

บทบาทของภูมิโมโนสโตเคมีต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต

นางสาวสุทธิพร นามนาค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

THE ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN DIAGNOSIS OF RENAL CELL
CARCINOMA SUBTYPES

MISS SUTTHIPORN NAMNAK

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

สุทธิพร นามนาค : บทบาทของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต
(THE ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN DIAGNOSIS OF RENAL
CELL CARCINOMA SUBTYPES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. พญ. วิภาวี
กิตติโกวิท, 75 หน้า

ที่มาและปัญหา: การวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตนั้นมีความสำคัญสำหรับแนวทางในการรักษา หากมีการระบุชนิดของมะเร็งไตได้เร็ว และถูกต้องจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วยที่มีโอกาสในการรักษามากยิ่งขึ้น และในปัจจุบันการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตจะแยกโดยดูจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเป็นส่วนใหญ่ จะมีเพียงบางรายเท่านั้นที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่กำกวมไม่สามารถแยกชนิดได้ชัดเจนที่จะได้รับการวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าหากมีการศึกษา เปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยด้วยจุลพยาธิวิทยาอย่างเดียว กับการศึกษาโดยอาศัยอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อศึกษาบทบาทของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตว่าเป็นอย่างไร

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาว่าอิมมูโนฮิสโตเคมีมีบทบาทในการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตมากน้อยเพียงใดและเพื่อศึกษาหาอุบัติการณ์ของมะเร็งไตชนิดเอ็กโซเจนิกที่วันวัน ทรานสโลเคชัน รีนอลเซลล์ คาร์ซิโนมา

วิธีการทดลอง: รวบรวมตัวอย่างของชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งไตชนิด รีนอลเซลล์ คาร์ซิโนมา (RCC) 83 ราย โดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ในรูปของ บล็อกพาราฟิน ระหว่างปี 2547-2552 ของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ด้วยการทำเป็น ทิชชู ไมโคร อาร์เร (TMA) และศึกษาด้วยการใช้แอนติบอดี 7 ชนิด คือ Vimentin, CK7, CD10, P504s, Parvalbumin, TFE3 และ CD117 เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับกรณีวินิจฉัยเดิม

ผลการทดลอง: ตัวอย่างทั้งหมด 83 ราย มี 5 รายที่การวินิจฉัยแตกต่างจากการวินิจฉัยเดิม ส่วนอีก 78 ราย ผลการแสดงออกของแอนติบอดีชนิดต่างๆคือ Vimentin มีการแสดงออกต่อ เครีียร์เซลล์ รีนอล เซลล์ คาซิโนมา (CRCC) และ แป๊ปปีลลารี รีนอลเซลล์ คาร์ซิโนมา (PRCC), CD10 มีการแสดงออกกับ CRCC ร้อยละ 82, PRCC ร้อยละ 77 และ โครโมไฟบ รีนอลเซลล์ คาร์ซิโนมา (CHRCC) ร้อยละ 50 ตามลำดับ CK7 มีผลเป็นบวก ต่อ CHRCC ในทุกราย ส่วนCRCC ผลเป็นลบร้อยละ 93, P504s มีการแสดงออกร้อยละ 88 ของ PRCC และเป็นลบร้อยละ 84 ของ CHRCC ส่วน CRCC มีผลเป็นลบร้อยละ 96, ต่อมาผลของ Parvalbumin จะมีการแสดงออกร้อยละ 32 ใน CHRCC และผลเป็นลบในทุกรายของ CRCC และ PRCC เช่นเดียวกับ CD117 มีการแสดงออกต่อ CHRCC และ ให้ผลลบใน CRCC และ PRCC ส่วนTFE3 ไม่มีการแสดงออกในการศึกษาครั้งนี้

สรุปผลการทดลอง: จากการศึกษาพบรูปแบบของการแสดงออกของ อิมมูโนฮิสโตเคมี มาร์คเกอร์ ที่สามารถช่วยในการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต โดยแนะนำให้ Vimentin, CD10 และ CK7 เป็นแอนติบอดีขั้นแรกที่จะช่วยในการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไต และใช้ CD117, Parvalbumin และ P504s เป็นแอนติบอดีที่ใช้สำหรับยืนยันผลการวินิจฉัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2555.

ลายมือชื่อ นิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5274870430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : RCC / CLEAR CELL RCC / PAPILLARY RCC / XP11 TRANSLOCATION
RCC / IHC / TFE3

SUTTHIPORN NAMNAK : THE ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN DIAGNOSIS OF
RENAL CELL CARCINOMA SUBTYPES. ADVISOR : ASST. PROF. WIPAWEE
KITTIKOWIT, M.D., 75 pp.

Background: Conventionally, renal cell carcinoma (RCC) are classified into subtypes by using morphological features. Nowadays, immunohistochemical (IHC) techniques plays an increasingly important role in the diagnosis of Renal cell carcinoma subtypes.

Objectives: To determine the validity of immunohistochemistry in classifying Renal cell carcinoma (RCC) subtypes.

Methods: Eighty-three cases of RCC were retrieved. Immunohistochemical staining of Vimentin, CD10, CK7, P504s, Parvalbumin, TFE3, and CD117 was done by using tissue microarray blocks. RCC subtypes were placed and compared with the previous diagnosis

Results: Seventy-eight of 83 cases showed agreement with the original diagnosis. Vimentin expressions were observed in Clear cell RCC (CRCC) and Papillary RCC (PRCC). Positive CD10 staining was detected in CRCC (82%) and in PRCC (77%) and Chromophobe RCC (CHRCC) (50%). CK7 was positive in 5 cases of CHRCC, and negative in 93% of CRCC. P504s was expressed in 88% of PRCC and negative in 96% of CRCC and 84% of CHRCC. Parvalbumin was expressed in 32% of CHRCC, and negative in all CRCC and PRCC. CD117 was positive in all CHRCC and negative in CRCC and PRCC. TFE3 was negative in all cases.

Conclusion: The expression patterns of the IHC markers in RCC subtypes were concluded. Vimentin, CD10 and CK7 were suggested as the first-stepped IHC markers. CD117, Parvalbumin, and P504s were suggested as the second stepped IHC markers to confirm the diagnosis.

Field of Study : Medical Sciences

Academic Year : 2012

Student's Signature

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิภาวี กิตติโกวิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำงาน รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีชา เรืองวรเวชชัย คุณจุฑามาศ วงศ์ภูมิ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่คอยให้คำแนะนำ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านเทคนิคต่างๆจนงานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวนามนาค ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and Rationale).....	1
1.2 คำถามงานวิจัย (Research Questions).....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objective).....	2
1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	3
1.5 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework).....	4
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	5
1.7 คำสำคัญ (Keywords).....	5
1.8 รูปแบบงานวิจัย (Research Design).....	5
1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application).....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of Related Literatures).....	6
2.1 ไต (Kidney).....	6
2.2 Renal Cell Carcinomas (RCCs).....	10

สารบัญ

	หน้า
2.3 Immunoprofiles of renal cell carcinoma.....	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และการทำงานวิจัย.....	34
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีในการทำงาน.....	34
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology).....	37
3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection).....	46
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	46
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	47
4.1 ผลการเปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยด้วย morphology และการใช้ Immune profile.....	47
4.1.1 ผลของแอนติบอดีแต่ละชนิดต่อการแสดงออกของ Renal cell carcinoma subtypes ที่สามารถวินิจฉัยได้ตรงกับการวินิจฉัยเดิม.....	48
4.1.2 ผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ไม่สามารถใช้ในการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตได้ตรงตามการวินิจฉัยเดิม.....	57
บทที่ 5 วิเคราะห์และสรุปผลวิจัย.....	62
รายการอ้างอิง.....	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	The 2009 TNM staging classification system.....	13
2	Type of Xp11 translocation RCC.....	22
3	Main-pathologic and genetic features of adult RCC according to the 2004 WHO classification.....	25
4	Immunoprofiles of the Major Renal Neoplasms.....	26
5	ผลของอิมมูโนฮีสโตเคมีต่อการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ.....	49
6	สรุปผลการแสดงออกของ Antibody 6 ชนิดต่อ Renal Cell Carcinoma subtypes.....	55
7	ผลของแอนติบอดีใน 5 รายที่มีความแตกต่างจากการวิจัยเดิม.....	58

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างตำแหน่งและหน้าที่หลักของอวัยวะในระบบขับถ่ายปัสสาวะ.....	6
2	แสดงตำแหน่งที่ตั้งของไตเมื่อมองจากด้านหน้า เมื่อตัดอวัยวะทางเดินอาหารและ ลวกเอาเยื่อช่องท้องออก.....	7
3	แสดงโครงสร้างภายนอกของไตเมื่อมองจากด้านหน้า.....	8
4	แสดงโครงสร้างภายในของไตเมื่อผ่าตามแกนยาวในแนวซ้าย - ขวา แสดงให้เห็น ส่วนยอดของ pyramid ที่เรียกว่า papilla เปิดเข้าสู่ minor calyx.....	9
5	แสดงความผิดปกติของไตที่เกิดก้อนเนื้ออก.....	10
6	แสดงอัตราการอยู่รอดภายในระยะเวลา 5 ปีของ Stages ต่างๆ.....	14
7	Gross presentation of Clear cell RCC.....	16
8	H&E staining of Clear cell renal cell carcinoma.....	17
9	H&E staining of Clear cell renal cell carcinoma.....	17
10	Gross specimen of papillary RCC shows a solid white mass.....	18
11	H&E staining of Papillary RCC.....	19
12	H&E staining of Papillary RCC.....	19
13	Gross, chromophobe renal cell carcinoma.....	20
14	H&E staining of chromophobe renal cell carcinoma	20
15	H&E staining of chromophobe renal cell carcinoma	20

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
16	Radical nephrectomy, Translocation renal tumor.....	23
17	(A) H&E staining of translocation RCC. (B) Histology of translocation RCC confirming with immunostaining for TFE3.....	24
18	ชุดอุปกรณ์ทำ Manual TMA block.....	34
19	Tissue block.....	39
20	สไลด์ที่ผ่านการเลือกตำแหน่งโดยพยาธิแพทย์.....	41
21	การหล่อพาราฟินบล็อก.....	42
22	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (A) (H&E staining) และการแสดงออกของ P504s ใน PRCC.....	50
23	การแสดงออกของ CD10 ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต.....	51
24	การแสดงออกของ CK7 ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต.....	52
25	การแสดงออกของ Parvalbumin ใน CHRCC.....	53
26	การแสดงออกของ Vimentin ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต.....	54
27	The microscopic feature and Immunohistochemical illustrations.....	56
28	แสดงผล IHC ในผู้ป่วยที่สามารถใช้ภูมิโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการช่วยวินิจฉัย.....	59
29	แสดงผลทาง morphology และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 1.....	60
30	แสดงผลของ H&E staining และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 3.....	60
31	แสดงผลของ H&E staining และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 4.....	60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
32	แสดงผลทาง morphology และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 5.....	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	=	คำเต็ม
TFE3	=	Transcription factor E3
CKs	=	Cytokeratins
P504s	=	α -Methylacyl Coenzyme A Racemase
CD	=	Cluster of differentiation
TMA block	=	Tissue microarray block
IHC	=	Immunohistochemistry
RCC	=	Renal cell carcinoma
CRCC	=	Clear cell or Conventional renal cell carcinoma
PRCC	=	Papillary renal cell carcinoma
CHRCC	=	Chromophobe renal cell carcinoma
H&E	=	Hematoxylin-Eosin
EDTA	=	Ethylenediamine tetra-acetic acid
DAB	=	3,3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride
H ₂ O ₂	=	Hydrogen peroxide
DW	=	Distilled water

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and Rationale)

เป็นที่ทราบกันดีว่า ไตเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญของร่างกาย ซึ่งเมื่อมีความผิดปกติของไตจะมีโอกาสนำไปสู่การสูญเสียที่รุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ง่าย และสำหรับโรคมะเร็งซึ่งเป็นเรื่องที่น่าวิตกอยู่แล้ว เมื่อมาพร้อมกับอวัยวะที่สำคัญเช่นไต ก็ยิ่งเป็นปัญหาที่สำคัญที่ยากแก่การรักษายิ่งขึ้น และหากจะกล่าวถึงมะเร็งมักจะกล่าวถึง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ แต่ปัจจุบันโรคมะเร็งไต (Renal cell carcinoma) เป็นมะเร็งอีกชนิดหนึ่งที่ควรหันมาให้ความสนใจ renal cell carcinoma เป็นมะเร็งที่พบได้ที่ renal epithelium คิดเป็นประมาณร้อยละ 2 ของมะเร็งที่พบในผู้ใหญ่ และคิดเป็นร้อยละ 90-95 ของเนื้องอกในไต [1] โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมาตรวจรักษาด้วยโรคอื่น และบังเอิญมาตรวจพบมะเร็งไต อาการที่เกิดจากมะเร็งไตอาจพบมีปัสสาวะเป็นเลือด ปวดที่เอว คล้ำเจอบริเวณที่บริเวณเอว ชีต เป็นไข้เรื้อรัง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด เป็นต้น

ในปี 2004 WHO (World Health Organization) ได้มีการแบ่งกลุ่มเป็น subtype ต่างๆ ของ renal cell carcinoma ตามลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพยาธิวิทยาได้แก่ clear cell renal cell carcinoma พบมากที่สุด RCC คิดเป็นร้อยละ 75, Papillary RCC คิดเป็นร้อยละ 10-15, Chromophobe RCC คิดเป็นร้อยละ 4-6, Collecting ducts of Bellini, Renal carcinoma unclassified คิดเป็นร้อยละ 1 ต่อมาเป็น subtype ที่สามารถพบได้น้อย ได้แก่ Multilocular cystic clear cell RCC, Renal medullary carcinoma, Carcinoma associated with neuroblastoma, Mucinous tubular and Spindle cell carcinoma และ Xp11 translocation renal cell carcinoma ซึ่งเป็น subtype ที่พบได้น้อย เป็น subtype ใหม่ที่มีการค้นพบและยอมรับเพิ่มเข้าไปใน WHO classification ของ RCC เมื่อปี 2004 [2, 20]

สำหรับการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตนั้นมีความสำคัญสำหรับแนวทางในการรักษาหากมีการระบุชนิดของมะเร็งไตได้เร็วและถูกต้องจะเป็นผลดีต่อผู้ป่วยที่มีโอกาสในการรักษามากยิ่งขึ้น และในปัจจุบันการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตจะแยกโดยดูจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

