± 17.77

Cochran-Mantel-Haenszel  $p < 0.5$ ,  $p = 0.001$

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA กับผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ  $p21^{WAF1/CIP1}$

ผลผลิตของยีน	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด PCNA	
	ผลบวก	ผลลบ
c-erbB-2	40.81 ± 18.77	36.25 ± 17.18
$p21^{WAF1/CIP1}$	38.03 ± 17.53	41.36 ± 19.33

\*หมายเหตุ: missing data 1 รายไม่สามารถย้อมติด PCNA ได้



รูปที่ 11 ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ที่ให้ผลบวก PCNA ในมะเร็งเต้านมชนิดต่าง (ABC, DAB)

ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin (bar = 50  $\mu\text{m}$ )

A) มะเร็ง invasive ductal carcinoma ในคน (ตัวควบคุมบวก) ในรอบแสดงการติดสีที่เด่นชัด

ในนิวเคลียส (หัวลูกศร, bar = 25  $\mu\text{m}$ )

B) มะเร็งเต้านมชนิด tubular adenocarcinoma (D6934M)

C) มะเร็งเต้านมชนิด papillary adenocarcinoma (D8703N)

D) มะเร็งเต้านมชนิด solid carcinoma (D9552N)

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ย้อมติด PCNA เปรียบเทียบกับระดับผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> โดยการจำแนกตาม Jing และคณะ (1999)

ระดับผลผลิตของยีน	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด PCNA			
	0	+	++	+++
c-erbB-2	35.70 ± 16.56	40.43 ± 19.45	44.98 ± 21.40	42.88 ± 18.98
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	40.92 ± 18.58	30.44 ± 13.28	33.49 ± 10.33	45.06 ± 26.11

\*หมายเหตุ: missing data 1 รายไม่สามารถย้อมติด PCNA ได้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4. ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่อลักษณะทางคลินิก (Relationship between products of oncogene *c-erbB-2* and suppressor gene *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* and clinicopathological factors)

การศึกษาความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่อลักษณะทางคลินิกมีความสำคัญในแง่นำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกต่อไป การเก็บข้อมูลทางคลินิกต่างๆ ได้มาจากการกรอกประวัติในบัตรสัตว์ป่วย แบบฟอร์มการตรวจชิ้นเนื้อ (ภาคผนวก) รวมทั้งการติดตามข้อมูลเพิ่มเติมจากสัตวแพทย์และเจ้าของสุนัข ลักษณะทางคลินิกที่ได้ศึกษาได้แก่ พันธุ์ เพศ อายุ ขนาดและรูปร่างก่อนมะเร็ง ความแน่น การพบการตกเลือด เนื้อตาย หนองที่ก้อนมะเร็ง การตรวจต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง และการตรวจการแพร่กระจายทางคลินิก รวมทั้งระยะเวลาการเกิดระยะเวลากการงอกใหม่ และการอยู่รอดของสัตว์ป่วย โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ได้จำแนกเป็น 2 ระดับทั้งการพบการแสดงออกโดยแสดงเป็นค่าบวกและลบ และการจำแนกตามวิธีการของ Jing และคณะ (1999)

##### 4.1 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่อพันธุ์สุนัข

สุนัขที่ป่วยด้วยมะเร็งเต้านมที่ทำการศึกษาเป็นพันธุ์ผสม 51.81 เปอร์เซ็นต์ (43/83) และเป็นพันธุ์แท้ 48.19 เปอร์เซ็นต์ (40/83) ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ poodle และ terrier ชนิดละ 7.23 เปอร์เซ็นต์ (6/83) พันธุ์ cocker spaniel และ German shepherd ชนิดละ 6.02 เปอร์เซ็นต์ (5/83) พันธุ์ไทย 4.82 เปอร์เซ็นต์ (4/83) พันธุ์ Doberman pincher และ Shih Tzu ชนิดละ 3.61 เปอร์เซ็นต์ (3/83) พันธุ์ Spitz และ Daschund ชนิดละ 2.41 เปอร์เซ็นต์ (2/83) ส่วนพันธุ์ Old English sheepdog, Yorkshire terrier, Pekingese, Labrador retriever พบชนิดละ 1.20



เปอร์เซ็นต์ (1/83) เมื่อนำผลการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* มาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติกับชนิดพันธุ์ต่าง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเป็นอิสระต่อกัน

ตารางที่ 18 แสดงผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ ยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* แบ่งตามประเภทพันธุ์สุนัข

พันธุ์	<i>c-erbB-2</i>		<i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
ผสม (43 ราย)	14 (32.56%)	29 (67.44%)	22 (51.16%)	21 (48.84%)
พันธุ์แท้ (40 ราย)	9 (22.5%)	31 (77.5%)	17 (42.5%)	23 (57.5%)
รวม (ราย)	23	60	39	44

ตารางที่ 19 ระดับของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จำแนกตาม Jing และคณะ (1999) กับพันธุ์สุนัขต่าง ๆ

พันธุ์	<i>c-erbB-2</i>				<i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i>			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
ผสม	20	5	6	12	30	7	3	3
(จำนวน 43 ราย)	(46.51%)	(11.63%)	(13.95%)	(27.91%)	(69.77%)	(16.28%)	(6.98%)	(6.98%)
พันธุ์แท้	18	4	6	12	33	3	1	3
(จำนวน 40 ราย)	(45%)	(10%)	(15%)	(30%)	(82.5%)	(7.5%)	(2.5%)	(7.5%)
รวม	38	9	12	24	63	10	4	6
รวมทั้งสิ้น		83				83		

#### 4.2 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่อเพศสุนัข

การศึกษามะเร็งเต้านมในสุนัขนี้ ทั้ง 96 ตัวอย่างได้มาจากสุนัขเพศเมียทั้งสิ้น สุนัขเพศเมียในกลุ่มศึกษาประกอบด้วยสุนัขที่ยังไม่ได้ทำหมัน 93.75 เปอร์เซ็นต์ (90/96) และสุนัขที่ทำหมันแล้ว 6.25 เปอร์เซ็นต์ (6/96) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการตรวจพบผลผลิต หรือระดับของยีนทั้งคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 20 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* เปรียบเทียบระหว่างสุนัขเพศเมียที่ทำหมันกับไม่ได้ทำหมัน

สุนัข	<i>c-erbB-2</i>		<i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
ไม่ได้ทำหมัน	23 (25.56%)	67 (74.44%)	40 (44.44%)	50 (55.56%)
ทำหมันแล้ว	2 (33.33%)	4 (66.67%)	5 (83.33%)	1 (16.67%)
รวม	25	71	45	51

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ตามการแบ่งของ Jing และคณะ (1999) ในสุนัขเพศเมียที่ทำหมันและยังไม่ได้ทำหมัน

สุนัข	<i>c-erbB-2</i>				<i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i>			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
ไม่ได้ทำ	43	8	13	26	69	9	6	6
หมัน	(47.78%)	(8.89%)	(14.44%)	(28.89%)	(76.67%)	(10%)	(6.67%)	(6.67%)
ทำหมัน	2	1	0	3	5	1	0	0
แล้ว	(33.33%)	(16.67%)	(0%)	(50.0%)	(83.33%)	(16.67%)	(0%)	(0%)
รวม (ราย)	45	9	13	29	74	10	6	6

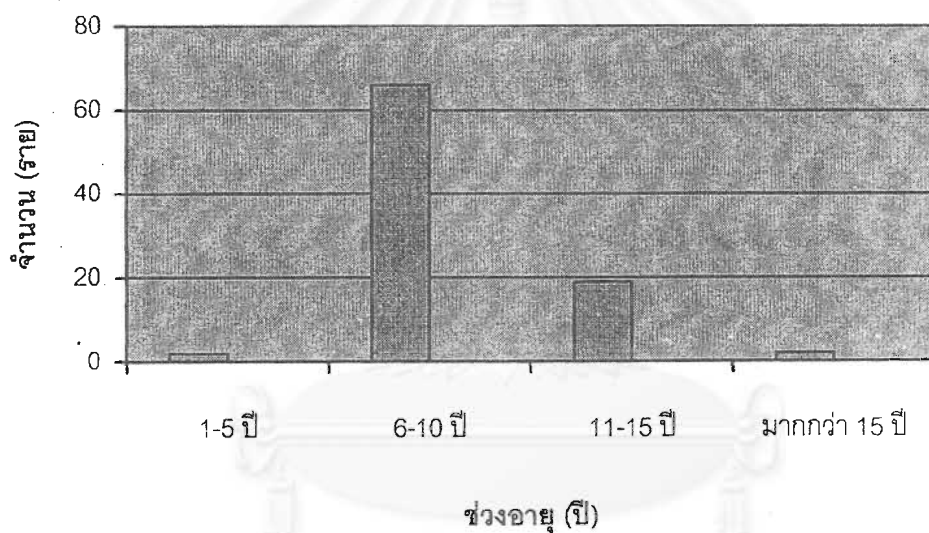
#### 4.3 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่ออายุสุนัข

จากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดพบว่าเกิดมะเร็งได้ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 17 ปี มีค่ามัธยฐาน (mean) 9.26 ปี ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.7 ค่ามัชฌิมเลขคณิต (median) ที่ 10.0 ปี และค่าฐานนิยม (mode) 10.0 ปี โดยมีโดยพบการเกิดมะเร็งเต้านมมากที่สุดที่อายุ 10 ปี เนื่องจากข้อมูลมีการกระจายมาก จึงได้จัดเป็นอันตรภาคชั้นเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ดังในตารางที่ 22-23

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์การตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* พบว่าแต่ละช่วงอายุของสุนัข มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ( $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0488$ , Odd ratio = 18.6) ซึ่งในแต่ละช่วงอายุจะพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* มากกว่าการไม่พบ ในช่วงอายุ 5-10 ปีมี

เปอร์เซ็นต์การพบผลผลิตของยีนสูงกว่าไม่พบประมาณ 3.72 เท่า ส่วนยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* พบผลผลิตของยีนในสัดส่วนใกล้เคียงกับการตรวจไม่พบ เมื่อจำแนกระดับผลผลิตของยีนตาม Jing และ คณะ(1999) พบว่ามีเพียงระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับช่วงอายุที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0315$ , Odd ratio = 5.04)

### ความถี่ของสุนัขที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมสุนัขที่ใช้ในการศึกษา



รูปที่ 12 แผนภาพแสดงการกระจายความถี่ของสุนัขกลุ่มศึกษาที่เป็นมะเร็งเต้านมตามอายุ

ตารางที่ 22 ผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในช่วงอายุต่าง ๆ ของสุนัขที่เป็นมะเร็งเต้านม