เป็นส่วนใหญ่ จะมีเพียงบางรายเท่านั้นที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่กำกวมไม่สามารถแยกชนิดได้ชัดเจนที่จะได้รับการวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าจะมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาอย่างเดียวกับการศึกษาโดยอาศัยอิมมูโนฮิสโตเคมีหลังจากได้รับการวินิจฉัยแล้วด้วยการดูลักษณะทาง morphology จะมีผลการวินิจฉัยที่เหมือนหรือแตกต่างกันหรือไม่ โดยจะศึกษาจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยการใช้จุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำมาศึกษาต่อด้วยการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดี ชนิดต่างที่มีความจำเพาะและให้ผลดีมีการได้รับการยืนยันจากหลายงานวิจัยต่อการแยกชนิดของมะเร็งไต เพื่อศึกษาว่าอิมมูโนฮิสโตเคมีมีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยมะเร็งไตมากน้อยเพียงใด [3, 49]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นเครื่องมือในการหาอุบัติการณ์ของมะเร็งไตชนิดใหม่ที่มีความน่าสนใจ มีความแตกต่างจากชนิดอื่นๆและยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยสามารถวินิจฉัยได้ยาก จึงเป็นที่มาของเหตุผลที่ต้องการศึกษา RCC ใน subtype นี้คือ Xp11 translocation renal cell carcinoma ร่วมกับการศึกษาบทบาทของอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย สำหรับการวินิจฉัย Xp11translocation RCC จากการศึกษาในหลายงานวิจัย TFE3 protein เป็นตัวหนึ่งที่น่ามาช่วยทาง immunohistochemistry แล้วสามารถยืนยันและแยก RCC ชนิด Xp11 translocation ออกจาก RCCs ชนิดอื่นๆได้ [4]

1.2 คำถามงานวิจัย (Research Questions)

การใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีจะเปลี่ยนการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตหรือไม่มากหรือน้อยเพียงใดเมื่อเทียบกับการดูลักษณะทางพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objective)

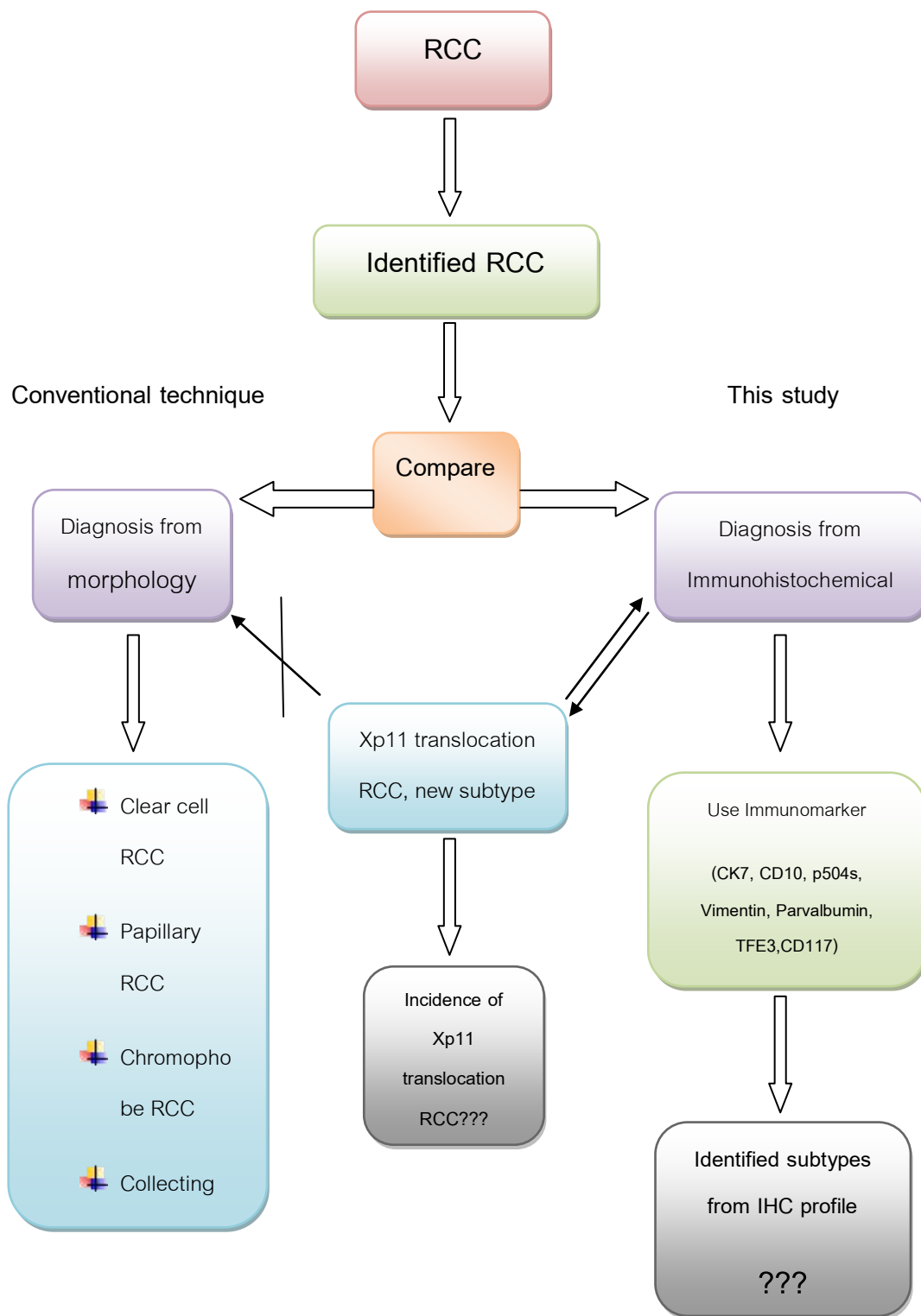
1. เพื่อศึกษาว่าอิมมูโนฮิสโตเคมีมีบทบาทในการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตมากน้อยเพียงใด
2. เพื่อศึกษาหาอุบัติการณ์ของมะเร็งไตชนิด Xp11 translocation

1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

ผู้ป่วยมะเร็งไตที่ได้รับการวินิจฉัยใน รพ.จุฬาลงกรณ์จะได้รับการวินิจฉัย ว่าเป็นชนิดย่อยชนิดใด ดูจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเป็นส่วนใหญ่มีเพียงบางรายที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่กำกวมที่จะได้รับการวินิจฉัยโดยอาศัยการย้อม IHC ร่วมด้วย การวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วย IHC ในรายอื่นที่ไม่ได้มีการย้อมมาก่อนอาจจะมีผลการวินิจฉัยที่ต่างไปจากการวินิจฉัยด้วยจุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว

การตรวจหาโปรตีน TFE3 ด้วยวิธีการทาง IHC น่าจะมีประโยชน์ในการแยกผู้ป่วยมะเร็งชนิด Xp11 translocation ออกจากชนิดอื่นๆ และสามารถหาอุบัติการณ์มะเร็งชนิดนี้ได้

1.5 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework)



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อทุกตัวอย่างผ่านการวินิจฉัยตามหลักของ WHO ปี 2004 โดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ
2. ชิ้นเนื้อจาก paraffin block ที่จะใช้ทำ Tissue microarray block ต้องผ่านการวินิจฉัยและเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษาโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ
3. ข้อมูลตัวอย่างทั้งหมดถูกปิดบังไว้สำหรับผู้ปฏิบัติงานวิจัยเพื่อป้องกันอคติในการวัดผลการทดลอง

1.7 คำสำคัญ (Keywords)

RCCs, Clear cell RCC, Papillary RCC, Chromophobe RCC, Xp11 translocation RCC, IHC, TFE3

1.8 รูปแบบงานวิจัย (Research Design)

เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study)

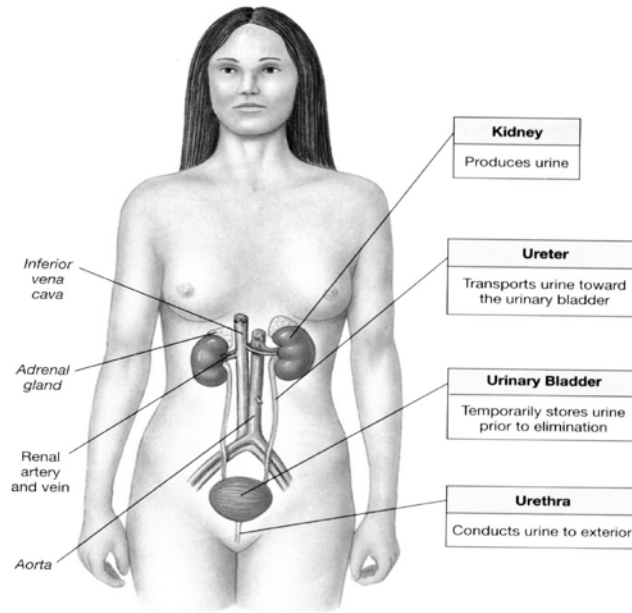
1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

1. ผลการวิจัยอาจนำไปใช้ในการอ้างอิงถึงความสำคัญของการย้อม IHC ต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต
2. ทราบอุบัติการณ์ของมะเร็งไตชนิด Xp11 translocation ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of Related Literatures)

2.1 ไต (Kidney)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างตำแหน่งและหน้าที่หลักของอวัยวะในระบบขับถ่ายปัสสาวะ [5, 7]

ไต เป็นอวัยวะหนึ่งของระบบขับถ่ายปัสสาวะ ที่มีความสำคัญที่ทำหน้าที่รักษาปริมาณของเหลวและอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ในร่างกายให้คงที่โดยการขับถ่ายของเสีย (waste product) ที่เป็นผลสืบเนื่องจากการบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ออกจากร่างกาย ระหว่างการขับถ่ายของเสียไตจะดึงเอาสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (essential material) กลับคืนเข้าสู่ร่างกายและขับเฉพาะส่วนที่เป็นของเสียซึ่งไม่มีความจำเป็นหรือเป็นผลเสียต่อการดำรงชีวิตออกไป [5] ไตจัดว่าเป็นอวัยวะที่มีหลอดเลือดเป็นจำนวนมาก (highly vascular organ) ดังนั้นปริมาณเลือดที่มาสู่ไตจึงมีมาก จากการศึกษพบว่าปริมาณเลือดที่มาสู่ไตมีมากถึง 25 % ของ cardiac output ไตทำหน้าที่สร้างน้ำปัสสาวะในลักษณะที่กรองเป็น ultrafiltrate จากเลือดออกมาก่อน ต่อจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ ultrafiltrate โดยมีการเลือกดูดกลับสารเฉพาะอย่างและเลือกขับสารบางอย่างทิ้งออกไป การทำหน้าที่เช่นนี้เป็นการทำหน้าที่ของเซลล์ต่างๆ ภายในไต ทำหน้าที่สุดท้ายที่ได้เป็นน้ำปัสสาวะ น้ำปัสสาวะจะถูกกล้ำเลี้ยงออกมาที่กระเพาะ

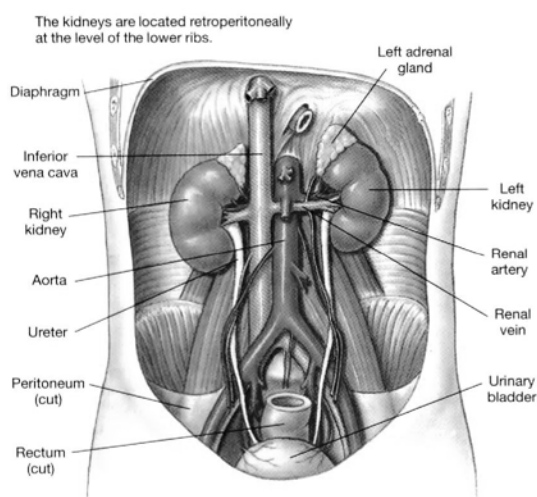
ปัสสาวะโดยทางท่อไต ที่กระเพาะปัสสาวะมีการสะสมน้ำปัสสาวะไว้จนมีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการขับถ่ายปัสสาวะต่อจากนั้นจึงมีการขับถ่ายปัสสาวะออกมาโดยผ่านทางท่อปัสสาวะ น้ำปัสสาวะที่ขับถ่ายออกมานั้นมีส่วนประกอบของน้ำและสารอิเล็กโทรไลต์ที่บางอย่างรวมทั้งของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย เช่น urea, uric acid, creatinine และ สิ่งที่เกิดจากการแตกสลายของสารประกอบหลายชนิด นอกเหนือจากการทำหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นแล้วไตยังทำหน้าที่เสมือนหนึ่งว่าเป็นต่อมไร้ท่อด้วย การทำหน้าที่ดังกล่าวได้แก่

1. การสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมน erythropoietin ซึ่งเป็น growth factor สำหรับกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูก

2. การสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ renin โดยเอนไซม์นี้เป็นตัวเริ่มต้น (initiator) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยน angiotensinogen ที่เป็น plasma protein ให้เป็น angiotensin II ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมความดันเลือดและปริมาณของเลือดในร่างกาย

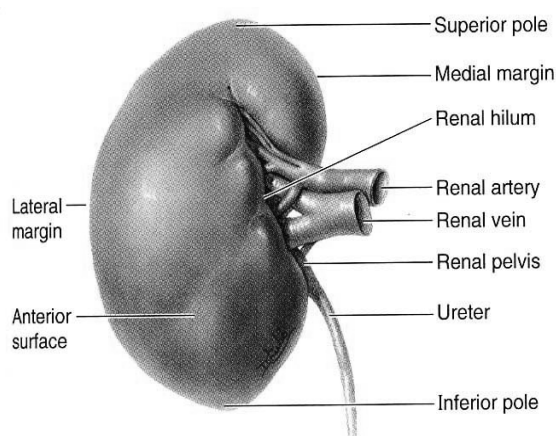
3. ทำหน้าที่ในการเติม hydroxy group (hydroxylation) ให้แก่ vitamin D ซึ่งเดิมเป็น steroid prohormone สำหรับ vitamin D ถูก hydroxylation ครั้งแรกในตับ แล้วต่อมาจึงเกิด hydroxylation อีกครั้งในไตได้ vitamin D ในสภาพ active form (1,25-(OH)₂ vitamin D)

โครงสร้างของไต (The kidney structure)



ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่งที่ตั้งของไตเมื่อมองจากด้านหน้า เมื่อตัดต่อวิถีทางเดินอาหารและลอกเอาเยื่อช่องท้องออก[5]

ไตเป็นอวัยวะคู่ อยู่ทางด้านหลังของช่องท้องและอยู่นอกเยื่อช่องท้อง (retroperitoneal organ) ขนาดอยู่ด้านข้างกระดูกสันหลังตั้งแต่ระดับอกชั้นที่ 12 จนถึงระดับเอวชั้นที่ 3 ไตจัดว่าเป็นอวัยวะที่ใหญ่ แต่ละข้างมีความยาวจากด้านบนมาด้านล่างประมาณ 10 เซนติเมตร กว้างประมาณ 6.5 เซนติเมตร (วัดจากส่วนเว้าด้านในไปหาส่วนนูนด้านนอก) และหนาประมาณ 3 เซนติเมตร หนักประมาณ 150 กรัม รูปร่างของไตคล้ายเมล็ดถั่วแดง เมื่อสดๆ มีสีแดง ไตแต่ละข้างจะมีต่อมหมวกไตวางอยู่ส่วนบน ขอบทางด้านนอกของไตมีลักษณะนูน (convex) และมีผิวเรียบ ขอบทางด้านในเป็นส่วนเว้า (concave) หันเข้าหาแนวกระดูกสันหลังและกึ่งกลางขอบด้านในมีลักษณะเป็นร่องลึก เรียกว่า hilum ที่ตรง hilum นี้เป็นทางผ่านเข้าออกของหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาทที่มาที่ไต และเป็นตำแหน่งที่มีกรวยไต (renal pelvis) ซึ่งเป็นโครงสร้างสำหรับรับน้ำปัสสาวะที่กรองได้จากไตให้ไหลลงปัสสาวะท่อไต (ureter) ในร่อง hilum นี้ ยังมี loose connective tissue และ adipose tissue อัดตัวอยู่จนเต็ม เรียกส่วนที่มี loose connective tissue และ adipose tissue นี้ว่า renal sinus [5, 6]

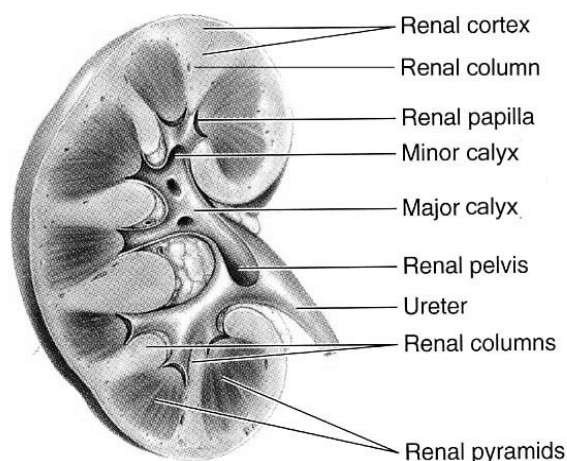


ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างภายนอกของไตเมื่อมองจากด้านหน้า [6]

ไตอยู่ในเยื่อหุ้มสามชั้นนับจากข้างนอกเข้าไปข้างในคือ ชั้นนอกสุดเรียกว่า renal fascia ทำหน้าที่ยึดไตให้ติดกับผนังท้องทางด้านหลัง ชั้นกลางเรียกว่า adipose capsule เป็นชั้นไขมันที่หนาทำหน้าที่ดูดซับแรงกระแทก ระเเทือนต่อไต ชั้นในสุดเรียกว่า renal capsule เป็นชั้นอยู่ชิดติดผิวภายนอกเนื้อไต เป็น dense fibrous connective tissue ที่บางและเหนียว ในส่วนของชั้น renal capsule สามารถแบ่งออกได้เป็นสองชั้นย่อย คือ ชั้นนอกเป็นชั้นของ fibroblast และ collagen fiber ส่วนชั้นในเป็นชั้นของ myofibroblast เชื่อว่าการหดตัวของ myofibroblast มีส่วนช่วยในการควบคุม

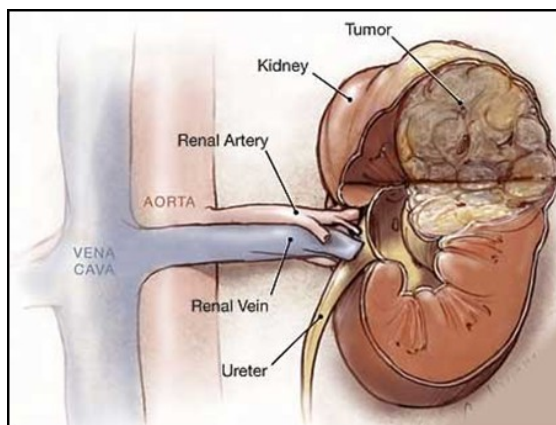
ปริมาณและความดันเลือดภายในไตด้วย ชั้น renal capsule หุ้มติดผิวนอกเนื้อไตเข้าไปใน renal hilum และเป็นส่วนประกอบของ connective tissue ที่บริเวณลึกลงของ renal sinus และเข้าไปเป็นผนังของ renal pelvis รวมทั้งเป็นผนังของ renal calyx ด้วย [6]

ถ้าผ่าไตสดออกเป็นสองซีกตามแกนยาว จะเห็นเนื้อไตมีส่วนที่แตกต่างกัน 2 ส่วนคือ บริเวณด้านนอกของเนื้อไตมีสีน้ำตาลแดงเรียกว่า renal cortex และบริเวณด้านในมีสีจางกว่า เรียกว่า renal medulla เหตุที่ renal cortex มีสีแดงเป็นเพราะว่ามีเลือดผ่านบริเวณนี้ประมาณ 90-95% ในขณะที่มีเลือดผ่านส่วน renal medulla เพียง 5-10% เท่านั้น ที่บริเวณ renal medulla จะเห็นโครงสร้างเป็นรูปสามเหลี่ยมคล้ายพีระมิด (pyramid) จึงเรียกว่า renal pyramid ซึ่งมีอยู่ประมาณข้างละ 6-12 อัน ฐานของพีระมิดนี้ชี้ไปทาง renal cortex และเป็นบริเวณรอยต่อระหว่าง cortex กับ medulla (corticomedullary border) ด้วย ส่วนยอดแหลมของพีระมิดชี้เข้าหา renal hilum เรียกยอดแหลมนี้ว่า renal papilla ที่ renal papilla นี้มีรูของหลอดไตที่มีชื่อว่า papillary duct (duct of Bellini) ประมาณ 20 หลอดมาเปิดออก ทำให้เกิดเป็นรูพรุนที่ปลายยอดแหลมของพีระมิด เรียกว่า area cribrosa นอกจากนี้ที่บริเวณกึ่งกลางของไตทางด้านในชิดกับ hilum จะมีโพรงกรวยไต (renal pelvis) ซึ่งไปงอกออกเป็นแฉ่งๆ เรียกว่า major calyx จำนวน 3-5 แฉ่ง แต่ละแฉ่งมีส่วนที่ยื่นออกคล้ายกรวยเล็กๆ เรียกว่า minor calyx 2-3 อัน สวมเข้ากับปลายของ renal papilla [7]



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างภายในของไตเมื่อผ่าตามแกนยาวในแนวซ้าย-ขวา แสดงให้เห็น ส่วนยอดของ pyramid ที่เรียกว่า papilla เปิดเข้าสู่ minor calyx [6]

2.2 Renal Cell Carcinomas (RCCs)



ภาพที่ 5 แสดงความผิดปกติของไตที่เกิดก้อนเนื้อออก [9]

2.2.1 Definition และ Etiology

Renal cell carcinomas เป็นกลุ่มของมะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของเนื้อเยื่อ epithelium ในส่วนของ renal tubules ที่ก่อให้เกิดมะเร็งขึ้นในไต 90% ของมะเร็งที่ไต และคิดเป็นประมาณ 2% เมื่อเทียบกับมะเร็งทั้งหมด [8] ลักษณะที่พบได้ทั่วไป คือเป็นก้อนแข็งอยู่ภายในไต จะสามารถแบ่งชนิดย่อยของ RCCs ได้จากลักษณะที่จำเพาะของ histopathological และลักษณะทาง genetic [9] RCCs จะเกิดขึ้นในผู้ใหญ่ ได้ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย [2] อัตราการเกิดระหว่างหญิงและชายอยู่ที่ประมาณ 1:1.5 ช่วงอายุที่พบอุบัติการณ์มากที่สุดคือระหว่างอายุ 60-70 ปี [10, 11, 12] อุบัติการณ์เกิดของ RCCs จะต่ำใน African และ Asian แต่ใน Latin America ประมาณช่วงปี 1995 ได้มีการบันทึกไว้ว่าเป็นหนึ่งในทวีปที่มีอัตราการเกิด RCCs สูงที่สุดในโลก มีอัตราที่สูงทั้งประชากรชายและหญิงที่มีการรายงานใน Czech Republic ว่าในทุกๆ ปีจะมีผู้ป่วยรายใหม่ 10-20 รายต่อประชากร 100,000 คน และมีรายงานอัตราการเกิดที่ต่ำสุดอยู่ที่ 1 รายต่อประชากร 100,000 คนเช่นกัน นอกจากนั้นเมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานว่า มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นประมาณ 2% เกือบทุกปีทั้งทั่วโลกและในยุโรป ในปี 2006 พบผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 63,300 ราย ของ RCCs และประมาณ 26,400 ราย ที่เสียชีวิตใน European Union ซึ่งอัตราการเสียชีวิตในยุโรปมีอัตราที่สูงขึ้นเมื่อประมาณปี 1990s ที่ผ่านมา [13] สำหรับอุบัติการณ์ในประเทศไทยมีรายงานว่า ในปี 1990 มีผู้ป่วยถูกวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งของไตในประเทศไทย 462

ราย ในปี 1995 ผู้ป่วยถูกวินิจฉัยเป็นมะเร็งของไตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 10 ราย โดยอายุโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยอยู่ระหว่าง 50-60 ปีจะพบผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 40 ปีน้อย อุบัติการณ์ของ RCCs จะเพิ่มขึ้นสำหรับผู้ที่มีอายุ 40 ปีขึ้นไปที่จะเกิดความผิดปกติของ epithelial tumors [14]

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง สาเหตุส่วนใหญ่มักเกิดจากการสูบบุหรี่อย่างน้อยที่สุดคิดเป็น 39% ในจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่เป็นชาย [15] การได้รับ carcinogenic สารก่อมะเร็งจำพวก สารประกอบโลหะหนักเช่น แคดเมียม, ตะกั่ว ในกระบวนการอุตสาหกรรมหรือการปนเปื้อนในน้ำดื่ม เป็นปัจจัยเสี่ยงคิดเป็น 30% ที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และสำหรับสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและที่อยู่อาศัยก็มีความเป็นไปได้ที่จะเป็น carcinogens ก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับไตได้ แต่ยังไม่มีความสามารถยืนยันได้แน่ชัด นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาใน hamster ปรากฏว่า steroidal estrogens และ nonsteroidal diethylstilboestrol สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกได้ใน hamster แต่ยังไม่มียางานในมนุษย์ [16] ส่วนของ hormone estrogens ก็มีผลในกลไกการเหนี่ยวนำการเกิด RCCs ในผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินหรือคนอ้วน จากการศึกษาทางโรคระบาดวิทยาทั้งแบบ prospective และ retrospective พฤติกรรมต่างๆของประชากรที่แตกต่างกันมีผลต่อปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งที่ไตได้เช่น การเพิ่มขึ้นของค่า Body Mass Index (BMI) ซึ่งจะเกี่ยวกับค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอุบัติการณ์เกิดของ RCCs ในผู้ป่วยที่น้ำหนักมาก ($BMI > 29 \text{ kg/m}^2$) มีโอกาสจะเพิ่มสูงเป็นสองเท่า หรือเท่ากับ 50% เมื่อเทียบกับคนที่มีค่า BMI ปกติ และอุบัติการณ์เกิดของ RCCs จะมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่เพิ่มขึ้นในประชาชนที่มีประวัติของ blood hypertension ที่อาจเป็นผลทางอ้อมที่เกิดจากภาวะอ้วนและการสูบบุหรี่ [17, 18, 19]

2.2.2 Prognostic factor

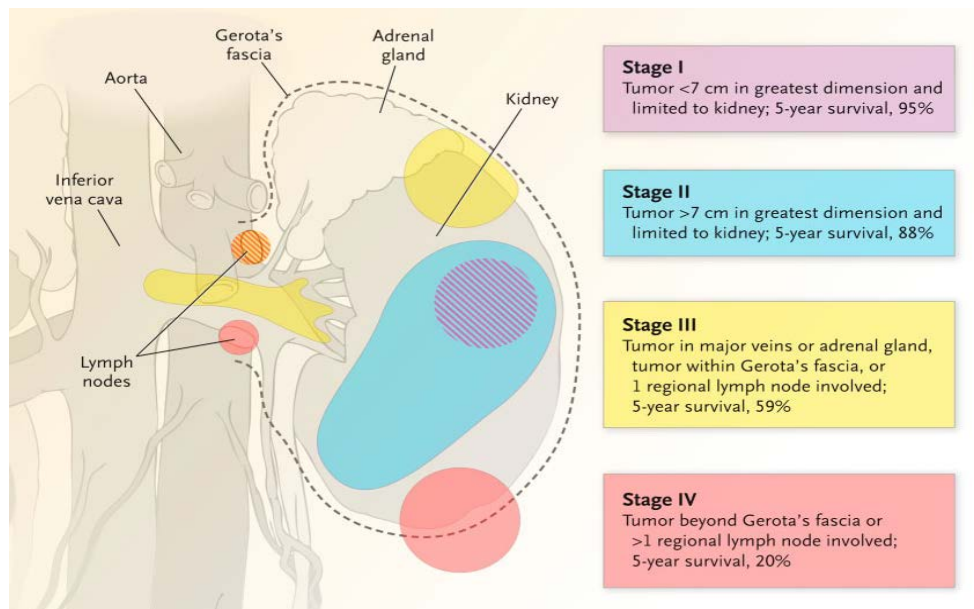
ปัจจัยที่เปรียบเสมือนเครื่องมือสำหรับการช่วยในการทำนายโรคและแบ่งชนิดของมะเร็งไตได้ อาจจะสามารถประกอบไปด้วยการใช้ลักษณะทาง anatomical, histological, clinical, และทาง molecular อย่างเช่นลักษณะทาง anatomical เป็นการศึกษาจากลักษณะทางกายวิภาค เช่น การดูขนาดของเนื้องอก ดูการแพร่ไปเส้นเลือด renal capsule หรือ lymph node และการดูจากการ metastasis ซึ่งวิธีที่มีการใช้กันและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปคือ ใช้ TNM staging classification system(ตารางที่ 1) สำหรับการศึกษากายวิภาค เป็นปัจจัยที่ใช้ในการแยกชนิดหรือ

subtypes ของ RCCs, ใ้ดู sarcomatoid features, microvascular invasion, tumour necrosis และดูการเกิด invasion ของ collecting system เป็นต้น และจากที่ได้กล่าวมาถึงลักษณะทาง histological นั้น World Health Organization (WHO) classification [20] ได้สรุปลักษณะ โครงสร้างทางพยาธิวิทยา 3 ชนิดหลักที่พบได้บ่อยของ RCCs คือ Clear Cell ; (CRCC, 75-80%), Papillary ; (PRCC, 10-15%) และ Chromophobe ; (CHRCC, 4-5%) ตามลำดับ โดย RCCs แต่ละชนิดสามารถแยกความแตกต่างได้จากลักษณะทาง histological และทาง molecular genetic changes (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 The 2009 TNM staging classification system [21]