ช่วงอายุ	c-erbB-2		p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
ต่ำกว่า 5 ปี	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
5-10 ปี	14 (21.2%)	52 (78.8%)	33 (50.0%)	33 (50.0%)
11-15 ปี	8 (42.1)	11 (57.9%)	7 (36.8%)	12 (63.2%)
มากกว่า 15 ปี	0 (0%)	2 (100%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)
รวม (ราย)	22	67	43	46
รวมทั้งสิ้น (ราย)	89		89	

Logistic regression, chi-square  $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0488$ , Odd ratio = 18.60

สถาบันวิทยบริการ  
 าลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21*<sup>WAF1/CIP1</sup> ตามแบบของ Jing และคณะ (1999) ในช่วงอายุต่าง ๆ ของสุนัขที่ป่วยด้วยมะเร็งเต้านม

ช่วง อายุ (ปี)	<i>c-erbB-2</i>				<i>p21</i> <sup>WAF1/CIP1</sup>			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
< 5	0 (0%)	0 (0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5-10	29 (43.9%)	7 (10.6%)	10 (15.2%)	20 (30.3%)	51 (77.3%)	4 (6.1%)	5 (7.6%)	6 (9.1%)
11-15	11 (57.9%)	1 (5.3%)	1 (5.3%)	6 (31.8%)	13 (68.4%)	5 (26.3%)	1 (5.3%)	0 (0%)
> 15	1 (50.0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0%)	0 (0%)
รวม (ราย)	41	8	12	28	67	10	6	6
รวม (ราย)		89				89		

Logistic regression, , chi-square  $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0315$ , Odd ratio = 5.04

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.4 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ $p21^{WAF1/CIP1}$ ต่อขนาดของก้อนมะเร็ง

สำหรับขนาดก้อนมะเร็งมีค่ามัธยฐาน  $7.11 \pm 4.81$  ซม. ค่ามัชฌิมเลขคณิต และค่าฐานนิยมมีค่าเท่ากัน คือ 5 ซม. เนื่องจากก้อนมะเร็งมีความแตกต่างกันไปทั้งขนาดและรูปร่าง ดังนั้นจึงต้องใช้ขนาดจากมิติที่กว้างมากที่สุดมาใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ขนาดของก้อนมะเร็ง จัดกลุ่มของขนาดตามระบบ TNM system กับระดับผลผลิตจากการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* ตามแบบของ Jing และคณะ (1999) รวมทั้งระดับผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0315$ ,  $p_{p21} = 0.0472$ ) และพบว่าขนาดของก้อนมะเร็งกับการตรวจพบผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p < 0.05$ ,  $p_{p21class} = 0.0308$ ) เช่นกัน

ตารางที่ 24 ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  ในก้อนมะเร็งเต้านมขนาดต่าง ๆ ที่จำแนกตามระบบ TNM system

ขนาด (ซม.)	<i>c-erbB-2</i>		$p21^{WAF1/CIP1}$	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
< 3	2 (22.2%)	7 (77.8%)	5 (55.6%)	4 (44.4%)
3-5	4 (12.1%)	29 (87.9%)	15 (45.5%)	18 (54.5%)
> 5	14 (35.9%)	25 (64.1%)	21 (53.8%)	18 (46.2%)
รวม	20	61	41	40
รวมทั้งสิ้น	81			

หมายเหตุ: Logistic regression, chi-square  $p_{p21^{class}} = 0.0308$ , Odd ratio = 0.06

ตารางที่ 25 ระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  ตามแบบของ Jing และคณะ (1999) ในก้อนมะเร็งเต้านมขนาดต่าง ๆ จำแนกตามระบบ TNM system

ขนาด (ซม.)	<i>c-erbB-2</i>				$p21^{WAF1/CIP1}$			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
< 3	4 (44.4%)	1 (11.1%)	3 (33.3%)	1 (11.1%)	8 (88.9%)	1 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3-5	12 (36.4%)	2 (6.1%)	6 (18.2%)	13 (39.4%)	23 (69.7%)	3 (9.1%)	4 (12.1%)	3 (9.1%)
> 5	22 (55.4%)	3 (7.7%)	3 (7.7%)	11 (28.2%)	31 (79.5%)	5 (12.8%)	0 (0%)	3 (7.7%)
รวม (ราย)	38	6	12	25	62	9	4	6
รวมทั้งสิ้น	81 (84.375%)							

Logistic regression, chi-square  $p < 0.05$ ,  $p_{c-erbB-2} = 0.0315$ , Odd ratio = 1.25,  $p_{p21} = 0.0472$ , Odd ratio = 1.64



#### 4.5 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ $p21^{WAF1/CIP1}$ ต่อปัจจัยทางคลินิกอื่นๆ

##### 4.5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ $p21^{WAF1/CIP1}$ ต่อลักษณะปรากฏของก้อนมะเร็ง

ลักษณะปรากฏของก้อนมะเร็งที่ศึกษาได้แก่ รูปร่าง ความแน่น และสีของก้อนมะเร็ง จากกลุ่มศึกษา พบว่ารูปร่างของมะเร็งเต้านมมีหลากหลาย จึงได้จำแนกรูปร่างหลักๆ ด้วยกันไว้ 3 ประเภท ได้แก่ รูปไข่ (oval) รูปกลม (round) และรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ ยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  อย่างไรก็ดีเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าผลผลิตของยีนทั้งคู่เป็นอิสระจากปัจจัยดังกล่าวที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

รูปร่างจำแนกได้เป็น รูปไข่ รูปกลม รูปร่างไม่แน่นอน จากข้อมูลที่ได้ ส่วนใหญ่มะเร็งจะมีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นพูหลายพู หรือก้อน (multilobulated) โดยมีขนาดที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ดีไม่มีความแตกต่างกับการตรวจพบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* แต่อย่างใด ความแน่นของก้อนมะเร็งจำแนกได้เป็น นิ่ม (soft) แน่น (firm) แข็ง (hard) และอีกชนิดที่ในประวัติระบุว่าพบทั้งนิ่มและแน่น แม้ว่าผลผลิตของยีนทั้งคู่ไม่มีความแตกต่างในลักษณะความแน่นของมะเร็งนี้ แต่พบว่าส่วนใหญ่มะเร็งเต้านมมีลักษณะแน่น สำหรับสีของก้อนมะเร็งควรพิจารณาส่วนประกอบต่างๆ ภายในก้อนมะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นสีของกลุ่มเซลล์มะเร็งซึ่งมีสีขาว ขาวครีม เหลืองอ่อน สีจากเลือดซึ่งมีสีในโทนแดงชมพู จนถึงน้ำตาล สีจากเนื้อตาย หนองซึ่งมีตั้งแต่สีขาว เหลือง เขียว หรือเทา ซึ่งการจำแนกสีนี้ความแตกต่างจากความสังเกตของแต่ละบุคคล ดังนั้นในการศึกษานี้จึงไม่ได้นำมาวิเคราะห์อย่างละเอียด

ตารางที่ 26 การตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกตามรูปร่างและความแน่นของมะเร็ง

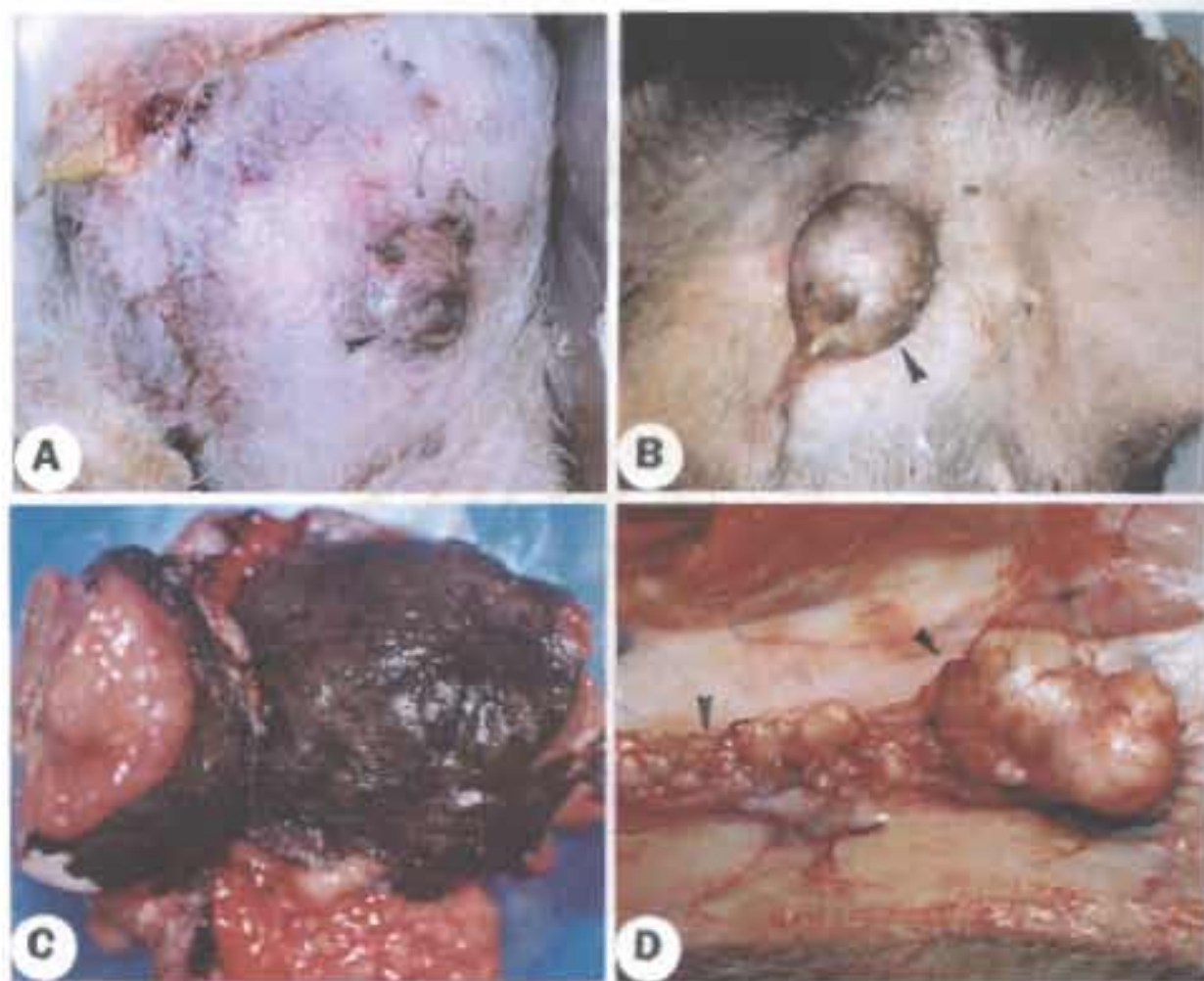
ลักษณะปรากฏ	c-erbB-2		p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
<u>รูปร่าง</u>				
Oval	5 (25.0%)	15 (75.0%)	11 (55.0%)	9 (45.0%)
Round	10 (43.5%)	13 (56.5%)	14 (60.9%)	9 (39.1%)
Irregular	5 (17.9%)	23 (82.1%)	12 (42.9%)	16 (57.1%)
รวม (ราย)	20	51	37	34
รวมทั้งสิ้น (ราย)	71			
<u>ความแน่น</u>				
Soft	4 (44.44%)	5 (55.56%)	5 (55.56%)	4 (44.44%)
Firm	13 (24.07%)	41 (75.93%)	22 (40.74%)	32 (59.26%)
Hard	3 (42.86%)	4 (57.14%)	5 (71.43%)	2 (28.57%)
Soft and firm	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)
รวม (ราย)	20	51	33	38
รวมทั้งสิ้น (ราย)	71			

ตารางที่ 27 ระดับผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกตาม Jing และคณะ (1999)

เปรียบเทียบกับรูปร่างและความแน่นของมะเร็ง

ลักษณะ	c-erbB-2				p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>				
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	
<b>รูปร่างของมะเร็ง</b>									
Oval	9 (45.0%)	2 (10.0%)	5 (25.0%)	4 (20.0%)	16 (80.0%)	3 (15.0%)	1 (5.0%)	0 (0%)	
Round	17 (73.9%)	1 (4.3%)	2 (8.7%)	3 (13.0%)	17 (73.9%)	3 (13%)	1 (4.3%)	2 (8.7%)	
Irregular	9 (32.1%)	3 (10.7%)	3 (10.7%)	13 (46.4%)	21 (75.0%)	1 (3.6%)	3 (10.7%)	3 (4.2310.7%)	
รวม (ราย)	35	6	10	20	54	7	5	5	
รวมทั้งสิ้น		71				71			
<b>ความแน่น</b>									
Soft	6 (66.67%)	0 (0%)	2 (22.22%)	1 (11.11%)	7 (77.78%)	2 (22.22%)	0 (0%)	0 (0%)	
Firm	27 (50.0%)	3 (5.56%)	7 (12.96%)	17 (31.48%)	40 (74.07%)	5 (9.26%)	3 (5.56%)	6 (11.11%)	
Hard	5 (71.43%)	1 (14.29%)	0 (0%)	1 (14.29%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Soft and firm	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
รวม (ราย)	39	4	9	19	55	7	3	6	
รวมทั้งสิ้น		71				71			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

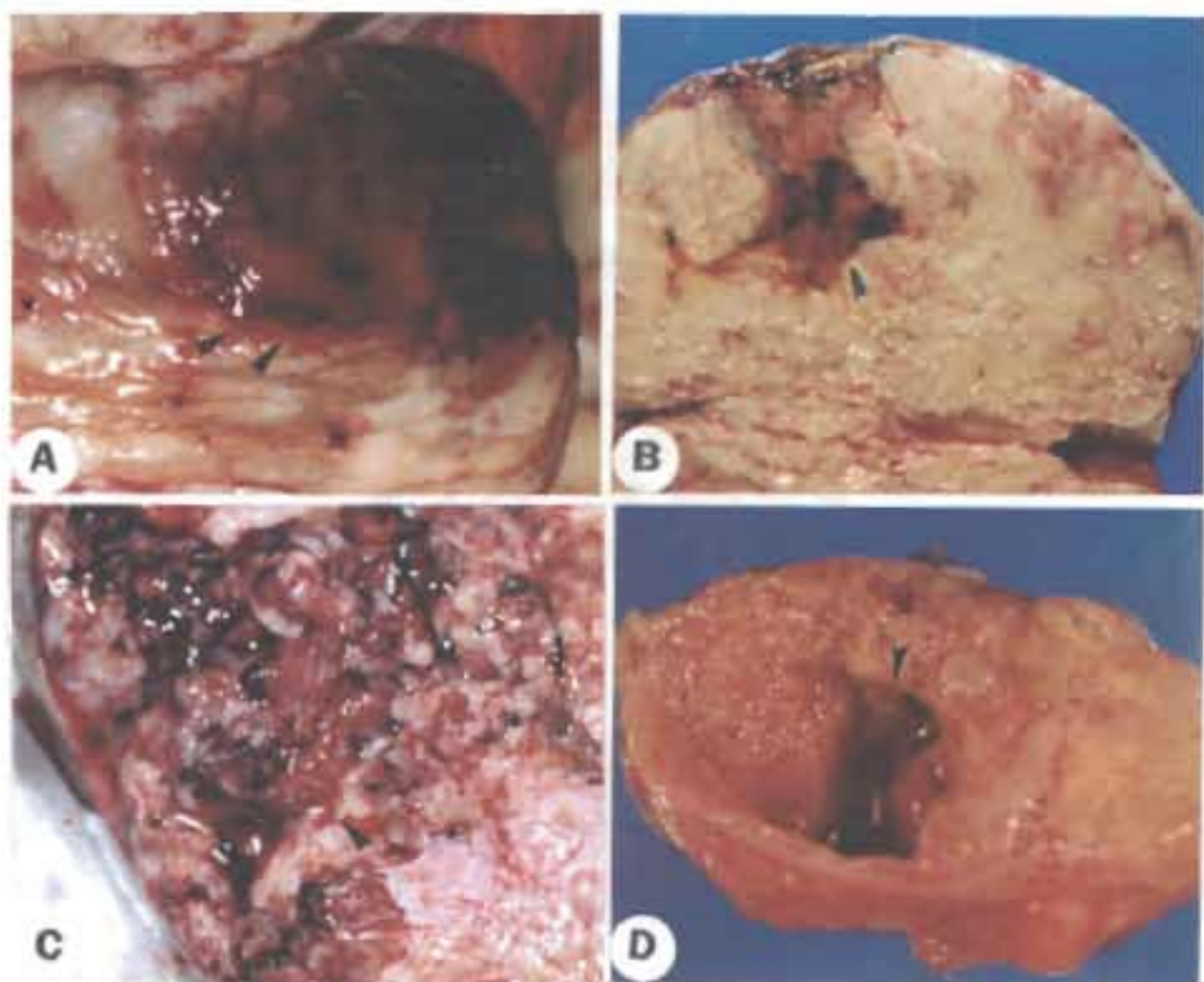


สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ลักษณะรูปร่างแบบต่างๆของมะเร็งเต้านมสุนัข

- A) รูปไข่ (oval)
- B) รูปกลม (round)
- C) รูปร่างไม่แน่นอน (irregular)
- D) รูปร่างหลายพู (multifoliated)



## สภากายวิภาคศาสตร์

### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 ลักษณะรอยโรคที่พบที่ก้อนมะเร็งบานมฤตง

- A) พบเยื่อการตกเลือดเป็นก้อนขนาดใหญ่ (หัวลูกศร)
- B) พบหลอดเลือดรวมกันเนื้อตายบนก้อนมะเร็ง (หัวลูกศร)
- C) พบเนื้อตายเป็นบริเวณกว้างภายในก้อนมะเร็ง (หัวลูกศร)
- D) พบถุงน้ำภายในก้อนมะเร็ง (หัวลูกศร)

#### 4.5.2 ความสัมพันธ์ของผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ต่อรอยโรคต่างๆ ที่พบจากก้อนมะเร็ง

การตกเลือด (hemorrhage) การเกิดแผลหลุม (ulceration) ลักษณะถุงน้ำ (cyst) การพบเนื้อตาย (necrosis) และการตรวจพบหนอง สามารถพบได้กับก้อนมะเร็ง ซึ่งมีข้อมูล missing data มากในกลุ่มที่ศึกษาย้อนหลัง เมื่อวิเคราะห์แล้วไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื้อตายเป็นลักษณะอย่างหนึ่งที่พบได้ในมะเร็ง ซึ่งเป็นผลจากการทำลายเนื้อเยื่อ หรือมีการเจริญอย่างรวดเร็วมากจนขาดสารอาหารและออกซิเจน เมื่อวิเคราะห์แล้วไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 28 ผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> เปรียบเทียบกับการพบรอยโรคที่พบที่  
ก้อนมะเร็ง

รอยโรค	c-erbB-2		p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
<b>การพบการตกเลือด</b>				
ไม่พบ (44 ราย)	10 (22.7%)	34 (77.3%)	23 (52.3%)	21 (47.7%)
พบ (15 ราย)	5 (33.3%)	10 (66.7%)	4 (26.7%)	11 (73.3%)
รวม (ราย)	15	44	27	32
รวมทั้งสิ้น (ราย)	59		59	
<b>การพบเนื้องอก</b>				
ไม่พบ (51 ราย)	14 (27.5%)	37 (72.5%)	26 (51.0%)	25 (49.0%)
พบ (7 ราย)	1 (14.3%)	6 (85.7%)	3 (42.9%)	4 (57.1%)
รวม (ราย)	15	43	29	29
รวมทั้งสิ้น (ราย)	58		58	
<b>การพบหนอง</b>				
ไม่พบ (42 ราย)	11 (26.2%)	31 (73.8%)	20 (47.6%)	22 (52.4%)
พบ (14 ราย)	4 (28.6%)	10 (71.4%)	6 (42.9%)	8 (57.1%)
รวม (ราย)	15	41	26	30
รวมทั้งสิ้น (ราย)	56		56	

ตารางที่ 29 ผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกตาม Jing และคณะ(1999)

เปรียบเทียบกับกรพบการตกลือด เนื้อตาย และหนอง

รอยโรค	c-erbB-2				p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++
<b>การพบการตกลือด</b>								
ไม่พบ (44 ราย)	23 (52.3%)	4 (9.1%)	4 (9.1%)	13 (29.5%)	34 (77.3%)	4 (9.1%)	3 (6.8%)	3 (6.8%)
พบ (15 ราย)	8 (53.3%)	0 (0%)	3 (20%)	4 (26.7%)	11 (73.4%)	2 (13.3%)	0 (0%)	2 (13.3%)
รวม (ราย)	31	4	7	17	45	6	3	5
รวมทั้งสิ้น (ราย)		59				59		
<b>การพบเนื้อตาย</b>								
ไม่พบ (51 ราย)	30 (58.8%)	3 (5.9%)	4 (7.8%)	14 (27.5%)	40 (78.4%)	5 (9.8%)	3 (5.9%)	3 (5.9%)
พบ (7 ราย)	2 (28.6%)	0 (0%)	4 (57.1%)	1 (14.3%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
รวม (ราย)	32	3	8	15	47	5	3	3
รวมทั้งสิ้น (ราย)		58				58		
<b>การพบหนอง</b>								
ไม่พบ (42 ราย)	24 (57.1%)	3 (7.1%)	4 (9.5%)	11 (26.2%)	33 (78.6%)	4 (9.5%)	1 (2.4%)	4 (9.5%)
พบ (14 ราย)	5 (35.7%)	0 (0%)	3 (21.4%)	6 (42.9%)	10 (71.4%)	2 (14.3%)	2 (14.3%)	0 (0%)
รวม (ราย)	29	3	7	17	43	6	3	4
รวมทั้งสิ้น (ราย)		56 (58.33%)				56 (58.33%)		