T-	Primary tumour
TX	Primary tumour cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour
T1	Tumour ≤ 7 cm in greatest dimension, limited to the kidney
T1a	Tumour ≤ 4 cm in greatest dimension, limited to the kidney
T1b	Tumour > 4 cm but ≤ 7 cm in greatest dimension
T2	Tumour > 7 cm in greatest dimension, limited to the kidney
T2a	Tumour > 7 cm but ≤ 10 cm in greatest dimension
T2b	Tumour > 10 cm limited to the kidney
T3	Tumour extends into major veins or directly invades adrenal gland or perinephric tissues but not the ipsilateral adrenal gland and not beyond Gerota's fascia
T3a	Tumour grossly extends into the renal vein or its segmental (muscle-containing) branches or tumour invades perirenal and/or renal sinus (peripelvic) fat but not beyond Gerota's fascia
T3b	Tumour grossly extends into the vena cava below the diaphragm
T3c	Tumour grossly extends into vena cava above the diaphragm or invades the wall of the vena cava
T4	Tumour invades beyond Gerota's fascia (including contiguous extension into the ipsilateral adrenal gland)
N-	Regional lymph nodes
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in a single regional lymph node
N2	Metastasis in more than 1 regional lymph node

M-	Distant metastasis		
M0	No distant metastasis		
M1	Distant metastasis		
TNM stage grouping			
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stage IV	T4	Any N	M0
	Any T	N2	M0
	Any T	Any N	M1



ภาพที่ 6 แสดงอัตราการอยู่รอดภายในระยะเวลา 5 ปีของ Stages ต่างๆ [22]

2.2.3 Clinical features

อาการและอาการแสดงที่แสดงให้เห็นได้แก่ hematuria (ปัสสาวะเป็นเลือด), pain (ปวด) และ flank mass ซึ่งถือว่าเป็นอาการสำคัญที่จะแสดงให้เห็นใน RCCs ที่เรียกว่า classic triad แต่ในจำนวนนี้ประมาณ 40% ของผู้ป่วยอาจจะแสดงอาการให้เห็นไม่ครบทั้งหมด และอาการทางระบบร่างกายที่จะแสดงให้เห็นเช่น น้ำหนักตัวลดลง (weight loss), ปวดท้อง (abdominal pain), ไม่อยากรับประทานอาหาร (anorexia) และเป็นไข้ (fever) [23] มีอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงประมาณ 50% ของผู้ป่วย เกิดภาวะซีดโลหิตจางจากภาวะ hematuria ประมาณ 33% ของผู้ป่วย เกิดภาวะ Hepatosplenomegaly, coagulopathy จากภาวะความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ serum alkaline phosphatase, transaminase และ alpha-2 globulin RCCs ยังนำไปสู่การเกิด para neoplastic endocrine syndromes ประกอบด้วย humoral hypercalcemia of malignancy, erythrocytosis, hypertension และ gynecomastia นอกจากนี้มีอาการอื่นที่สามารถพบได้เช่น Cushing's syndrome, nephritic syndrome, amyloidosis และ dysfunction without metastases (Stauffer's syndrome) เป็นต้น สำหรับการดูลักษณะ imaging เทคนิคในเบื้องต้นอาจใช้หลักการทาง Radiological การใช้ Ultrasonography จะสามารถเห็น renal lesions หรือการใช้ CT scan ก่อนที่จะได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเบื้องต้น

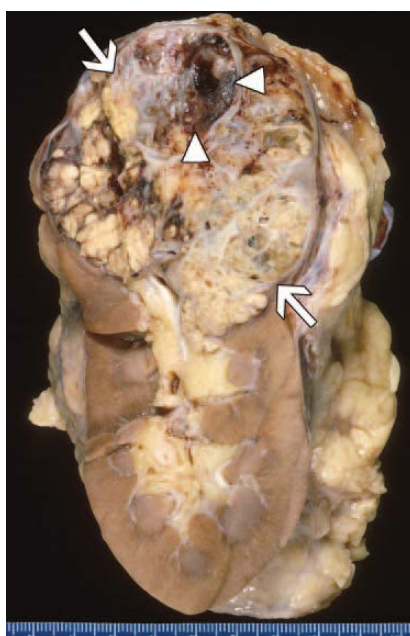
2.2.4 Renal cell carcinoma subtypes

1. Conventional (Clear cell) renal cell carcinoma

Clear cell RCC (CRCC) เป็นมะเร็งในกลุ่มของ Renal cell carcinoma ที่มีการพบมากที่สุดประมาณ 75-80% ของมะเร็งไต เมื่อเทียบกับชนิดย่อยอื่น เซลล์ของ CRCC จะมีลักษณะไฮโดพลาสซึมใสหรือ eosinophilic ภายในระบบของ vascular network นอกจากนี้ CRCC ยังมีการเรียกชื่ออีกชื่อคือ "granular cell renal cell carcinoma" [24]

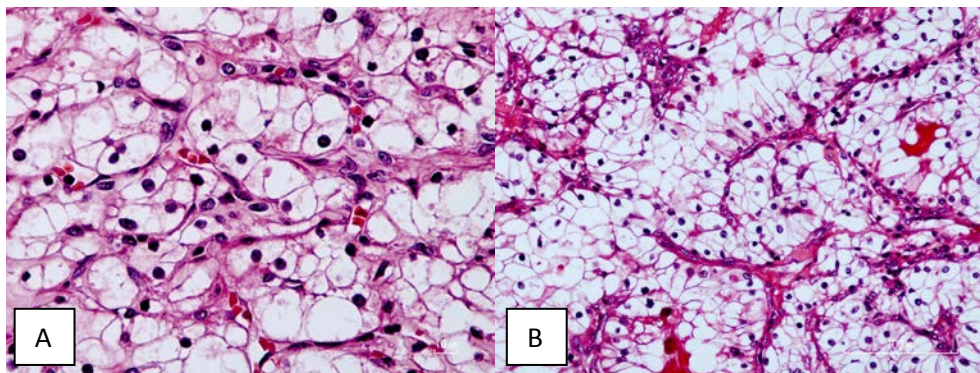
ลักษณะทาง macroscopy ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าคือ จะเห็นเป็นก้อนเดี่ยวๆ ผิวของก้อนเนื้องอกจะเป็น "pushing margin" และ pseudocapsule ขนาดเฉลี่ยของก้อนเนื้องอกจะอยู่ที่ประมาณ 7 เซนติเมตร ขนาดของเนื้องอกไม่สามารถที่จะระบุบอกได้ว่าจะเป็นเนื้อ

งอกชนิด malignant จะขึ้นอยู่กับการเกิด metastases มากกว่า แต่เนื้องอกของไตแบบ clear cell ทั้งหมดต้องมีการค้ำึงถึงเนื้องอกชนิด malignant เสมอเพราะมีโอกาสเกิดขึ้นได้มาก ลักษณะของก้อนเนื้องอกชนิด CRCC ที่พบได้คือ golden yellow เพราะภายในเซลล์จะเต็มไปด้วย lipid อย่าง cholesterol, neutral lipids และ phospholipids ที่อุดมสมบูรณ์ นอกจากนั้นยังสามารถพบ Cysts, necrotic, haemorrhage และ calcification ซึ่งจะพบได้บริเวณไซนที่เกิดการ necrosis จะเป็นลักษณะทั่วไปที่พบได้ [25, 26]



ภาพที่ 7 Gross presentation of Clear cell RCC, shows variegated nodular growth with areas of hemorrhage and necrosis. [25, 65]

ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่สามารถมองได้จากกล้องจุลทรรศน์เซลล์ของ CRCC จะมีลักษณะไฮโดพลาสซึมใสหรือ eosinophilic ภายในระบบของ vascular network จะมีลักษณะที่หลากหลายทั้งแบบ solid, alveolar และ acinar patterns เซลล์มะเร็งจะอยู่ตามผนังหลอดเลือดลักษณะต่างๆเหล่านี้พอจะเป็นตัวช่วยในการวินิจฉัยของมะเร็งชนิดนี้ได้ จะไม่มี lumens ภายในของ alveolar แต่บริเวณตรงกลาง และช่องว่างรอบ lumens จะเต็มไปด้วย light acidophilic serous fluid หรือ erythrocytes ใน acinar pattern



ภาพที่ 8-9 H&E staining of Clear cell renal cell carcinoma. Eosinophilic cytoplasm of CRCC (hematoxylin-eosin, กำลังขยายต้นฉบับ; A (400x), B (200X))

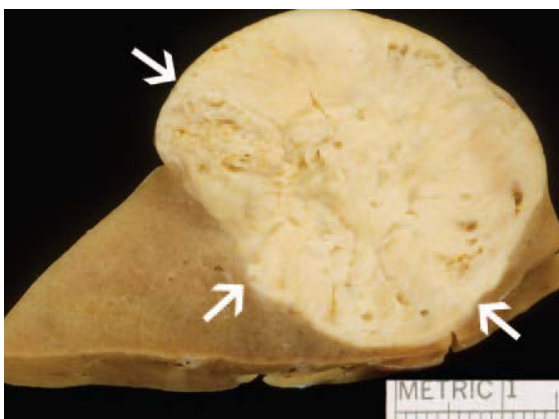
สำหรับข้อมูลทาง genetics ของ CRCC ส่วนมากจะเกิดจากการ deletions ของ โครโมโซม 3p และประมาณ 34-56% [27] เกิดจากการ mutations ของ VHL gene ทางด้านของ ข้อมูลทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CRCC มีความถี่ในการแสดงออกกับแอนติบอดีจำพวก brush border antigens, low molecular weight cytokeratins อย่างเช่น CK8, CK18, CK19, AE1, Cam 5.2 และ Vimentin สำหรับ high molecular weight cytokeratin จะแสดงออกกับ CK14 ส่วนแอนติบอดีตัวหลักที่ positive สำหรับ CRCC marker คือ CD10 และ epithelial membrane antigen

2. Papillary renal cell carcinoma

Papillary renal cell carcinoma (PRCC) เป็นมะเร็งไตที่เกิดจากเนื้องอกของ parenchymal โครงสร้างของเซลล์จะมีลักษณะเป็นแบบ papillary หรือ tubulopapillary โดย PRCC จะพบได้ประมาณ 10% ของ RCCs [28, 29] ช่วงอายุ เพศและอาการโดยทั่วไปของมะเร็งไตชนิดย่อยนี้จะใกล้เคียงกับชนิด CRCC คือ จะเกิดในผู้ใหญ่เป็นส่วนใหญ่ โดยไม่แน่นอนมันได้มี รายงานอายุโดยเฉลี่ยทั้งชายและหญิงอยู่ที่ประมาณ 52-66 ปี ส่วนอัตราการเกิดระหว่างเพศชาย และเพศหญิงอยู่ที่ประมาณ 1.8 : 1 ถึง 3.8 : 1 ตามลำดับ [28, 30, 31]

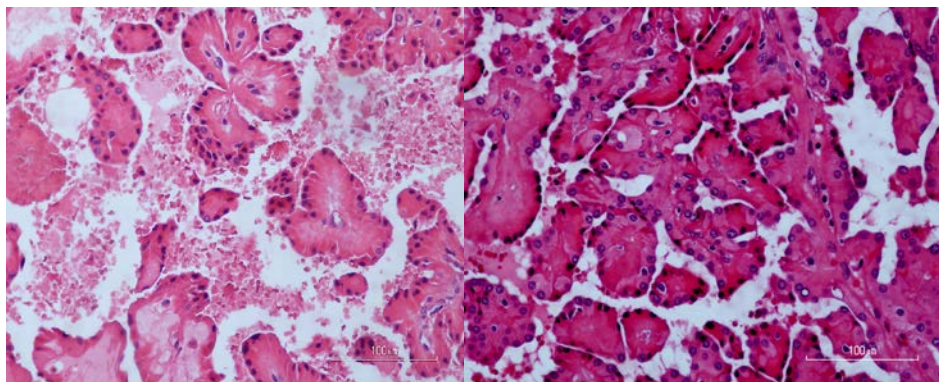
ลักษณะทาง macroscopy ที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าคือ บริเวณก้อนเนื้อ ออกจากจะเห็น haemorrhage, necrotic การเปลี่ยนแปลงกลายเป็น cystic และบริเวณรอบก้อนเนื้อ

งอกจะมีการสร้างถุงหุ้มมีลักษณะเป็น pseudocapsule ใน PRCC จะเกิด bilateral และ multifocalของเนื้องอก ที่เด่นชัดกว่ามะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่อ parenchymal ของไตชนิดอื่นๆ [32, 33]



ภาพที่ 10 Gross specimen of papillary RCC shows a solid white mass. [33, 65]

PRCC มีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่สามารถมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ โครงสร้างเซลล์มะเร็งของ epithelial cells จะมีการจัดตัวเป็น papillae คล้ายนิ้วมือ และ tubules เนื้องอกที่มีลักษณะเป็น cysts จะมีการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติกลายเป็น papillary ให้เห็นได้ [29, 34, 35] และเนื้องอก papillae จะมีลักษณะของ fibrovascular core มีการรวมตัวของ foamy macrophages และมีลักษณะของ cholesterol crystals แสดงให้เห็นได้ โดยลักษณะทาง morphology ของ PRCC จะแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือชนิดที่ 1 หรือ type 1 มะเร็งจะมีลักษณะของ papillae ที่ถูกปกคลุมด้วยเซลล์ขนาดเล็ก เกือบจะไม่เห็นไซโตพลาสซึม มีการจัดตัวในชั้นเดียวที่เป็น single layer บน papillary basement membrane ส่วนชนิดที่ 2 หรือ type 2 เซลล์มะเร็ง มักจะเป็นลักษณะของ high nuclear grade กับ eosinophilic cytoplasm และ pseudostratified nuclei บน papillary cores