### ตารางที่ 30 การตรวจพบแผลหลุมและถุงน้ำ

รอยโรค	จำนวนที่ไม่พบ	จำนวนที่พบ
แผลหลุม (จำนวน 10 ราย)	9 (90%)	1 (10%)
ถุงน้ำ (จำนวน 13 ราย)	8 (61.54%)	5 (38.46%)

#### 4.5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ต่อการตรวจพบเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง และการแพร่กระจายจากทางคลินิก

การตรวจคลำและสังเกตต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงกับเต้านมที่มีก้อนมะเร็ง เป็นการตรวจทางคลินิกเพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการวินิจฉัย หรือการเก็บตัวอย่างเซลล์ หรือชิ้นเนื้อเพื่อวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็ง ตำแหน่งของต่อมน้ำเหลืองที่รับน้ำเหลืองจากเต้านมได้แสดงไว้ในรูปที่ 3 ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ (axillary lymph node) ของแต่ละข้างจะรับน้ำเหลืองที่มาจากเต้านม 3 คู่แรกของแต่ละข้าง ส่วนต่อมน้ำเหลืองบริเวณขาหนีบ (superficial inguinal lymph node) แต่ละข้างจะรับน้ำเหลืองจากเต้านมคู่ที่ 4 และ 5 ของแต่ละข้าง

การพบการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลือง ได้แก่ การเพิ่มขนาด การบวมน้ำ การแตกเลือด หรือเนื้อตาย ซึ่งสามารถพบได้ในเต้านมอีกเสบเช่นกัน ดังนั้นในกรณีที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ควรเก็บตัวอย่างต่อมน้ำเหลืองนั้นมาตรวจไม่ว่าจะเป็นทางเซลล์วิทยา หรือจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาในกลุ่มที่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง พบผลบวก c-erbB-2 มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการแพร่กระจาย (100 เปอร์เซ็นต์ และ 74 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างในการศึกษาชั้นหลัง ที่มีข้อมูลครบมีน้อย

ตารางที่ 31 ผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> เปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองและการพบการแพร่กระจาย

ปัจจัย	c-erbB-2		p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	
	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก
<b>การเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลือง</b>				
ไม่พบ (25 ราย)	5 (20.0%)	20 (80%)	14 (56%)	11 (44%)
พบ (13 ราย)	4 (30.8%)	9 (69.2%)	6 (46.2%)	7 (53.8%)
รวม (ราย)	9	29	20	18
รวมทั้งสิ้น (ราย)	38 (39.58%)		38 (39.58%)	
<b>การพบการแพร่กระจาย</b>				
ไม่พบ (23 ราย)	6 (26.1%)	17 (73.9%)	10 (43.5%)	13 (56.5%)
พบ (7 ราย)	0 (0%)	7 (100%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
รวม (ราย)	6	24	14	16
รวมทั้งสิ้น (ราย)	30 (31.25%)		30 (31.25%)	

ตารางที่ 32 ผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> จำแนกตาม Jing และคณะ(1999).

เปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองและการพบการแพร่กระจาย

ปัจจัย	c-erbB-2				p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>				
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	
<b>การเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลือง</b>									
<b>เหลือง</b>									
ไม่พบ (25 ราย)	12 (48.0%)	2 (8.0%)	5 (20%)	6 (24%)	20 (80.0%)	3 (12.0%)	0 (0%)	2 (8.0%)	
พบ (13 ราย)	9 (69.2%)	0 (0%)	1 (7.7%)	3 (23.1%)	10 (76.9%)	1 (7.7%)	1 (7.7%)	1 (7.7%)	
รวม (ราย)	21	2	6	9	30	4	1	3	
รวมทั้งสิ้น (ราย)		38 (39.58%)				38 (39.58%)			
<b>การพบการแพร่กระจาย</b>									
ไม่พบ (23 ราย)	9 (39.1%)	0 (0%)	7 (30.4%)	7 (30.4%)	13 (56.5%)	3 (13.0%)	3 (13.0%)	4 (17.5%)	
พบ (7 ราย)	3 (42.9%)	1 (14.2%)	0 (0%)	3 (42.9%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
รวม (ราย)	12	1	7	10	20	3	3	4	
รวมทั้งสิ้น (ราย)		30 (31.25%)				30 (31.25%)			

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.5.4 ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ต่อปัจจัยด้านเวลา (Relationship of Time Factors to Prognosis and the Predictive Potential of Oncogene c-erbB-2 Product and Suppressor Gene p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Product)

##### ระยะเวลาที่มะเร็งเจริญ (Duration of growth)

ระยะเวลาที่มะเร็งมีการเจริญงอกขยายใหญ่ขึ้นมาได้นำมาวิเคราะห์พบว่ามีความสัมพันธ์ 4.84±0.64 สัปดาห์ โดยพบระยะเวลาที่สั้นที่สุดคือ 0.3 สัปดาห์ และระยะเวลานานที่สุด 24 สัปดาห์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับผลผลิตของยีนทั้งสองพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

##### ปัจจัยการมีชีวิตและเสียชีวิตของสุนัข

การพิจารณาปัจจัยการมีชีวิต หรือเสียชีวิตกระทำโดยติดตามข้อมูลในรายที่มีระยะเวลาภายหลังการวินิจฉัย 3 เดือนขึ้นไป จากจำนวนสุนัข 96 ราย พบว่าติดตามได้ 69.79 เปอร์เซ็นต์ (67/96) โดยติดตามถึงวันที่ 5 มีนาคม 2545 พบว่ายังมีชีวิตอยู่และมีสุขภาพดี 38.81 เปอร์เซ็นต์ (26/67) มี 4.48 เปอร์เซ็นต์ (3/67) ที่ยังมีชีวิตแต่พบการงอกขึ้นใหม่ สุนัข 31.34 เปอร์เซ็นต์ (21/67) เสียชีวิตจากมะเร็งเต้านม (รวมรายที่สัตวแพทย์กระทำ euthanasia) และเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นๆ เช่น อุบัติเหตุ โรคติดเชื้อ เป็นจำนวน 25.37 เปอร์เซ็นต์ (17/67) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตจากยีนทั้งสองกับปัจจัยการมีชีวิตแล้วพบว่าเป็นอิสระต่อกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## อภิปรายผลการวิจัย

การประเมินผลจากผลผลิตของยีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็น biological marker ในการพยากรณ์โรคนั้นเป็นงานที่ซับซ้อน ความแตกต่างในลักษณะพื้นฐานทั่วไป พฤติกรรมของมะเร็งชนิดต่างๆ รวมทั้งพยาธิกำเนิด การศึกษานี้มีข้อมูลทางสัตวแพทย์น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับทางการแพทย์ อย่างไรก็ตาม วิทยานิพนธ์นี้เป็นหนึ่งในการริเริ่มเพื่อนำผลไปสู่การประยุกต์ใช้ผลผลิตของยีนด้านคลินิกทางสัตวแพทย์ในโอกาสต่อไป การเลือก marker ในการศึกษานี้ได้เลือกศึกษาจากผลผลิตของยีนสองชนิดด้วยกัน ได้แก่ อองโคยีน *c-erbB-2* และซีพเพรสเซอร์ยีน *p21<sup>WAF1/CIP</sup>* เนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันว่ายีนทั้งสองชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งเต้านมของทั้งในสัตว์ (Ahern et al., 1996; Ritt et al., 1998; Rungsipipat et al., 1999; Inoue and Wada, 2000) และในมนุษย์ (Barbareschi et al., 1996; Caffo et al., 1996; Elledge and Allred, 1998)

การศึกษานี้ได้ศึกษาร่วมกับ proliferation cell nuclear antigen (PCNA) ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมของเอนไซม์ delta-polymerase ที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้จำเพาะของเซลล์มะเร็งที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว รวมทั้งมีรายงานการนำไปใช้ในสุนัข (Preziosi et al., 1995; Löhr et al., 1997; Mozzherin et al., 1997; Funakoshi et al., 2000) นอกจากนี้ได้ศึกษาร่วมกับปัจจัยทางด้านคลินิก เพื่อหาความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิด อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในงานด้านการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมของสุนัข

การเลือกใช้เทคนิคทางด้านอิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมกับการศึกษาทางด้านพยาธิวิทยา นับว่าเป็นวิธีที่เหมาะสม เนื่องจากทำให้ทราบถึงข้อมูลทั้งในด้านลักษณะรูปร่างของมะเร็งและจุด

พยาธิวิทยา ที่จำแนกออกเป็นประเภทต่าง ๆ โดยเฉพาะตามหลักการของ WHO ตำแหน่งของโปรตีนที่ศึกษาในเซลล์และเนื้อเยื่อ รวมทั้งขั้นตอนที่ปฏิบัติได้ไม่ซับซ้อน และสามารถประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการขั้นสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างมะเร็งเต้านมจากสุนัขเพศเมียจำนวน 96 ตัวอย่าง จากการจำแนกประเภทตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตาม WHO แล้ว พบว่าทั้งหมดเป็นมะเร็งกลุ่มเยื่อเมือกทั้งนี้มะเร็งประเภทอื่นที่พบที่เต้านมมีการเปลี่ยนแปลง (transformation) เป็นมะเร็งที่พัฒนาลักษณะเป็นมะเร็งชนิดอื่นอย่างชัดเจน อาทิ มะเร็งกระดูก (osteosarcoma) สำหรับประเภทของมะเร็งเต้านมชนิดเยื่อเมือกที่พบมากได้แก่ simple tubular adenocarcinoma มากที่สุด รองลงมาเป็นชนิด solid carcinoma และ complex tubular adenocarcinoma ตามลำดับ นอกจากนี้ได้พบชนิด secretory cell carcinoma จำนวน 1 รายซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่มีการสร้างสารคัดหลั่งออกมา และพบได้น้อยมากในสุนัข (Cassali et al., 1999) สัดส่วนของมะเร็งเต้านมที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกับสัดส่วนในการศึกษาของ Misdorp และคณะ (1973) ซึ่งพบประเภท solid carcinoma ได้เป็นส่วนใหญ่ (39.37%) รองลงมาได้แก่ simple papillary adenocarcinoma (23.32%) และ simple tubular adenocarcinoma (20.21%) ตามลำดับ

การตรวจสอบผลผลิตของยีน *c-erbB-2* พบว่ามีสูง 73.96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ผลผลิตจากซีพเพรสเซอร์ยีน *p21<sup>WAF1/CIP</sup>* นั้นพบเพียง 53.13 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตของยีน *c-erbB-2* ถูกตรวจพบได้ทั้งบนเยื่อเมือกเซลล์และในไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งที่กระจายอยู่ตามเยื่อเมือกของท่อเช่นเดียวกับมะเร็งเต้านมในคน แต่การติดสีมีข้อแตกต่างจากในมนุษย์ กล่าวคือ ติดสีจางกว่า ทั้งนี้เนื่องจากแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) นั้นผลิตจากโปรตีนแอนติเจนของมนุษย์ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า การศึกษาในระดับอณูชีวโมเลกุลทางการแพทย์พบว่าเกิด overexpression ของยีนได้ 10–50 เปอร์เซ็นต์ และเกิด gene amplification เพียง 15–25 เปอร์เซ็นต์ (Acenero et

al., 1997, Bánkfalvi et al., 2000, Ferrero-Poüs et al., 2000) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสามารถนำผลผลิตของยีน *c-erbB-2* มาใช้ในการจำแนกประเภทกลุ่มมะเร็งเยื่อหุ้มของเต้านมสุนัขได้ การไม่พบผลผลิตของยีนในเนื้อเยื่อเต้านมของสุนัขปกตินั้นแสดงว่า สามารถใช้การแสดงออกของยีนชนิดนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ในการเกิดมะเร็งเต้านมสุนัขได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rungsipat และคณะ (1999)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นรายงานแรกในการตรวจผลผลิตโปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมสุนัขและพบว่าผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่ตรวจพบแสดงออกที่ไซโตพลาสซึมมากกว่าในนิวเคลียส โดยโปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (ectopic  $p21^{WAF1/CIP1}$ , cytoplasmic  $p21^{WAF1/CIP1}$ , subcellular  $p21^{WAF1/CIP1}$ ) มีลักษณะเป็นแกรนูลขนาดเล็ก แต่โปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear  $p21^{WAF1/CIP1}$ ) มีลักษณะเป็นท่อนเล็ก ๆ แทรกอยู่ตามเส้นใยโครมาติน และติดสีจางกว่าส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dr. P. L. Fernandez (Department of Anatomical Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, University of Barcelona, Spain, ติดต่อส่วนตัว) ทางกายวิภาคศาสตร์ได้มีรายงานการพบ  $p21^{WAF1/CIP1}$  ในไซโตพลาสซึม โดยพบ  $p21^{WAF1/CIP1}$  ทั้งในรูปแบบ delta type สารประกอบเชิงซ้อน  $p21^{WAF1/CIP1}$  และรูปอิสระ ซึ่งในรูปแบบหลังพบได้ในช่วงต้นระยะ G<sub>1</sub> phase ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า  $p21^{WAF1/CIP1}$  มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ และโปรตีนเกิดการสะสมใหม่ที่ไซโตพลาสซึม นอกจากนี้อการผ่าเหล่าแบบการหายไปของลำดับเบสของยีน ทำให้เกิดการดื้อหรือไม่เป็นไปตามโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis-resistant phenotype) เป็นผลให้จำนวนเซลล์มะเร็งมีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยไม่ถูกทำลาย (Cai and Dynlacht, 1998; Poon and Hunter, 1998; Asada et al., 1999; Mitsui et al., 1999; Petersen et al., 1999; Nozell and Chen, 2002) นอกจากนี้รายงานทางการแพทย์ระบุว่าโปรตีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ที่พบส่วนใหญ่ในไซโตพลาสซึมและมีความสัมพันธ์กับระดับโปรตีน p53 ในไซโตพลาสซึมที่สูงขึ้น และเนื่องจากยีน p53 มีการแสดงออกในไซโตพลาสซึม

เช่นกัน (Harada et al., 1997; Kim et al., 2000) ดังนั้นอาจบ่งชี้ถึงความผิดปกติใน p53-dependent pathway ทั้งในระดับการแสดงออกของยีนตัวควบคุมหลักๆ และ subcellular localization เกิดขึ้นในช่วงการพัฒนาเป็นมะเร็ง (Kim et al., 2000, Winters et al., 2001)

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และซัพเพรสเซอร์ยีน

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> กับปัจจัยต่าง ๆ

### 1. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตจากการแสดงออกของยีน c-erbB-2 และ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าประเภทของมะเร็งไม่สัมพันธ์ต่อการตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 เช่นเดียวกับการศึกษา มะเร็งเต้านมชนิด ductal carcinoma in situ (DCIS) และ invasive ductal carcinoma และสัมพันธ์กับการกระจายแบบ intraductal spread (Jing et al., 1999, Bánkfalvi et al., 2000) สำหรับมะเร็งชนิด secretory cell carcinoma ซึ่งพบได้น้อยมาก ซึ่งมะเร็งประเภทนี้มีการสร้างสารคัดหลั่งออกมา มีลักษณะเป็นช่อง vacuole ขนาดต่าง ๆ และบรรจุในเนื้อที่เกือบทั้งหมดของเซลล์ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของยีน c-erbB-2 และระดับความรุนแรง พบว่าส่วนใหญ่พบในเกรด I ที่มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วไม่สัมพันธ์กับระดับความร้ายแรงแต่อย่างใด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาทางการแพทย์โดย Jing และคณะ (1999) ซึ่งพบว่ายีนนี้บ่งถึงพฤติกรรมที่รุนแรงของมะเร็งและสัมพันธ์กับการกระจายแบบ ท่อน้ำนม และการแพร่ไปยังหลอดเลือดและหลอดน้ำเหลือง



การศึกษาพบว่า การแสดงออกของ *c-erbB-2* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะรูปร่างของนิวเคลียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมสตรี (Bianchi et al., 1993) พบว่าการใช้ nuclear grade เหมาะในการศึกษากลุ่มย่อยของ DCIS แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการงอกขึ้นใหม่ (Hetelekidis et al., 1999)

จากการศึกษาพบว่าผลผลิตของยีน *c-erbB-2* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาใด ๆ นั้น อาจจะเป็นผลมาจาก ลักษณะ tumor heterogeneity หรือจากการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* กล่าวคือ ภายในก้อนมะเร็งนั้นสามารถพบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้มากกว่าหนึ่งชนิด ในทางการแพทย์นั้นพบว่าการแสดงออกของยีนอาจจะเกี่ยวข้องกับตัวรับจำเพาะของฮอร์โมน โดยเฉพาะเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) หรือโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor, PR) ในเซลล์ที่ทำให้ระดับโปรตีน *c-erbB-2* ไม่คงที่ (fluctuate) (Balsari et al., 1999) รวมทั้งการแสดงออกในลักษณะ overexpression ของยีนไม่สัมพันธ์กับ gene amplification และการตรวจไม่พบ ER (ER negative) หรือ PR (PR negative) ซึ่งอาจเป็นผลจากในขณะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็ง (malignant transformation) นั้น เกิด cellular dedifferentiation ในขบวนการเกิดมะเร็ง ทำให้สูญเสีย ER ไปได้ (Acenero et al., 1997, Horiguchi et al., 1998, Looi and Cheah, 1998) การศึกษาการแสดงออกของตัวรับจำเพาะต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนในเนื้องอกหรือมะเร็งเต้านมสุนัข โดยพบว่ามะเร็งเต้านมสุนัขมีการแสดงออกของตัวรับจำเพาะน้อยกว่าเนื้องอกชนิดที่ไม่ร้ายแรง (Graham et al., 1999, Nieto et al., 2000) การศึกษาถึงตัวรับจำเพาะกับฮอร์โมนเหล่านี้ในมะเร็งเต้านมสุนัขเป็นหัวข้อที่น่าสนใจ เนื่องจากจะเป็นแนวทางที่สำคัญที่จะนำไปสู่การใช้ฮอร์โมนในการรักษา ต่อไป

สำหรับผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่าโดยส่วนใหญ่มีการแสดงออกในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นลักษณะสารประกอบเชิงซ้อนกับ CDK ( $p21^{WAF1/CIP1}$  complex) มีลักษณะเป็นเม็ดแกรนูล

หรือ fragment ตามเส้นใยโครมาติน (Winters et al., 2001) การตรวจพบผลผลิตของยีนต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งบ่งถึง loss of expression และพบว่า การตรวจพบผลผลิตยีนกับประเภทของมะเร็งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะชนิด simple tubular adenocarcinoma อย่างไรก็ตามการที่ตรวจพบสารประกอบเชิงซ้อน cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ในมะเร็งนี้ แม้จะมีสมมติฐานว่าจะเป็นในลักษณะ apoptosis resistance (Asada et al., 1999, Winters et al., 2001) แต่มะเร็งเต้านมส่วนใหญ่ที่ศึกษาแสดงถึงการ loss of expression ซึ่งการแสดงออกนี้อาจจะไม่ใช่ไปตามสมมติฐานดังกล่าว โดยอาจจะเกิดการผ่าเหล่า หรือใช้แนวทางอื่นๆ ที่แตกต่างจากมนุษย์อีก ซึ่งนำทำการศึกษาต่อไปในระดับลึกเพื่อพิสูจน์แนวทางนี้

สำหรับผลผลิตของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นั้นพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกตามการแบ่งของ Jing และคณะ (1999) แต่มีความสัมพันธ์กับการพบหรือไม่พบการแสดงออก (p=0.035) ในเกรด 0 พบว่ามะเร็งส่วนใหญ่ในเกรดนี้ตรวจพบการแสดงออกของยีนได้ถึง 15.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความรุนแรงที่มากขึ้นในเกรด 1 ซึ่งเป็นเกรดที่มีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงนั้น กลับพบว่าส่วนใหญ่ (34.04%) ของกลุ่มสูญเสียการแสดงออกของยีน จนเมื่อมีการลุกลามเข้าไปในหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลืองกลับพบว่ามีการแสดงออกมากขึ้น ซึ่งโปรตีน cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นี้ อาจจะมีข้องเกี่ยวกับความร้ายแรงเมื่อเซลล์มะเร็งเริ่มเปลี่ยนแปลง ก่อนที่จะเกิดการแพร่กระจายเข้าสู่หลอดเลือดและหลอดน้ำเหลืองนั้น ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ nuclear p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ที่พบว่าการเกิดการผ่าเหล่าของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นี้พบได้น้อย แต่การศึกษาทางการแพทย์พบว่า การแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับ high tumor grade และมักตรวจพบได้ในระยะแรกๆ ของมะเร็ง (Fernández, 1998, Rey et al., 1998) Wakasugi และคณะ (1997) รายงานว่า การแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นั้นสัมพันธ์กับ low histological grade ควรศึกษาในกลุ่มย่อยเพิ่มขึ้นและตรวจปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบต่อผลผลิตการแสดงออกของยีน สำหรับ missing data จำนวน 2 รายเป็นผลจากการเก็บตัวอย่างด้วย punch biopsy ซึ่งมีขนาดเล็กเพียง