ภาพที่ 11-12 H&E staining of Papillary renal cell carcinoma, Papillary RCC shows a monolayer of small cells with scanty cytoplasm. (H&E staining; กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

สำหรับข้อมูลทาง genetics ของ PRCC ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทาง karyotype ที่สามารถพบได้บ่อยคือ การเกิด trisomy หรือ tetrasomy ของโครโมโซมคู่ที่ 7 การเกิด trisomy ของโครโมโซมคู่ที่ 17 และการหายไปของโครโมโซม Y ทางด้านข้อมูลทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ PRCC นั้น Cytokeratin 7 จะมีการแสดงออกได้ดีสำหรับ PRCC [36] นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยอีกหลายงานที่แสดงให้เห็นว่ามีแอนติบอดีอีกตัวหนึ่งที่แสดงออกได้ดีกับ PRCC คือ P504s หรือ AMACR [37]

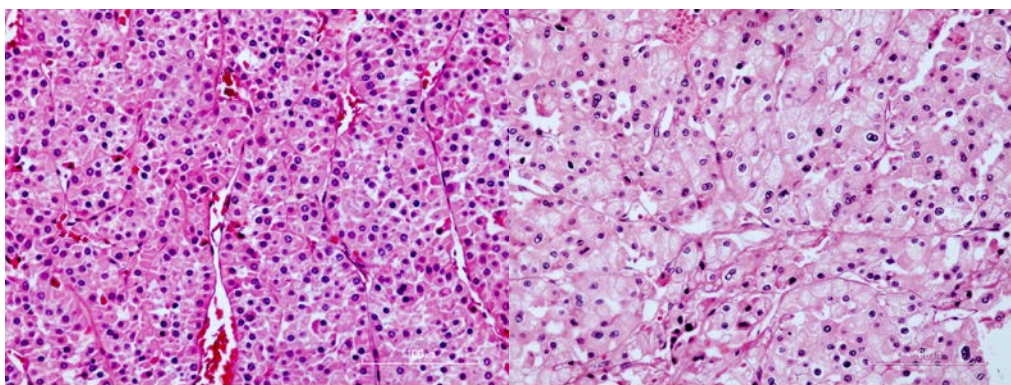
3. Chromophobe renal cell carcinoma

Chromophobe renal cell carcinoma (CHRCC) มีลักษณะโครงสร้างคือ เซลล์มีขนาดใหญ่มีสีซีดจาง มีลักษณะเซลล์เมมเบรนที่เด่นชัด โดย CHRCC จะพบได้ประมาณ 4-5% ของมะเร็งไตในกลุ่ม RCCs อุบัติการณ์เกิดของอายุอยู่ที่ประมาณ 60 ปี ทั้งในเพศชายและเพศหญิง มีอัตราการเสียชีวิตน้อย 10% [38] อาการทางคลินิกของ CHRCC ไม่มีอาการที่เฉพาะ โดยส่วนมากจะพบเป็นก้อนเนื้อออกขนาดใหญ่ ไม่มี necrosis หรือ calcifications ลักษณะทาง macroscopy ของ CHRCC ที่พบได้คือ จะมีขอบเขตของก้อนแข็ง บริเวณของผิวหน้าของเนื้อออกจะมีลักษณะเป็นพู่ ลอนๆ เมื่อผ่าเนื้อออกจะเห็นคุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งคือ ก้อนเนื้อออกจะมีสี light brown หรือ tan light grey หลังจากผ่านการ fixation ด้วย formalin



ภาพที่ 13 Gross, chromophobe renal cell carcinoma, shows an expansile mass with a solid yellow brown cut surface. [20, 65]

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ CHRCC คือ เซลล์จะมีรูปร่างหลายเหลี่ยมขนาดของเซลล์มีขนาดใหญ่ลักษณะโปร่งแสงไซโตพลาสซึมติดต่อกันเป็นร่างแห มีขอบเขตของเซลล์เมมเบรนที่เด่นชัดเซลล์มีขนาดไม่สม่ำเสมอ มีการพับของนิวเคลียส บางครั้งก็มีลักษณะนิวเคลียสเป็นแบบ binucleate นอกจากนี้ยังพบ nucleolus มีขนาดเล็ก รอบๆนิวเคลียสจะเห็นเป็นเหมือนมีรัศมีแผ่ออกไป



ภาพที่ 14-15 H&E staining of chromophobe renal cell carcinoma, eosinophilic variant, binucleated and perinuclear halos cells. (H&E staining; กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

ทางด้าน genetics ของ CHRCC โดยส่วนมากจะเกิดจากการ loss หรือการขาดหายไปของโครโมโซมคู่ต่างๆ ซึ่งโครโมโซมที่มีความถี่ในการขาดหายไปอย่างเช่น โครโมโซมคู่ที่ -1,

-2, -6,-10,-13,-17, และ -21 เป็นต้น ส่วนข้อมูลทางอิมมูโนฮิสโตเคมีของ CHRCC มีการแสดงออกแตกต่างกันไปแต่ละแอนติบอดี เช่น Cytokeratin มีผลเป็น positive, Vimentin ให้ผล negative, EMA ผลเป็น positive แบบ diffuse, Parvalbumin ผล positive, RCC antigen มีทั้ง positive และ negative และชนิดสุดท้าย CD10 ให้ผลเป็น negative [39, 40, 41]

4. Xp11 translocation renal cell carcinoma (RCC)

ในปี 2004 WHO ได้มีการเปลี่ยนแปลงการจัดกลุ่มของ RCCs ขึ้นใหม่เพื่อเพิ่มความเข้าใจใหม่ที่ได้จากการศึกษาและเป็นข้อมูลที่มีความทันสมัยเพิ่มขึ้น Xp11 translocation RCC จึงได้รับการยอมรับและถูกจัดเข้าไปในกลุ่มของ RCCs

สำหรับ Xp11 translocation RCC คือลักษณะของการเกิด translocation ของ chromosome Xp11 ซึ่งเกิดจากผลของการ fusion ของ genes ตัวหนึ่งคือ TFE3 translocation factor gene โดยเริ่มแรกพบการ fusion ของ TFE3 gene เป็นลักษณะของ alveolar soft part sarcoma (ASPS) ใน ASPL-TFE3 fusion gene เป็นตัวแรก หลังจากนั้นได้มีการศึกษาในคนไข้เพิ่มมากขึ้น พบว่าพบลักษณะของ chromosomal breakpoints ของทั้ง 2 gene บริเวณ Xp11 และใน 17q25 และได้มีการระบุว่า เป็นผลของ ASPL-TFE3 gene fusion เช่นกัน แต่ลักษณะของ ASPS และ ASPL-TFE3 ที่มีการ breakpoints ของ chromosomal บริเวณ Xp11 และ 17q25 มีลักษณะ phenotypes ที่แตกต่างกันเพราะ ASPS t(x; 17) เป็นการ translocation ที่ไม่สมดุล (unbalanced) [der(17) t(x; 17) (p11.2; q25)]; ซึ่งตรงกันข้ามกับ t(x; 17) เป็นการ translocation ที่สมดุล (balanced) ใน ASPL-TFE3 RCC [t(x;17) (p11.2; q25)] [42]

ตารางที่ 2 Type of Xp11 translocation RCC [42, 45]

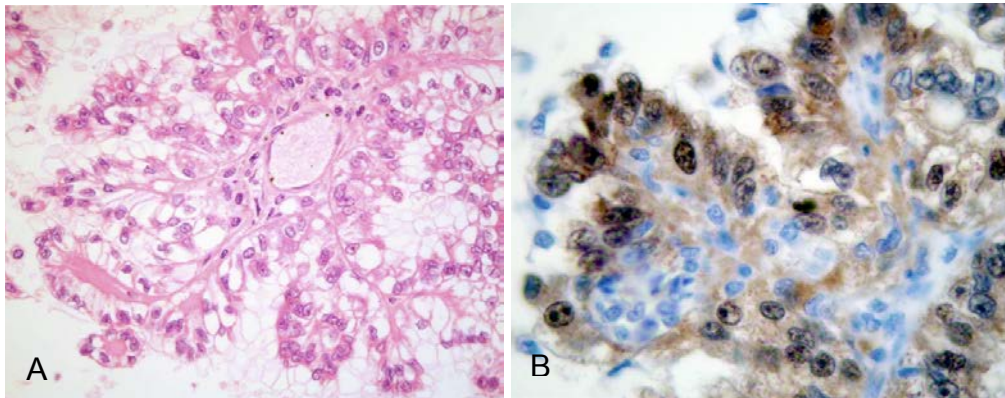
Type of Xp11 translocation RCC		
Fusion gene	Chromosome translocation	Neoplasm
ASPL-TFE3	t(x; 17) (p11.2; q25)	RCC
PRCC-TFE3	t(x; 1) (p11.2; q21)	RCC
PSF-TFE3	t(x;1) (p11.2; p34)	RCC
NoNo-TFE3	inv(x) (p11.2; q12)	RCC
CLTC-TFE3	t(x;17) (p11.2; q23)	RCC
ASPL-TFE3	der(17) t(x;17) (p11.2; q25)	ASPS

การระบาดวิทยาของ Xp11 translocation RCC ยังพบได้น้อย ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นเด็กและวัยรุ่น ส่วนเพศของผู้ป่วยยังไม่มีรายงานว่ามีผลต่อการเกิดขึ้นของมะเร็งชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาหลายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ Xp11 translocation RCC อย่างเช่น เปอร์เซนต์ของผู้ป่วย Xp11 translocation RCC มีความสัมพันธ์กันน้อยมากเมื่อนำมาเทียบกับ การเกิด RCC ชนิดอื่นๆในผู้ใหญ่ ยืนยันได้จากการศึกษาของ Argani และคณะ ที่ได้มีการรายงาน ว่า จากการศึกษาการใช้เทคนิคทาง Immunocytochemistry โดยการย้อม Immunoreactivity ของ TFE3 ซึ่งจะมีความจำเพาะสูงต่อ RCC ชนิดนี้ [4, 43, 44]



ภาพที่ 16 Radical nephrectomy, Translocation renal tumor [45, 64]

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ Xp11 translocation RCC จะมีความจำเพาะกับเด็กและวัยรุ่นเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากการศึกษามีรายงานการพบในผู้ป่วยที่อายุน้อย และมักมีการแสดงอาการให้เห็นเมื่อเข้าสู่ขั้นรุนแรงแล้ว ลักษณะทาง Macroscopy ของมะเร็งชนิดนี้ทั่วไปจะพบก้อนเนื้อที่มีสีน้ำตาลอมเหลือง พบบริเวณที่มี เลือดออกและเนื้อตายบ่อยๆ ในผู้ป่วย Xp11 translocation RCC การดูลักษณะของก้อนเนื้อ (imaging feature) ของ Xp11 translocation RCC จะพบลักษณะเหมือนกับ conventional RCC (clear cell carcinoma) ส่วนลักษณะทาง histopathology จะมีลักษณะของเซลล์แบบ papillary ร่วมกับลักษณะของ clear cell carcinoma หรือบางครั้งอาจจะพบเซลล์มีลักษณะ granular eosinophilic cytoplasm [45] ซึ่งใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแยก Xp11 translocation RCC ออกจาก Conventional RCC ด้วยการย้อม Hematoxylin & Eosin (H & E staining)



ภาพที่ 17 (A) H&E staining of translocation RCC. (B) Histology of translocation RCC confirming with immunohistochemical staining for TFE3 [45, 64]

การวินิจฉัย Xp11 translocation RCC จากการศึกษารายงานการย้อมเทคนิคทาง immunohistochemistry ผลในการวิเคราะห์โดยใช้ TFE3 protein ในการ detect ย้อมติด nucleus ที่สามารถแยก Xp11 translocation ออกจาก type อื่นๆของ RCC ซึ่งพบ sensitivity ประมาณ 97% และพบ specificity ประมาณ 99% และเพื่อยืนยันสามารถให้ mRNA expression ของ TFE3 fusion gene โดยวิธีการทำ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [4, 46] หลังการวินิจฉัย Xp11 translocation RCC ได้แล้วในภายหลังสามารถที่จะแยกชนิดของ fusion gene และ phenotype ของ translocation chromosome ด้วยวิธีการทาง cytogenetic หรือ molecular analysis ด้านการทำนายโรคของ Xp11 translocation RCC ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ตามที่ได้กล่าวจากรายงาน ผลทางคลินิกของ Xp11 translocation RCC อาการจะไม่แสดงออกมาจนกว่าจะเข้าสู่ระยะ advanced stage ถ้าหากมีการวินิจฉัยได้เร็วผู้ป่วยก็อาจจะเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้ยาวนานขึ้นหลังการผ่าตัดก้อนเนื้องอก

ตารางที่ 3 Main-pathologic and genetic features of adult RCC according to the 2004 WHO classification [2, 47, 48]

RCC subtype	Incidence	Development	Cell/tissue characteristics	Growth pattern	Prognosis	Genetic
Clear cell	75%	Solitary, rare multicentric or bilateral	Clear cytoplasm; cell with eosinophilic cytoplasm occasionally	Solid tubular, cystic, rare papillae	Aggressiveness according to grade stage and sarcomatoid change	-3p, +5q22, -6q, -8p, -9p, -14q
Multilocular cystic	Rare	Solitary, rare bilateral	Clear cytoplasm, small dark nuclei	Cystic, no solid component	No progressive or metastases	VHL gene mutation
Papillary	10%	Multicentric, bilateral or solitary	Type 1 (basophilic) or type 2 (eosinophilic)	Tubular-papillary, solid	Aggressiveness according to grade, stage and sarcomatoid change	+3q, +7, +8, +12, +17, +20, -Y
Chromophobe	5%	solitary	Pale or eosinophilic granular cytoplasm	Solid	10% mortality	-1, -2, -6, -10, -17, -21, hypodiploidy
Collecting ducts of Bellini	1%	Solitary	Eosinophilic cytoplasm	Irregular channels	Aggressive, 2/3 of patients die within two years	-1q, -6p, -8p, -13q, -21q, -3p (rare)
Medullary	Rare	Solitary	Eosinophilic cytoplasm	Reticular pattern	Mean survival of 15 weeks after diagnosis	Unknown

Xp11 translocation	Rare	Solitary	Clear and eosinophilic cells	Tubulo-papillary	Indolent	t(x;1)(p11.2;q21); t(x;17)(p11.2;q25), other
After neuroblastoma	Rare	Solitary	Eosinophilic cell with oncocytoid features	Solid	Related to grade and stage	Allelic imbalance at 20q13
Mucinous tubular and spindle cell	Rare	Solitary	Tubules, extracellular mucin and spindle cells	Solid	Rare metastases	-1, -4, -6, -8, -13, -14, +7, +11, +16, +17
Unclassified	4%	Solitary	Variable, sarcomatoid	Solid	High mortality	Unknown

2.3 Immunoprofiles of renal cell carcinoma

ตารางที่ 4 Immunoprofiles of the Major Renal Neoplasms [49]

Source, year	Stain	CCRCC (%)	PRCC (%)	ChRCC (%)	Collecting Duct (%)	Xp11 translocation RCC (%)
Adley et al,2006; Skinnider et al, 2005; Bazille et al, 2004; Allory et al, 2008; Liu et al, 2007; Yang et al, 2008	CK7	±(0-37)	+(80-87)	+(73-86)	+(83)	+(17)
Skinnider et al, 2005	CK8	+ (40)	+ (87)	+ (53)	+ (83)	NA
Skinnider et al, 2005; Amin et al, 2009	CK18	+ (100)	+ (100)	+ (100)	+ (100)	NA
Skinnider et al, 2005; Ohta et	CK20	-	-	-	-	NA

al, 2005; Wasco et al, 2010						
Skinnider et al, 2005; Ohta et al, 2005; Amin et al, 2009; Kobayashi et al, 2008; Azoulay et al, 2007; Chuang et al, 2007	HMW CKs	± (0–13)	+ (33)	-	+ (29–67)	NA
Skinnider et al, 2005	CK5/6	-	-	-	+ (17)	NA
Adley et al, 2006; Skinnider et al, 2005; Ohta et al, 2005; Han et al, 2010; Amin et al, 2009; Bazille et al, 2004; Allory et al, 2008; Liu et al, 2007; Wasco et al, 2010; Kobayashi et al, 2008; Azoulay et al, 2007; Argani et al, 2007; Meyer et al, 2007; Yang et al, 2008	AE1/AE3	+ (35)	+ (82)	+ (16)	NA	+ (0–25)
Skinnider et al, 2005; Bazille et al, Allory et al, 2008; Argani et al, 2007; Huang et al, 2009; Hes et al, 2007; Taki et al, 1999	Vimentin	+ (87)	+ (100)	-	+ (100)	+ (65–70)
Lin et al, 2004; Allory et al, 2008; Kobayashi et al, 2008; Molinie et al, 2006; Tretiakova et al, 2004	AMACR	+ (4–68)	+ (80–100)	± (0–29)	± (0–18)	+ (100)
Ivanov et al, 2001; Gupta et al, 2009	Carbonic anhydrase IX	+ (100)	+ (57)	-	+ (40–100)	+ (40)
Amin et al, 2009; Gupta et al, 2009; Ozcan et al, 2009; Zhai et al, 2010	PAX2	+ (92)	+ (87)	± (0–83)	± (0–100)	± (0–100)
Ozcan et al, 2011; Tong et al, 2009; Albadine et al, 2010	PAX8	+ (98)	+ (87)	+ (83)	+ (100)	+ (100)

McGregor et al, 2001; Allory et al, 2008; Argani et al, 2007; Avery et al, 2000; Wang et al, 2005; Bakshi et al, 2007	RCC marker	+ (72-85)	+ (87-95)	+ (0-91)	-	+ (100)
Martignoni et al, 2001; Chu et al, 2000; Ohta et al, 2005; Amin et al, 2009; Bazille et al, 2004; Allory et al, 2008; Liu et al, 2007; Kobayashi et al, 2008; Azoulay et al, 2007; Argani et al, 2007; Avery et al, 2000; Wang et al, 2005	CD10	+ (94-100)	+ (67-93)	± (0-72)	+ (25)	+ (100)
Adley et al, 2006; Shen et al, 2005; Kuehn et al, 2007; Allory et al, 2008; Kobayashi et al, 2008; Taki et al, 1999; Ferlicot et al, 2005; Mazal et al, 2005	E-cadherin	± (0-14)	+ (13-31)	+ (100)	+ (75)	+ (66)
Adley et al, 2006; Shen et al, 2005; Kuehn et al, 2007; Allory et al, 2008; Kobayashi et al, 2008; Taki et al, 1999; Ferlicot et al, 2005; Mazal et al, 2005	Kidney-specific cadherin	± (0-30)	± (0-29)	+ (86-100)	-	+ (66)
Martignoni et al, 2001; Adley et al, 2006; Young et al, 2003; Choi et al, 2007	Parvalbumin	± (0-8)	± (0-31)	+ (80-100)	NA	NA
Choi et al, 2007; Osunkoya et al, 2009; Hornsby et al, 2007	Claudin-7	-	+ (28-35)	+ (67-95)	NA	NA
Choi et al, 2007; Osunkoya et al, 2009; Hornsby et al, 2007	Claudin-8	NA	NA	+ (27)	NA	NA
Yusenko et al, 2009; Li et al, 2007; Cossu-Rocca et al, 2009	S100A1	+ (57-73)	+ (62-94)	± (0-26)	NA	NA

Yusenko et al, 2009; Kauffman et al, 2009	CD82	± (2-23)	-	+ (78-87)	NA	NA
Kobayashi et al, 2008; Wang et al, 2005; Petit et al, 2004; Zigeuner et al, 2005; Castillo et al, 2004; Pan et al, 2004;Huo et al, 2005; Sengupta et al, 2006; Kruger et al, 2005	CD117	± (0-5)	± (0-13)	+(82-100)	±(0-53)	NA
Argani et al, 2007; Meyer et al, 2007; Camparo et al, 2008;Ross et al, 2010	TFE3	-	-	-	-	+ (87)
Buza et al, 2010; Ordonez, 1997; Ordonez, 1998;Mhaweck et al, 2002; Kaufmann et al, 2000	Thrombo- mo-dulin	-	NA	NA	NA	NA
Ordonez, 1997; Kaufmann et al, 2000; Ohtsuka et al, 2006;Moll et al, 1993; Higgins et al, 2004	Uroplaki- n III	0/32 RCCs	-	-	NA	NA
Wasco et al, 2010; Albadine et al, 2010; Tuna et al, 2009; Comperat et al, 2006; Kunju et al, 2006; Chuang et al, 2007; Buza et al,2010; Westfall et al, 2009; Houghton et al, 2009	p63	-	-	-	+ (0-14)	NA
Tuna et al, 2009; Buza et al, 2010	S100P	-	-	-	-	NA
Argani et al, 2007; Camparo et al, 2008	HBM-45	NA	NA	NA	NA	+ (46)
Argani et al, 2007; Camparo et al, 2008	Melan-A	NA	NA	NA	NA	+ (89)

CCRCC: Clear cell renal cell carcinoma, PRCC: Papillary renal cell carcinoma, ChRCC: Chromophobe, Positive (+), negative (-), variably positive and negative (±), NA : data not systematically available

2.3.1 Cytokeratin

Cytokeratin เป็น protein ที่บรรจุอยู่ใน intermediate filaments ใน intracytoplasmic cytoskeleton ของ epithelial tissue [50, 51] โดย cytokeratins จะแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดแรก acidic type I cytokeratin หรือ type I cytokeratin โดยส่วนมาก type I cytokeratins จะเป็น acidic และเป็นโปรตีนชนิด low molecular weight cytokeratins ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย CK9, CK10, CK11, CK12, CK13, CK14, CK15, CK16, CK17, CK18, CK19 และ CK20 น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 40 kDa (CK20) ถึง 62 kDa (CK9) ชนิดที่ 2 คือ basic หรือ neutral type II cytokeratins โดย type II cytokeratins จะมีลักษณะเป็น basic หรือ neutral เป็นโปรตีนในกลุ่ม high molecular weight cytokeratins ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7 และ CK8 น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่างจาก 52 kDa (CK8) ถึง 67 kDa (CK1) [52] การแสดงออกของ Cytokeratins พบได้บ่อยในอวัยวะและมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทาง histopathologic อย่างเช่นการใช้ตรวจหา เซลล์หรือเนื้องอก ซึ่งจะช่วยในการศึกษาทาง clinic โดยใช้ข้อมูลของ cytokeratin ประกอบกับการใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยและศึกษาลักษณะทาง pathology อย่างเช่น CK7 ที่จะแสดงออกใน ductal epithelium ของ genitourinary(GU) tract และ CK20 โดยส่วนมากจะแสดงออกในเนื้อเยื่อบริเวณ gastrointestinal (GI) tract

ความสัมพันธ์ระหว่าง Cytokeratins และ เนื้องอกของไตโดยส่วนมากจะพบว่า low molecular weight cytokeratins ส่วนมาก จะมีการแสดงออกต่อ เนื้องอกของไตเป็นส่วนใหญ่ [53] ซึ่งตรงกันข้ามกับ CK20 ที่จะ negative เกือบทั้งหมด มีการพิจารณาจากการวินิจฉัยอื่นๆ พบว่า CK5/6 positive คิดเป็น 75% ของ urothelial carcinoma และ 15% ของ collecting duct RCC ส่วนของ CK7 ที่ใช้เป็นตัวศึกษาในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาที่ผ่านๆมาพบว่า CK7 จะ positive ใน Chromophobe RCC เป็นส่วนมากตามด้วย Papillary RCC และ urothelial carcinoma คิดเป็นประมาณ 87%-100% [49]

CK7 เป็น protein ในกลุ่มของ type II cytokeratin มีน้ำหนักโมเลกุล 54 kDa มีการแสดงออกแบบจำเพาะใน simple epithelial บริเวณเยื่อบุชั้นในช่องว่างของ internal organs และใน gland ducts [51] ดังนั้นจึงมีการใช้ CK7 เข้ามาช่วยในการวินิจฉัยมะเร็งในเนื้อเยื่อไต [54]

2.3.2 Transcription factor E3 (TFE3)

Xp11 translocation RCC เป็นผลที่เกิดจาก gene fusion ระหว่าง transcription factor E3 (TFE3) gene ในตำแหน่งบนโครโมโซม Xp11 เกิดการ translocation โดย TFE3 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด overexpression ของโปรตีน TFE3 และสามารถให้ความจำเพาะมาช่วยในการวินิจฉัยแยกด้วยวิธีการทาง immunohistochemistry [45, 55]

เป็นที่ทราบกันว่า TFE3 เป็นโปรตีนที่จะแสดงออกในมะเร็งชนิด Alveolar soft part sarcoma ซึ่งเป็นมะเร็งที่เกิด การทรานสโลเคชันของ TFE3 gene และต่อมาได้มีการศึกษาโดย Agani และคณะ ได้มีการใช้ TFE3 กับเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นเครื่องมือในการช่วยวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็งไตชนิด Xp11 translocation RCC ซึ่งจะให้ผลเป็น positive และการย้อมติดของโปรตีน TFE3 จะติดบริเวณนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะไม่ติดบริเวณไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเนื้อเยื่อไตปกติ

2.3.3 α -Methylacyl Coenzyme A Racemase (AMACR) หรือ P504s

AMACR เป็นเอนไซม์ที่เป็นสื่อระหว่างการ oxidation ของกรดไขมันในไมโทคอนเดรีย ในเนื้อเยื่อปกติจะสามารถพบได้ใน hepatocyte และ epithelial cells ของ renal proximal tubule, bronchus และผนังของ gall bladder และต่อมาได้มีรายงานว่า AMACR สามารถแสดงออกในมะเร็งไตชนิด Papillary RCC เป็นส่วนมากจากเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี [37] ต่อมาได้มีรายงานการแสดงออกในมะเร็งไตชนิดอื่นอย่างเช่น mucinous tubular spindle cell RCC, tubulocystic RCC และ Clear cell RCC แต่ยังไม่พบผลที่ให้ผล positive เท่ากับใน papillary RCC ส่วนใน Chromophobe RCC หรือ oncocytoma ยังไม่พบการแสดงออกของ AMACR ซึ่งจากเริ่มแรกของ AMACR นั้น มีรายงานเป็น positive marker สำหรับ prostatic carcinoma และต่อมาก็ได้มีการอธิบายพูดถึงเพิ่มชนิดของเนื้องอกอีกหลายชนิด เช่น adenocarcinomas ของ

liver, bladder, lung, colon, stomach, ovary, breast และ endometrium ใน neuroendocrine carcinoma เป็นต้น [54, 56, 57]

2.3.4 CD10

CD10 เป็นไกลโคโปรตีนบริเวณ cell surface ของเซลล์สุภาพดี และมีหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ hydrolyzes peptide bonds CD10 ในไตที่มีสุภาพดีจะพบ CD10 ที่แสดงออกอย่างมากบริเวณ podocytes และ proximal tubular cell brush border เหมือนกับ RCC marker antigen และ CD10 จะแสดงออกแบบ strongly และ diffusely ในมะเร็งไตชนิด clear cell RCC มากกว่ามะเร็งไตชนิดอื่นๆ [54,57] ส่วนการแสดงออกของ CD10 ใน renal epithelial neoplasms นั้นมีความหลากหลายแล้วแต่ชนิดของเนื้องอกนั้นๆ

2.3.5 Vimentin

Vimentin เป็น intermediate filament protein ที่มีการแสดงออกใน mesenchymal cell จึงจัดเป็นตัวบ่งชี้โรคของ mesenchymal(broad mesenchymal marker) [49, 53] นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกใน RCC ชนิดที่พบได้บ่อยในลักษณะของ diffuse ซึ่งจากการศึกษาทาง immunohistochemistry ปรากฏว่า Vimentin จะมีการอัตราการแสดงออกได้ดีใน Clear cell RCC และ Papillary RCC แต่จะพบการแสดงออกน้อยใน Chromophobe RCC และ Oncocytoma

2.3.6 Parvalbumin

Parvalbumin จัดเป็น calcium-binding protein ที่มีการแสดงออกใน cytosolic calcium homeostasis ในร่างกาย ชนิดของเนื้อเยื่อในร่างกายที่มักจะพบ Parvalbumin ประกอบด้วย กล้ามเนื้อ , สมอง, อวัยวะในระบบ neuroendocrine และในไต ในส่วนของไตนั้น Parvalbumin จะพบอยู่ในส่วนของ distal tubular และ collecting duct cell ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการควบคุม calcium flux ส่วนในด้านของ immunohistochemistry นั้น Parvalbumin จะมีการแสดงออกแบบเด่นชัดใน Chromophobe RCC และ Oncocytoma แต่จะไม่พบหรือพบน้อยในมะเร็งไตชนิดอื่นๆ [58]