6-8 มล. และการเก็บไม่ได้เก็บจากที่บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นก้อนมะเร็งกับส่วนที่ยังเป็นเนื้อเยื่อปกติ ทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะพยาธิสภาพที่บริเวณของของก้อนมะเร็งได้

มะเร็งเต้านมส่วนใหญ่ที่ศึกษาพบว่า การแสดงออกอยู่ในรูป cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> มีความสัมพันธ์กับการพัฒนานิวเคลียสในเชิงผกผัน แต่ไม่สูงเพียงพอที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $p=0.098$ ) และเมื่อแยกระดับตามการจำแนกของ Jing และคณะ (1999) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับตำแหน่งที่ตรวจพบโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นอกจากนี้สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงออกในนิวเคลียสกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในเรื่องการพัฒนา มีรายงานทั้งในการลดและเพิ่มการแสดงออก เมื่อพบว่ามะเร็งนั้นมีลักษณะ poor differentiated (Barbareschi et al., 1996) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานว่าโปรตีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> มี ที่เกิดจากการผ่าเหล่านั้มีช่วงครึ่งชีวิต (half life) เท่าไร ซึ่งมีผลต่อการตรวจพบโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Jiang et al., 1997)

การตรวจพบแสดงออกของยีน p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ส่วนใหญ่บ่งถึง loss of expression และมีความสัมพันธ์ระดับความร้ายแรงเท่านั้นโปรตีน cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> นี้ อาจจะมีความเกี่ยวข้องในความรุนแรง เมื่อเซลล์มะเร็งเริ่มเจริญก่อนที่จะเกิดการแพร่กระจายเข้าสู่หลอดเลือดและหลอดน้ำเหลืองนั้น ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ nuclear p21<sup>WAF1/CIP1</sup> สัมพันธ์กับ high tumor grade และมักตรวจพบได้ในระยะแรกๆ ของมะเร็ง (Fernández, 1998, Rey et al., 1998)

## 2. การนับ proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดไม่มีความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของ PCNA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจากเกรด 0 จนถึง ++ ก็บ่งถึงการแสดงออกของ c-erbB-2 ว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ

ถึงกลาง ซึ่งเป็นช่วงที่เกี่ยวข้องหรืออยู่ในระยะที่กำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (Rungsipipat et al., 1999)

จากผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การนับ PCNA นั้นพบว่าไม่สัมพันธ์กัน ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งของ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> ที่พบในเซลล์นั้นส่วนใหญ่ไม่พบในนิวเคลียส เนื่องจากการแสดงออกพร้อมกันของ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> และโครงสร้างของนิวเคลียส เป็นผลจากปฏิกิริยาร่วมกับ PCNA โดยตรง การตรวจพบ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> และ PCNA ศึกษาโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบย้อมทับ พบว่าอยู่ในนิวเคลียส จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั้น p21<sup>WAF1/CIP1</sup> น่าจะถูกกำจัดออกจากนิวเคลียสขณะเซลล์เข้าสู่ S-phase เช่นเดียวกับในยีสต์ และอาจจะควบคุมการเข้าสู่ S-phase โดยขัดขวาง specific cyclin-CDKs ที่กระตุ้น S-phase (Li et al., 1996) การศึกษาทางชีวเคมี พบว่า p21<sup>WAF1/CIP1</sup> เป็นโปรตีนที่ขัดขวาง PCNA-dependent DNA replication (Mozzherin et al., 1997) จึงเป็นเหตุผลหนึ่งในการอธิบายว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การนับ PCNA ไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบโปรตีน nuclear p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Gohring et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้

การศึกษานี้พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของการนับ PCNA สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.001$ ) โดยพบว่าเมื่อระดับความรุนแรงสูงขึ้นค่าเฉลี่ยการนับก็จะสูงตามไปด้วย การศึกษาในมะเร็งเต้านมสุนัขพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p<0.001$  และพบ growth fraction สูงขึ้นตามระดับ PCNA (Löhr et al., 1997)

### 3. ปัจจัยทางคลินิก

การศึกษานี้พบว่าปัจจัยอายุ และขนาดของมะเร็งมีความเกี่ยวข้องกับผลผลิตของยีน ในแต่ละช่วงอายุจะพบการแสดงออกของยีน *c-erbB-2* มากกว่าที่จะไม่พบ และช่วงอายุเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการพบผลผลิตของยีน 18.60 เท่า (Odd ratio = 18.60) แต่สำหรับยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  นั้นพบว่าแต่ละช่วงอายุพบในสัดส่วนใกล้เคียงกันแต่ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบระดับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* มากที่สุดในกลุ่มที่มีขนาดก้อนมะเร็ง 3-5 ซม. และมากกว่า 5 ซม. เมื่อแบ่งตาม Jing และคณะ (1999) พบว่ามีความแตกต่างกับขนาดของก้อนมะเร็งที่จัดกลุ่มตามระบบ TNM system อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0315$ ) สำหรับผลผลิตของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  พบว่ามีมากในกลุ่มขนาด 3-5 ซม. และขนาดมากกว่า 5 ซม. และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0472$ ) กับกลุ่มขนาดก้อนมะเร็งโดยสัดส่วนผลผลิตมากกว่าการไม่พบในกลุ่มขนาด 3-5 ซม. ถึง 1.2 เท่า ซึ่งผลจากการศึกษามีแนวโน้มการพบผลผลิตในกลุ่มขนาด 3-5 ซม. และขนาดมากกว่า 5 ซม. ซึ่งทางการแพทย์พบว่าการตรวจพบผลผลิตชนิด nuclear  $p21^{WAF1/CIP1}$  สัมพันธ์กับขนาดที่เพิ่มขึ้น (Gohring et al., 2001)

สำหรับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ พันธุ์ เพศ รอยโรค การเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองและการแพร่กระจายทางคลินิก ไม่พบว่ามีความแตกต่างในการตรวจพบผลผลิตของยีน สำหรับในเรื่องพันธุ์สุนัขนั้น ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนชนิดนี้ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากความถี่มีการกระจาย เพราะสุนัขส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ผสม ทำให้จำนวนตัวอย่างในแต่ละชนิดของพันธุ์แท้มีน้อยจนไม่สามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ได้ ในเรื่องเพศนั้นพบว่า กลุ่มสุนัขที่ศึกษาทั้งหมดเป็นเพศเมียทั้งสิ้น ซึ่งประกอบด้วยเพศเมียปกติและเพศเมียที่ทำหมันแล้ว และพบว่าไม่สัมพันธ์กับผลผลิตของยีน *c-erbB-2* และ  $p21^{WAF1/CIP1}$  กับสุนัขทั้งสองกลุ่ม ในกรณีของสุนัขที่ทำหมันแล้ว เป็นไปได้ว่าจำนวนสุนัขในกลุ่มนี้มีจำนวนน้อยเกินไป ไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ให้เห็น

ความแตกต่าง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่ามะเร็งของเต้านมส่วนใหญ่โดยปกติแล้วจะพบในสุนัขเพศเมียเท่านั้น แต่ในระหว่างการศึกษาในโครงการนี้ได้พบสุนัขเพศผู้ 2 รายที่มีก้อนเนื้ออกของผิวหนังบริเวณ ซึ่งสามารถวินิจฉัยเป็นมะเร็งชนิดมาสต์เซลล์ที่เต้านม ในทางการแพทย์ได้มีรายงานการศึกษามะเร็งเต้านมในเพศชายซึ่งพบจำนวนน้อยมาก (Anderson and Badzioch, 1992) ลักษณะความแน่นของมะเร็งนี้ แต่พบว่าส่วนใหญ่มะเร็งเต้านมมีลักษณะแน่น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่ออ่อน ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เซลล์มะเร็งที่มีโครงสร้างค้ำจุน และพบกระดูกหรือการสะสมแร่ธาตุ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ทำให้ก้อนมะเร็งแข็งนั้นมีอยู่น้อย การเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้เคียงเต้านมที่มีก้อนมะเร็งนั้นเป็นจุดที่ควรทำการตรวจทางคลินิก ซึ่งพบได้ตั้งแต่การเพิ่มขนาดการบวม น้ำ การตกเลือด เป็นต้น นอกจากนี้ควรมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา mammogram ร่วมไปด้วย ในทางการแพทย์มีการศึกษาอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค เช่น Wakasaki และคณะ (1997) พบว่าการแสดงออกของยีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  เกี่ยวข้องกับ negative lymph node และในผู้ป่วยที่ negative lymph node นั้นพบว่าการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับขนาดก้อนมะเร็งและ PCNA ที่เพิ่มขึ้น (Gohring et al., 2001)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาการใช้ผลผลิตจากอองโคยีน *c-erbB-2* และ *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* เพื่อหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การตรวจนับการแสดงออกของ proliferation cell nuclear antigen (PCNA) และปัจจัยทางคลินิกต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสูงชันจากจำนวนตัวอย่าง 96 ราย โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ทางสถิติที่ 95 เปอร์เซนต์ จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองสรุปได้ว่า

### 1. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้ผลผลิตของอองโคยีน *c-erbB-2* และ ไซโทพลาสซึมของยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* ยังไม่เหมาะสมในการนำไปใช้พยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมสูงชัน โดยพบว่าการตรวจพบผลผลิตของยีนทั้งคู่ไม่สัมพันธ์กับปัจจัยใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาที่บ่งบอกถึงความร้ายแรงของมะเร็ง แม้ว่าระดับการแสดงออกของยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาแบ่งตาม WHO อย่างไรก็ตามอองโคยีน *c-erbB-2* สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยจำแนกประเภทมะเร็งชนิดเยื่อหุ้มได้ อีกทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเข้าใจพยาธิกำเนิดของมะเร็งเต้านมสูงชัน สำหรับผลผลิตของไซโทพลาสซึมของยีน *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* นั้น วิทยานิพนธ์นี้เป็นการรายงานการพบผลผลิตของยีนครั้งแรกในมะเร็งเต้านมสูงชัน ซึ่งตรวจพบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม และตรวจพบได้ดีในมะเร็ง well-differentiated adenocarcinoma

## 2. การตรวจนับ PCNA

งานวิทยานิพนธ์นี้พบว่า การตรวจพบผลผลิตของยีน c-erbB-2 และ ไซโทเครน เซอรีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ไม่สอดคล้องกับการตรวจนับ PCNA แต่พบว่า การตรวจนับ PCNA มีความสัมพันธ์ในเชิงแปรตามระดับความรุนแรง (malignancy grade) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้

## 3. ปัจจัยทางคลินิก

สำหรับผลการศึกษาที่ได้ในครั้ง นี้ การนำผลผลิตจากยีน c-erbB-2 และ ไซโทเครน เซอรีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  กับปัจจัยทางคลินิกนี้ไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากมีขาดข้อมูลในส่วนการศึกษาย้อนหลังมาก อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้ในด้านอายุของสุนัขป่วยและขนาดของก้อนมะเร็งควรจะมีการศึกษาต่อ

จากการศึกษาในงานวิทยานิพนธ์นี้ควรมีการศึกษาต่อไป โดยควรมีการศึกษาในมะเร็งเต้านมสุนัขในกลุ่มย่อยเพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น รวมทั้งการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบย้อนกลับ ที่จะช่วยให้ตรวจพบผลผลิตของยีนทั้งคู่ภายในเซลล์เดียวกันได้ดียิ่งขึ้น การศึกษาผลผลิตของไซโทเครน เซอรีน  $p21^{WAF1/CIP1}$  ควรทำการศึกษาในเนื้องอกเต้านมสุนัขชนิดที่ไม่ร้ายแรงเพื่อเปรียบเทียบเป็นข้อมูลเพิ่มเติม นอกจากนี้ การศึกษาผลผลิตของยีนชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับความร้ายแรงของมะเร็งเต้านมสุนัขควรจะทำต่อไปเพื่อหาประเภทที่เหมาะสม หรือรูปแบบการจัดกลุ่มการตรวจผลผลิตยีนเพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป



## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ บุญมี ศัญญสุจจารี เล็ก อิศวพลังชัย สมลักษณ์ พวงชมพู อัจฉริยา ไสละสูต และรุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช. 2544. เนื้องอกของสุนัขในเขตกรุงเทพมหานคร. บทความคัดย่อ  
เรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ 27 ประจำปี 2544 : 51.

### ภาษาอังกฤษ

- Acenero, M. J. F., Gonzalez, J. F., Ballesteros, P. A. 1997. Immunohistochemical expression of p53 and c-erbB-2 in breast carcinoma: relation with epidemiologic factors, histologic features and prognosis. Gen. Diagn. Pathol. 142(5-6) : 289-296.
- Ahern, T. E., Bird, R. C., Church, A. E. and Wolfe, L. G. 1996. Expression of the oncogene *c-erbB-2* in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. Am. J. Vet. Res. 57(5) : 693-696.
- Anderson, D. E. and Badzioch, M. D. 1992. Breast cancer risks in relatives of male breast cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 84 : 1114-1117.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S. 1999. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. EMBO J. 18 : 1223-1234.

- Balsari, A., Casalini, P., Tagliabue, E., Greco, M., Pilotti, S., Agresti, R., Giovanazzi, R., Alasio, L., Rumio, C., Cascinelli, N., Colnaghi, M. and Ménard, S. 1999. Fluctuation of HER2 expression in breast carcinomas during the menstrual cycle. Am. J. Pathol. 155(5) : 1543-1547.
- Bánkfalvi, Á., Simon, R., Brandt, B., Bürger, H., Vollmer, I., Dockhorn-Dworniczak, B., Lellé, R-J. and Boecker, W. 2000. Comparative methodological analysis of *erbB-2/HER-2* gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. Histopathol. 37 : 411-419.
- Barbareschi, M., Caffo, O., Doglioni, C., Fina, P., Marchetti, A., Buttitta, F., Leek, R., Morelli, L., Leonardi, E., Bevilacqua, G., Dalla Palma, P. and Harris, A. L. 1996. p21<sup>WAF1</sup> immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. Br. J. Cancer 74 : 208-215.
- Bargmann, C. I., Hung, M. C. and Weinberg, R. A. 1986. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. Cell. 45(5) : 649-657.
- Bedrossian, C. W. 1993. Cytopathology in Di-Cy's life time. Diagn. Cytopathol. 9(1) : 1-2.
- Bianchi, S., Paglierani, M., Zampi, G., Cardona, G., Cataliotti, L., Bonardi, R., and Ciatto, S. 1993. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. Br. J. Cancer. 67(3) : 625-629.

- Bishop, J. M. and Hanafusa, H. 1996. Proto-oncogenes in Normal and Neoplastic Cells. In J. M. Bishop and R. A. Weinberg (eds.), Scientific American: Molecular Oncology, pp. 61-83. New York : Scientific American.
- Caffo, O., Doglioni, C., Veronese, S., Bonzanini, M., Marchetti, A., Buttitta, F., Fina, P., Leek, R., Morelli, L., Palma, P.D., Harris, A.L. and Barbareschi, M. 1996. Prognostic value of p21<sup>WAF1</sup> and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. Clin. Cancer Res. 2 : 1591-1599.
- Cai, K. and Dynlacht, B. D. 1998. Activity and nature of p21<sup>WAF1</sup> complexes during the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 12254-12259.
- Carr, J. A., Havstad, S., Zarbo, R. J., Divine, G., Mackowiak, P., and Velanovich, V. 2000. The association of HER-2/*neu* amplification with breast cancer recurrence. Arc. Surg. 135(12) : 1469-1474.
- Cassali, G. D., Gobbi, H., Gartner, F. and Schmitt, F. C. 1999. Secretory cell carcinoma of the canine mammary gland. Vet. Pathol. 36 : 601-603.
- Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C. 1995. p53, through p21 (WAF1/CCIP1), induces cyclin D1 synthesis. Cancer Res. 55 : 4257-4263.
- Cooper, G. M. 1995. Chapter 13: Protein-tyrosine kinase and growth factor receptors. In Oncogene, p.203. 2<sup>nd</sup> ed. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers.
- Cooper, M. P., Balajee, A. S. and Bohr, V. A. 1999. The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair in vitro and in vivo. Mol. Biol. Cell. 10 : 2119-2129.
- Donegan, W. L. 1992. Prognostic factors: stage and receptor status in breast cancer. Cancer (supplement). 70(6) : 1755-1764.

- Donnay, I., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G. and Versteegen, J. 1996. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. Res. Vet. Sci. 60 : 251-254.
- Elledge, R. M. and Allred, D. C. 1998. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 52 : 79-98.
- Fearson, E. R. 1996. Genetic lesions in human cancer. In J.M.Bishop and R.A.Weinberg (eds.), Scientific American: Molecular Oncology., pp.143-177. New York: Scientific American.
- Ferguson, H.R. 1985. Canine mammary gland tumors. Vet. Clin. North Am. (Small Anim.Pract.). 15(3) : 501-511.
- Fernández, P.L., Jares, P., Rey, M.J., Campo, E. and Cardesa, A. 1998. Cell cycle regulators and their abnormalities in breast cancer. J. Clin. Pathol. 51 : 305-309.
- Ferrero-Poüs, M., Hacène, K., Couchet, C., Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M. and Spyrtos, F. 2000. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. Clin. Cancer Res. 6 : 4745-4754.
- Funakoshi, Y., Nakayama, H., Uetsuka, K., Nishimura, R., Sasaki, N. and Doi, K. 2000. Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. Vet. Pathol. 37:177-183.
- Gilbertson, S. R., Kurzman, I. D., Zachrau, R. E., Hurvitz, A. I. and Black, M. M. 1983. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. Vet. Pathol. 20 :1 27-142.

- Gohring, U. J., Bersch, A., Becker, M., Neuhaus, W. and Schondorf, T. 2001. p21(waf) correlates with DNA replication but not with prognosis in invasive breast cancer. J. Clin. Pathol. 54(11) : 866-870.
- Graham, J. C., O'Keefe, D. A. and Gelberg, H. B. 1999. Immunohistochemical assay for detecting estrogen receptors in canine mammary tumors. AJVR. 5 : 627-630.
- Hampe, J. F. and Misdorp, W. 1974. IX Tumours and dysplasias of the mammary gland. Bull. Wld. Hlth. Org. 50 : 111-133.
- Harada, N., Gansauge, S., Gansauge, F., Gause, H., Shimoyama, S., Imaizumi, T., Mattfeld, T., Schoenberg, M. H. and Beger, H.G. 1997. Nuclear accumulation of p53 correlates significantly with clinical features and inversely with the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in pancreatic cancer. Br. J. Cancer 76(3) : 299-305.
- Hellmén, E., Bergström, R., Holmberg, L., Spångberg, I.-B., Hansson, K. and Lindgren, A. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. Vet. Pathol. 30 : 20-27.
- Hetelekidis, S., Collins, L., Silver, B., Manola, J., Gelman, R., Cooper, A., Lester, S., Lyons, J. A., Harris and Schnitt J. R.. 1999. Predictors of local recurrence following excision alone for ductal carcinoma in situ. Cancer. 85(2) : 427-431.
- Hesketh, R. 1994. The Oncogene Handbook, pp.485-509. London: Academic Press. Harcourt Brace & Company
- Hesketh, R. 1995. The Oncogene Fact Book, pp.80-84,131-140. London: Academic Press. Harcourt Brace & Company.

- Horiguchi, J., Iino, Y., Takei, H., Maemura, M., Takeyoshi, I., Yokoe, T., Ohwada, S., Oyama, T., Nakajima, T. and Morishita, Y., 1998. c-erbB-2 status in an independent predictor of survival after first recurrence. Int. J. Oncol. 12(1) : 123-128.
- Inoue, M. and Shiramizu, K. 1999. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. J. Comp. Path. 120(2) : 169-175.
- Inoue, M. and Wada, N. 2000. Immunohistochemical detection of p53 and p21 protein in canine testicular tumours. Vet. Rec. 46 : 370-372.
- Jallaf, B. and Ullrich, A. 1995. *ErbB2*. In G. Hardie and S. Hanks (eds.) The Protein Kinase Facts Book: Protein-Tyrosine Kinase. pp.123-130. London : Academic Press, Harcourt Brace & Company.
- Jiang, M., Shao, Z., Wu, J., Lu, J., Yu, L., Yuan, J., Han, Q., Shen, Z. and Fontana, J. 1997. P21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. Int. J. Cancer (pred. Oncol.) 74 : 529-534.
- Jing, X., Kakudo, K., Murakami, M., Nakamura, Y., Nakamura, M., Yokoi, T., Yang, Q., Oura, S. and Sakurai, T. 1999. Intraductal spread of invasive breast carcinoma has a positive correlation with c-erb B-2 overexpression and vascular invasion. Cancer. 86(3) : 439-448.
- Kim, I., Kim, D., Han, S., Chin, M., Nam, H., Cho, H., Choi, S., Song, B., Kim, E., Bae, Y. and Moon, Y. 2000. Truncated form of importin  $\alpha$  identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. J. Biol. Chem. 275(30) : 23139-23145.
- Kubo, K., Matsuyama, S., Katayama, K., Tsutsumi, C., Yonezawa, K., Shimada, T., Kotani, T., Sakuma, S., Ohashi, F. and Takamori, Y. 1998. Frequent expression

of the *c-kit* proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. J. Vet. Med. Sci. 60(12) : 1335-1340.