2.3.7 CD117

CD117 เป็น proto-oncogene c-Kit หรือ tyrosine protein-kinase Kit แสดงออกเป็น โปรตีน transmembrane receptor ซึ่งเกิดจากการแปลรหัสพันธุกรรมมาจากยีน KIT ทำหน้าที่ เป็น cytokine receptor มีการแสดงออกบริเวณผิวเซลล์ของ hematopoietic stem cells หากเกิดการ mutation ของ CD117 ก็จะไปกระตุ้นการเกิดเนื้องอกบางชนิด เช่น gastrointestinal stromal tumors และ promyelocytic leukemia นอกจากนี้ยังมีความสนใจในการแสดงออกของ CD117 ในเนื้องอกชนิดอื่นๆเช่น เนื้องอกไต โดยส่วนมาก CD117 จะมีการแสดงออกใน CHRCC และ oncocytoma แต่จะให้ผลเป็น negative ใน CRCC และ PRCC [49]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

3.1.1 อุปกรณ์ในการทำวิจัยหรือเก็บข้อมูล

1. ชุดเครื่องมือทำ Tissue microarray (TMA) block (ประกอบด้วย ฆ้อน, forceps, แฉกเหล็กกรูกลวง, กระจกใสตารางขนาดต่างๆ)



ภาพที่ 18 ชุดอุปกรณ์ทำ Manual TMA block

2. เครื่องเตรียมพาราฟินบล็อกขึ้นเนื้อ (เครื่อง embedded)
3. Paraffin
4. Stainless mold ขนาดใหญ่
5. Cassette
6. ปากคีบ (forceps)
7. กาวสองหน้าชนิดบาง
8. กรรไกร

9. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome)
10. Cold plate
11. อ่างน้ำลอยชิ้นเนื้อ (floating bath)
12. Slide superfrost plus
13. Cover slips
14. ตู้อบร้อน (Hot Air Oven)
15. ตู้เย็นเก็บสารเคมี
16. Magnetic stirrer
17. Water bath
18. Microwave Oven
19. Automatic micropipette
20. Eppendorf tubes
21. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex mixer)
22. นาฬิกาจับเวลา
23. Dako pen
24. เครื่องซั่งสารชนิดละเอียด
25. Staining dish, Racks
26. Plastic jar
27. ถุงมือ
28. ถาดพลาสติก และฝาปิด

29. กระจกทวง
30. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น Beaker, cylinder, Volumetric flask ฯลฯ
31. กล้องจุลทรรศน์
32. เครื่องย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (Ventana automated immunostainer)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. 95% Alcohol
2. Xylene
3. Distilled water
4. EDTA buffer, pH8
5. Phosphate buffer saline
6. 3% H_2O_2
7. 3% Normal horse serum
8. Diluent
9. CK7 antibody (MU255-UC clone OV-TL12/30, BioGenex, CA, USA; dilution: 1:100)
10. CD10 antibody (NCI-L-CD10-270 clone 56C6, Novocastra, LEICA, UK; dilution: 1:25)
11. P504s antibody (Mob 438 Mouse anti P504s clone 13 H4, Diagnostic BioSystem, CA, USA; 1:800)
12. Vimentin antibody (M702U clone Vim 3B4, DAKO, Denmark; dilution: 1:200)

13. Parvalbumin antibody (AB50338, Mouse monoclonal clone PAVA-19, Abcam, UK; dilution: 1:2000)
14. TFE3 antibody (TFE3(P-16) sc-5958, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; dilution 1: 4000)
15. CD117 antibody (rabbit polyclonal, DAKO, Denmark; dilution 1:500)
16. Working PBS
17. Visualization reagent
18. DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous)
19. Ultraview universal DAB detection Kit (Ventana, Tucson, AZ)
20. Hematoxyline
21. Eosin
22. Lithium

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

3.2.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ผู้ป่วยมะเร็งไต

3.2.2 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population) คือ เนื้อเยื่อจาก paraffin block ของคนไข้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น renal cell carcinoma

3.2.3 ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size) ที่จะหาอุบัติการณ์มะเร็งชนิด Xp11 translocation RCC

สูตร
$$n = Z^2 \alpha / 2 P Q / d^2$$

กำหนดให้

n = ขนาดตัวอย่างของเนื้องอก

P = อัตราการเกิดเหตุการณ์ (% detection)

$$Q = 1 - P$$

$$d = \text{ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (acceptable error)}$$

$$Z = \text{ค่าปกติมาตรฐานที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95\%}$$

พบว่า

$$Z^2 \alpha / 2 = Z 0.05 / 2 = 1.96$$

$$P = 0.015 \quad (1.5\%)$$

$$Q = 1 - 0.015 = 0.985$$

$$d = 0.03$$

แทนค่า

$$n = Z^2 \alpha / 2 PQ / d^2$$

$$n = (1.96)^2 (0.015) (0.985) / (0.03)^2$$

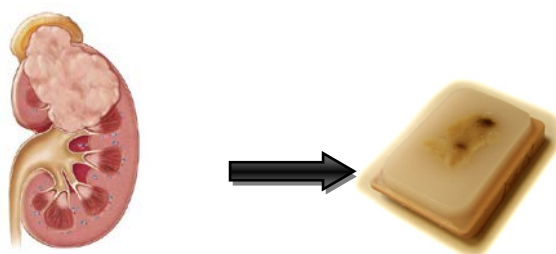
$$n = 60.383$$

ดังนั้น จากการค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ การทดลองนี้จึงใช้ขนาดตัวอย่างจำนวน 83 ตัวอย่าง ระหว่างปี 2547-2552

3.2.4 การเก็บตัวอย่าง (Sample Collection)

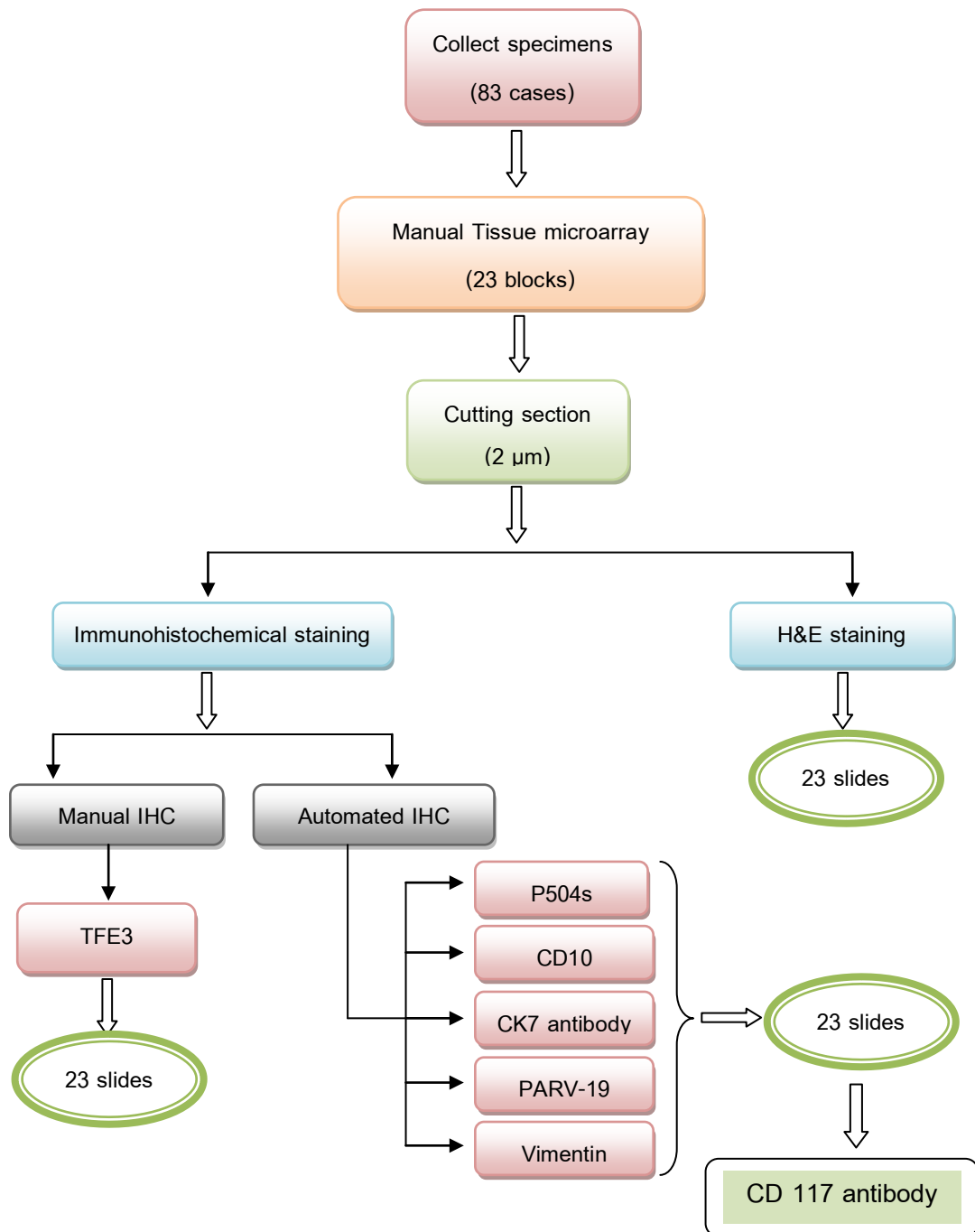
ชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษานั้นมาจากการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อออก (tumor removal) หรือตัดไตที่มีก้อนเนื้อออก (nephrectomy) จะอยู่ในรูป formalin-fixed แล้วทำเป็น paraffin-embedded ซึ่งผ่านการวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histopathology) ว่าเป็นมะเร็งในกลุ่ม renal cell carcinoma จากพยาธิแพทย์โดยรวบรวมชิ้นเนื้อจากการค้นหาข้อมูลจากฐานข้อมูลภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ซึ่งเป็นชิ้นเนื้อที่เก็บไว้หลังการตรวจตามปกติ โดยไม่ได้มีการเปิดเผยข้อมูลความลับของเจ้าของชิ้นเนื้อ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาอนุมัติจาก

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และการขอ
อนุญาตใช้ตัวอย่างเพื่อศึกษาจาก หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา และผู้อำนวยการโรงพยาบาล
จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย



ภาพที่ 19 Tissue block

3.2.5 วิธีการทดลอง (Method)

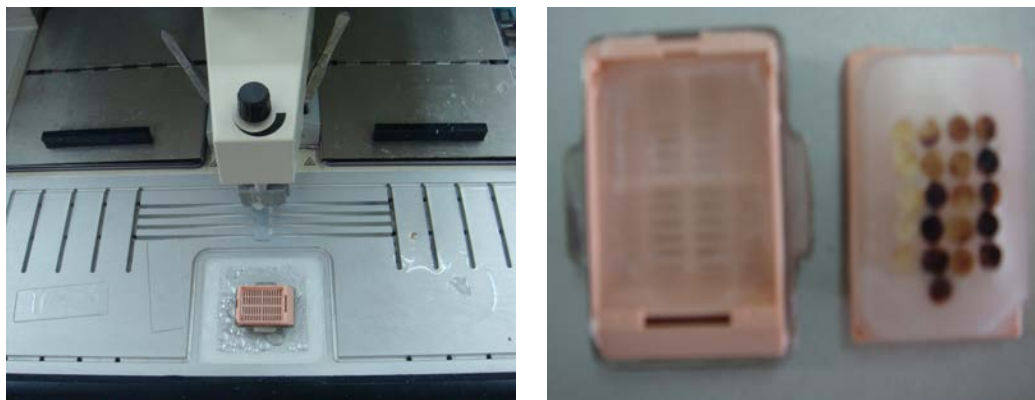


3.2.5.1 ขั้นตอนการทำ Manual Tissue microarray block

1. หลังจากการ collect specimens ได้แล้ว พยาธิแพทย์ทำการดูสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสี Hematoxylin-eosin (H&E) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อวงเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษา โดยจะต้องให้มีชิ้นเนื้อมะเร็งเหลือเก็บไว้เพื่อศึกษาหรือตรวจเพิ่มเติมในอนาคตได้ด้วย
2. นำสไลด์ที่วงไปเทียบหน้าตัดของชิ้นเนื้อบน paraffin block ว่ามีรูปร่างลักษณะตรงกันหรือไม่
3. จากนั้นเจาะชิ้นเนื้อบน paraffin block ด้วยแท่งเหล็กท่อกลวงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. ตรงตำแหน่งที่วง
4. นำแท่งชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาไปจัดเรียงเป็นแถวบน mold ที่จะใช้หล่อเป็น block
5. จากนั้นทำการฝังชิ้นเนื้อลงใน paraffin ซึ่งเรียกอีกอย่างหนึ่งคือการ embedded เพื่อให้ชิ้นเนื้อทั้งหมดรวมอยู่ใน block เดียวกัน
6. รอจนกว่า paraffin block แข็งแล้วแกะออกจาก mold ตรวจสอบความเรียบร้อยของ block ชิ้นเนื้อเพื่อพร้อมเข้าสู่ขั้นตอนการตัดออกมาเป็น section แต่ละ block จะต้องมีการ label ไว้อย่างเห็นภาพ



ภาพที่ 20 สไลด์ที่ผ่านการเลือกตำแหน่งโดยพยาธิแพทย์



ภาพที่ 21 การหล่อพาราฟินบล็อก

3.2.5.2 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการย้อม Immunohistochemical

นำชิ้นเนื้อบน tissue microarray block มาตัด section ให้มีความหนา 2 ไมครอน จำนวน 8 สไลด์ (7 สไลด์สำหรับการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย แอนติบอดี 7 ชนิด และ 1 สไลด์สำหรับย้อม H&E เพื่อสำหรับใช้ตรวจสอบว่าตรงกับตำแหน่งที่เลือกมาหรือไม่) หลังจากนั้นนำสไลด์ไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60°C ใช้เวลา overnight

3.2.5.3 ขั้นตอนการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical)

โดยแบ่งเป็นการย้อมโดยใช้เครื่องอัตโนมัติและการย้อมด้วยมือ

การย้อมด้วยเครื่องอัตโนมัติ : นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไปย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยใช้เครื่องย้อมอัตโนมัติ Ventana automated immunostainer (Ventana, Tucson, AZ) โดยใช้แอนติบอดี 6 ชนิด ได้แก่ CK7 (MU255-UC clone OV-TL 12/30, BioGenex, CA, USA) ในอัตราส่วน (dilution) 1: 100, CD10 (NCI-L-CD10-270 clone 56C6, Novocastra, LEICA, UK) ในอัตราส่วน 1:25, P504s (Mob 438 Mouse anti P504s clone 13 H4, Diagnostic BioSystem, CA, USA) ในอัตราส่วน 1:800, Vimentin (M702U clone Vim 3B4, DAKO, Denmark) ในอัตราส่วน 1:200, Parvalbumin (AB50338, Mouse monoclonal clone PARV-19, Abcam , UK) ในอัตราส่วน 1:2000 และ CD117 (rabbit polyclonal, DAKO, Denmark) ในอัตราส่วน 1:500 ใช้ชุด Ultraview Universal DAB detection Kit (Ventana, Tucson, AZ) ในการตรวจสอบแอนติเจน และ counterstain นิวเคลียสด้วย hematoxylin

การย้อมติดสีของแอนติบอดีแต่ละชนิด

CK7 : Cytoplasm and membrane

CD10 : membrane

P504s : Cytoplasm

Vimentin : Cytoplasm

Parvalbumin : Cytoplasm

TFE3 : Nucleus

CD117 : membrane

การย้อมด้วยมือ : เป็นการย้อมแอนติบอดีชนิด TFE3 (TFE3(P-16) sc-5958, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ในอัตราส่วน 1:4000

ขั้นตอนการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยมือ

1. Slide preparation

- เตรียม formalin-fixed, paraffin-embedded section หนา 2 μm หรือ 3 μm บนสไลด์ที่เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane หรือ สไลด์ superfrost plus
- นำสไลด์ที่ตัด sections เรียบร้อยแล้วไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60°C ใช้เวลา overnight
- Deparaffinized แล้ว rehydrate ด้วย distilled water

2. Epitope retrieval (Antigen retrieval) ด้วยวิธีการ Microwave method

- เติม EDTA buffer, pH 8.0 ปริมาตร 300 ml ใส่ลงใน jar
- เรียงสไลด์ใน rack แฉ่งลงใน jar

- นำ jar เข้า microwave ใช้ Hi-Power 3 นาที แล้วปรับเป็น power 30% ใช้เวลา 10 นาที
- นำ jar ออกมา incubate ไว้ที่ room temperature 20 นาที
- ล้างด้วย Phosphate buffer saline 5 นาที

3. Block endogenous peroxidase activity

- วงรอบ section ด้วย Dako pen
- Incubate 3% H_2O_2 /DW 5 นาที ที่ room temperature
- ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที
- ล้างด้วย Phosphate buffer saline 5 นาที

4. Block non specific background

- Incubate 3% Normal horse serum เป็นเวลา 20 นาที ที่ room temperature
- ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที

5. Antibody application

- Drain excess ด้วย diluents
- หยด Primary antibody ที่ dilution (TFE3 ; 1:4000)
- Incubate 60 นาที ที่ room temperature หรือ 4 องศาเซลเซียส overnight (ตามที่ Primary antibody ระบุไว้)
- ล้างด้วย Phosphate buffer saline (Working PBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
- หยด visualization reagent : Rabbit-Anti Goat immunoglobulin – HRP
- Incubate 30 นาที ที่ room temperature

- ล้างด้วย Phosphate buffer saline 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที

6. Color development

- หยด DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous) ปริมาตร 100 µl เป็นเวลา 5 นาที
- Incubate 10 นาที ที่ room temperature
- ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที
- Counter stain with Hematoxilin solution
- Mounting slides

ขั้นตอนการย้อม Hematoxilin & Eosin staining

การย้อมติดสีของ H&E staining (Hematoxilin ย้อมติด Nucleus, Eosin ย้อมติด Cytoplasm)

1. Deparaffinized

- เรียงสไลด์ลงใน rack จุ่มลงใน Xylene 3 โถๆละประมาณ 3 นาที รวม 10 นาที
- จุ่มใน 95% Alcohol 3 โถๆละประมาณ 20 วินาที (10 dips)
- ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3 นาที

2. Staining

- จุ่มลงใน Hematoxilin 3 นาที
- ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3 นาที
- จุ่มใน Lithium ประมาณ 20 วินาที (10 dips)
- ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 3 นาที

- จุ่ม 95% Alcohol 10 dips
- จุ่มลงใน Eosin 3 นาที
- จุ่ม 95% Alcohol โถละ 10 dips จำนวน 2 โถ
- จุ่ม Absolute alcohol โถละ 10 dips จำนวน 2 โถ
- จุ่ม Xylene โถละ 10 dips จำนวน 2 โถ
- Mounting slides

3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

3.3.1 บันทึกข้อมูลการแสดงผลของโปรตีนซึ่งมีระดับการแสดงผลออกตั้งแต่ระดับ 0 ถึง 3+ ตาม

immunoreactive score ซึ่งได้แก่

0 = ไม่มี positive tumor cell

1+ = มี positive cell น้อยกว่า 10 % ของ tumor cell ทั้งหมด

2+ = มี positive cell ตั้งแต่ 10-50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

3+ = มี positive cell มากกว่า 50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

โดยกำหนดให้ score 0 และ 1+ = negative และ score 2+ และ 3+ = positive [59]

3.3.2 คำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงผลของแอนติบอดีแต่ละชนิด

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1. จำแนกชนิดย่อย ย่อยๆของมะเร็งไต จากลักษณะทาง morphology ร่วมกับ immune profile

2. หาจำนวนผู้ป่วยที่แสดงผลออกเป็น positive ของแอนติบอดี

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการเปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยด้วย morphology และการใช้ Immune profile

การศึกษาบทบาทของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต เริ่มจากการเก็บตัวอย่างของชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งไตชนิด Renal Cell carcinomas (RCCs) ซึ่งตัวอย่างที่เก็บเป็นตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการทางพยาธิวิทยาที่ได้รับการเก็บรักษาไว้ในรูปของ paraffin blocks จะมีการเก็บไว้เป็นฐานข้อมูลด้วยหมายเลข pathology number ที่สามารถค้นข้อมูลเพื่อนำมาศึกษาวิจัย ของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

การศึกษาวินิจฉัยผู้วิจัยได้ทำการค้นหาและเก็บตัวอย่างจากฐานข้อมูลในระหว่างปี 2547-2552 ได้จำนวนตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้จำนวน 83 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น RCCs โดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้วยวิธีการทาง conventional technique เป็นการวินิจฉัยที่ประกอบด้วย การดูลักษณะของ gross specimens และการดูลักษณะทาง morphology ร่วมกัน แต่จะมีเพียงบางรายที่ได้รับการตรวจเพิ่มด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีจะเป็นผู้ป่วยรายที่มีความกำกวมไม่สามารถแยกชนิดย่อยของ RCCs ได้ด้วย conventional technique เพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าจะมีการเปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา หรือที่เรียกว่า morphology เพียงอย่างเดียว กับการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมด้วยหลังจากได้รับการวินิจฉัยแล้วด้วยการดูลักษณะทาง morphology จะมีผลการวินิจฉัยที่แตกต่างหรือไม่ โดยจะศึกษาจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยจุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำมาศึกษาต่อโดยการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆที่มีความจำเพาะและให้ผลดีมีการได้รับการยืนยันจากหลายงานวิจัยต่อการแยก ชนิดของมะเร็งไต เพื่อศึกษาว่าอิมมูโนฮิสโตเคมีมีบทบาทในการช่วยวินิจฉัยมะเร็งไตมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นเครื่องมือในการหาอุบัติการณ์ของมะเร็งไตชนิดใหม่ที่มีความน่าสนใจ มีความแตกต่างจากชนิดอื่นๆ และยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย สามารถวินิจฉัยได้ยาก ผู้วิจัยจึงอยากศึกษาเพิ่มเติมว่าจะสามารถพบหรือหาอุบัติการณ์ของ Xp11 translocation renal cell carcinoma ซึ่งเป็นชนิดย่อยของ RCCs ได้หรือไม่จากผู้ป่วยที่มีการวินิจฉัยผ่านมาแล้ว

ด้วยการศึกษาจากจำนวนตัวอย่างที่มาก 83 ราย และจำนวนแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาเป็นจำนวน 7 ชนิด หากมีการย้อมชิ้นเนื้อของผู้ป่วยรายละ 1 แอนติบอดีก็จะเกิดความสิ้นเปลืองและใช้เวลานานในการย้อมและการ อ่านแปลผล ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการศึกษาตัวอย่างด้วยการใช้วิธีการทำ Tissue microarray block (TMA) เข้ามาช่วย เพื่อลดจำนวนสไลด์ที่จะนำมาย้อมด้วยแอนติบอดีแต่ละชนิด

การทำ TMA block คือหลังจากนำชิ้นเนื้อที่เป็น paraffin block มาเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษาเพื่อนำมาเจาะวงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มม. นำไปจัดเรียงเพื่อทำ TMA block จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 83 ราย เมื่อนำมาทำเป็น TMA block แล้วได้จำนวน 23 block ที่จะนำไปศึกษาด้วยแอนติบอดีจำนวน 7 ชนิด

ผลการศึกษาวิจัยพบว่าจากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งไตทั้งหมด 83 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยเดิมแบ่งชนิดย่อยเป็นจำนวนที่พบคือ Clear cell RCC จำนวน 56 ราย, Papillary RCC จำนวน 19 ราย, Chromophobe RCC จำนวน 8 ราย หลังจากการศึกษาโดยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดี 6 ชนิดแรก ได้แก่ Vimentin, CK7, CD10, Parvalbumin, P504s และ TFE3 ผลในการศึกษาพบจำนวนการวินิจฉัยที่เหมือนกันระหว่างการวินิจฉัยเดิมด้วย morphology และการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีในการศึกษาครั้งนี้ ให้ผลการวินิจฉัยตรงกับการวินิจฉัยเดิมจำนวน 78 ราย เป็น Clear cell RCC จำนวน 55 ราย, Papillary RCC จำนวน 17 ราย, Chromophobe RCC จำนวน 6 ราย และสำหรับการวินิจฉัยที่ผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับการวินิจฉัยเดิมด้วยวิธีการดู morphology พบจำนวน 5 ราย ในจำนวน 5 รายที่ผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ย้อมด้วยแอนติบอดี 6 ชนิดคือ Vimentin, CK7, CD10, Parvalbumin, P504s และ TFE3 ให้ผลในการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตไม่เหมือนเดิมนั้นได้มีการได้มีการศึกษาเพิ่มด้วยการย้อม CD117 เพิ่มเพื่อที่จะได้มาช่วยยืนยันผลว่าในจำนวน 5 รายนั้นผลการวินิจฉัยน่าจะเป็นมะเร็งไตชนิดไหน ซึ่ง CD117 ก็สามารถช่วยยืนยันได้เพียงบางรายเท่านั้น

4.1.1 ผลของแอนติบอดีแต่ละชนิดต่อการแสดงออกของ Renal cell carcinoma subtypes ที่สามารถวินิจฉัยได้ตรงกับการวินิจฉัยเดิม

ผลการใช้วิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยการเลือกใช้แอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่มีความจำเพาะและให้ผลที่ดีจากการได้รับการยืนยันจากหลายงานวิจัยที่สามารถแยกชนิดของมะเร็งไตได้เหมือนกับการวินิจฉัยเดิม ที่ผู้วิจัยเลือกมาเพื่อทำการศึกษาจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ P504s, CD10, CK7, TFE3, Parvalbumin และ Vimentin ผลการแสดงออกของแอนติบอดีแต่ละ

ชนิดสามารถวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตได้ได้เหมือนกับการวินิจฉัยเดิมจำนวน 78 ราย ผลการแสดงผลของแอนติบอดีแต่ละชนิดดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 5 ผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ

RCC types	Staining extent	Immunohistochemical staining						
		P504s	CD10	CK7	TFE3	PARV-19	Vimentin	CD117
		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
CRCC (N=55) No.(%)	0	33 (60)	1 (2)	50 (91)	54 (98)	55 (100)	8 (14)	45 (82)
	1+	20 (36)	9 (16)	1(2)	1 (2)	0	11(20)	7 (13)
	2+	2 (4)	20 (36)	4(7)	0	0	17(31)	3 (5)
	3+	0	25 (46)	0	0	0	19 (35)	0
PRCC (N=17) No.(%)	0	0	3 (17)	6 (35)	15 (88)	17(100)	1 (6)	10 (59)
	1+	2 (12)	1 (6)	0	2 (12)	0	2 (12)	5 (29)
	2+	6 (35)	11 (65)	5 (30)	0	0	9 (53)	2 (12)
	3+	9 (53)	2 (12)	6 (35)	0	0	5 (29)	0
CHRCC (N=6) No.(%)	0	4 (68)	2 (34)	1(16)	6(100)	4(68)	6 (100)	0
	1+	1 (16)	1 (16)	0	0	0	0	0
	2+	1 (16)	1 (16)	1 (16)	0	1 (16)	0	4 (67)
	3+	0	2 (34)	4 (68)	0	1 (16)	0	2 (33)
Xp11 translocation (N=0)	-	-	-	-	-	-	-	-

การแปลผล : 0 = ไม่มี positive tumor cell

1+ = มี positive cell น้อยกว่า 10 % ของ tumor cell ทั้งหมด

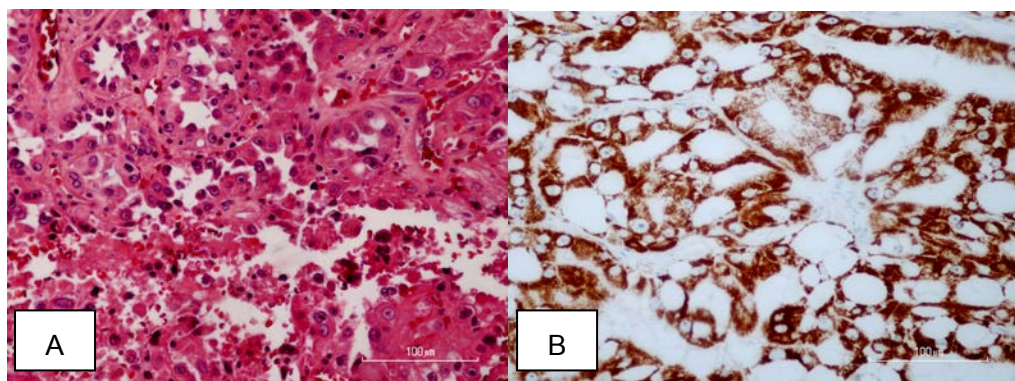
2+ = มี positive cell ตั้งแต่ 10-50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

3+ = มี positive cell มากกว่า 50 % ของ tumor cell ทั้งหมด

โดยกำหนดให้ score 0 และ 1+ = negative และ score 2+ และ 3+ = positive [59]