Kumar, V., Cotran, R. S. and Robbins, S. L. 1997. Neoplasia. In, Basic Pathology, 6<sup>th</sup> ed. pp.159. Philadelphia : W.B.Saunders Company.

Leon, S. P., Zhu, J. and Black, P. M. 1994. Genetic aberrations in human brain tumors. Neurosurgery. 34(4) : 708-722.

Li, R., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. 1996. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. Curr. Biol. 6 (2) : 189-199.

Löhr, C. V., Teifke, J. P., Failing, K. and Weiss, E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. Vet. Pathol. 34 : 212-221.

Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A., Drobetsky, E. A. 1997. A p53-independent pathway for induction of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and concomitant G<sub>1</sub> arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. Cancer Res. 57 : 3390-3394.

Looi, L. M. and Cheah, P. L. 1998. c-erbB-2 oncoprotein amplification in infiltrating ductal carcinoma of breast relates to high histological grade and loss of oestrogen receptor protein. Malays J. Pathol. 20(1) : 19-23.

Masood, S. 1993. Immunocytochemistry applied to cytological specimens In .

Bedrossian, C. W. M. and Leong A. S-Y. (eds.), Applied Immunohistochemistry for Surgical Pathologist, pp. 341-376. London: Edward Arnold.

- McCann, A. H., Dervan, P. A., O'Regan, M., Codd, M. B., Gullick, W. J., Tobin, B. M. and Carney, D.N. 1991. Prognostic significance of c-erbB2 and oestrogen receptor status in human breast cancer. Cancer Res. 51 : 3296-3303.
- McGuire, W. L., Tandon, A. K., Allred, D. C., Chamness, G. C., Ravdin, P. M. and Clark, G. M. 1992. Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. Cancer (supplement). 70(6) : 1775-1781.
- Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G. and von Sandersleben, J. 1973. Canine malignant mammary tumors: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. Vet. Path. 10 : 241-256.
- Misdorp, W. and Hart, A. A. M. 1979. Canine mammary cancer: I prognosis. J.Small Anim.Pract. 20 : 385-394.
- Mitsui, K., Matsumoto, A., Ohtsuka, S., Ohtsubo, M. and Yoshimura, A. Cloning and characterization of a novel p21<sup>Cip1/Waf1</sup> interacting zinc finger protein, Ciz1. Biochem. Biophys. Res. Com. 264 : 457-464.
- Mozzherin, D. J., Shibutani, S., Tan, C., and Downey, K. M. 1997. Proliferating cell nuclear antigen promotes DNA synthesis past template lesions by mammalian DNA polymerase  $\delta$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 6126-6131.
- Moulton, J. E. 1990. Tumors of the mammary gland. In J. E. Moulton (ed.), Tumors in Domestic Animals, 3<sup>rd</sup> ed. pp. 518. Berkeley: University of California Press.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M. D., Sánchez, M. A., Flores, J. M. and Castaño, M. 2000. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. Vet. Pathol. 37: 239-247.



- Nozell, S. and Chen, X. 2002. p21B, a variant of p21(Waf1/Cip1), is induced by the p53 family. Oncogene (Abstract). 21(8) : 1285-1294.
- Ogilvie, G. H. and Moore, A. S. 1996. Managing the veterinary cancer patient, pp. 431-434. Trenton: Veterinary Learning System
- Owen, L. N. 1979. A comparative study of canine and human breast cancer. Invest. Cell Pathol. 2(4) : 257-275.
- Owen, L. N. 1980. TNM classification of tumours in domestic animals. pp.17-18. Geneva: World Health Organization.
- Pawson, T. 1996. The Biochemical Mechanisms of Oncogene Action In J.M. Bishop and R. A. Weinberg (ed.) Scientific American: Molecular Oncology, pp. 85-109. New York: Scientific American.
- Peles, E., Levy, R. B., Or, E., Ullrich, A. and Yarden, Y. 1991. Oncogenic forms of the neu/Her2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase c-gamma. EMBO J. 10 : 2077-2086.
- Poon, R. and Hunter, T. 1998. Expression of a novel form of p21Cip1/Waf1 in UV-irradiated and transformed cells. Oncogene 16: 1333-1343. (Abstract)
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C., and Marcato, P. S. 1995. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. J. Comp. Pathol. 113 : 301-313.
- Quenel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., Durand, M., Avril, A. and Coindre, J. M. 1995. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. Breast Cancer Res. Treat. 35 : 283-291.

- Rey, M. J., Fernández, P. L., Jares, P., Muñoz, M., Nadal, A., Peiró, N., Nayach, M., Mallofré, C., Muntané, J., Campo, E., Estapé, J. and Cardesa, A. 1998. p21<sup>WAF1/Cip1</sup> is associated with cyclin D1<sup>CCND1</sup> expression and tubular differentiation but is independent of p53 overexpression in human breast carcinoma. J. Pathol. 184 : 265-271.
- Ritt, M. G., Wojcieszyn, J. and Modiano, J. F. 1998. Functional loss of p21/Waf-1 in a case of benign canine multicentric melanoma. Vet. Pathol. 35 : 94-101.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N., and Hayashi, T. 1999. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. J. Vet. Med. Sci. 61(1) : 27-32.
- Sahin, A. A. 2000. Biologic and clinical significance of HER-2/neu (c-erbB-2) in breast cancer. Adv. Anat. Pathol. 7(3) : 158-166.
- Schwartz, G. F. and Schwarting, R. 1998. Clinical application of tissue and serum markers in breast cancer. In M. Hanausek, and Z. Walaszek (eds.), Tumor Marker Protocols, pp. 61-91. Totowa: Humana Press.
- Shibuya, M., Matsushima, H., Yamazaki, H., Wang, L., Fukui, Y., Ueyama, Y. and Tamaoki, N. 1987. Analysis of structure and activation of some receptor-type tyrosine kinase oncogenes. In S.A. Aaronson, J.M. Bishop, T. Sugimura, M. Terada, K. Toyoshima and Vogt P.K. (eds.), Oncogenes and Cancer: Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. , pp.195-202. Utrecht: Japan Scientific Societies Press, Tokyo/VNU Science Press.

- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. Science. 235(4785) : 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. 1989. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 244 : 707-712.
- Tarakhovsky, A., Eskelinen, M., Syrjanen, S. Lipponen, P. Pajarinen, P. and Syrjanen, K. 1991. Immunohistochemical demonstration of *c-erb B-2* oncoprotein expression in female breast cancer and its prognostic significance. Anti-cancer Res. 11 : 1677-1681.
- Wakasugi, E., Kobayashi, T., Tamaki, Y., Ito, Y., Miyashiro, I., Komoike, Y., Takeda, T., Shin, E., Takatsuka, Y., Kikkawa, N., Monden, T. and Monden, M. 1997. p21<sup>(Waf1/Cip1)</sup> and p53 protein expression in breast cancer. Am. J. Clin. Pathol. 107(6) : 1765-1774.
- Waldman, T., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G<sub>1</sub> arrest in human cancer cells. Cancer Res. 55 : 5187-5190.
- Winters, Z. E., Hunt, N. C., Bradburn, M. J., Royds, J. A., Turley, H., Harris, A. L. and Norbury, C. J. 2001. Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in breast cancer: association with prognosis. Eur. J. Cancer. 37 : 2405-2412.
- Woldman, S. R., Pauley, R. J., Mohamed, A. N., Dawson, P. J., Visscher, D. W. and Sarkar, F. H. 1992. Genetic markers as prognostic indicators in breast cancer. Cancer (supplement). 70(6) : 1765-1774.

- Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. 1993. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. Mol. Biol. Cell 4 : 897-906.
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H. and Hung, M. C. 2001. Cytoplasmic localization of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpression cells. Nature Cell. Biol. 3 : 245-252.



ภาคผนวก

แบบฟอร์มการเก็บข้อมูลจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมในสุนัข

Canine Mammary Biopsy Form

Date \_\_\_\_\_ Accession No. \_\_\_\_\_

Owner \_\_\_\_\_ Clinic No. \_\_\_\_\_

Address \_\_\_\_\_ Animal's ID or Name \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Clinician \_\_\_\_\_

Tel. \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_ Pathologist \_\_\_\_\_

Species \_\_\_\_\_ Breed \_\_\_\_\_ Sex \_\_\_\_\_ Age \_\_\_\_\_ Wt. \_\_\_\_\_ Marking \_\_\_\_\_

Clinical Diagnosis: \_\_\_\_\_

History:

Location \_\_\_\_\_ Number or mass \_\_\_\_\_

Duration of growth \_\_\_\_\_ Size \_\_\_\_\_ Shape \_\_\_\_\_ Color \_\_\_\_\_

Consistency:  soft  firm  hard Ulcer:  yes  no

Hemorrhage:  yes  no Necrosis:  yes  no Suppuration:  yes  no

Lymph node involvement:  yes  no  not examined Metastasis:  yes  no

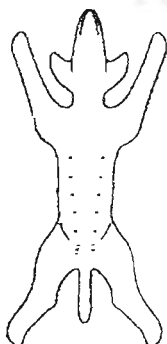
( ) ( ) ( ) ( ) ( ) Lt.

Mammary tumors; site Ant. \_\_\_\_\_ Post. \_\_\_\_\_

( ) ( ) ( ) ( ) ( ) Rt.

Gross appearance:

Diagrams: pictures, photos, layout, etc...



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสิริขจร ตั้งควัฒนา เกิดวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2513 ที่บางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2535 ในปี พ.ศ. 2537 ได้รับทุนอบรมระยะเวลา 1 ปีจากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติไปอบรม ณ ประเทศสหรัฐอเมริกาด้าน Molecular Pathology และ ปี พ.ศ. 2539 ไปดูงานการชันสูตรที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี พ.ศ. 2543 ได้รับทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน เพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาโท-เอก ภายในประเทศ จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2543 ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 6 ประจำภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย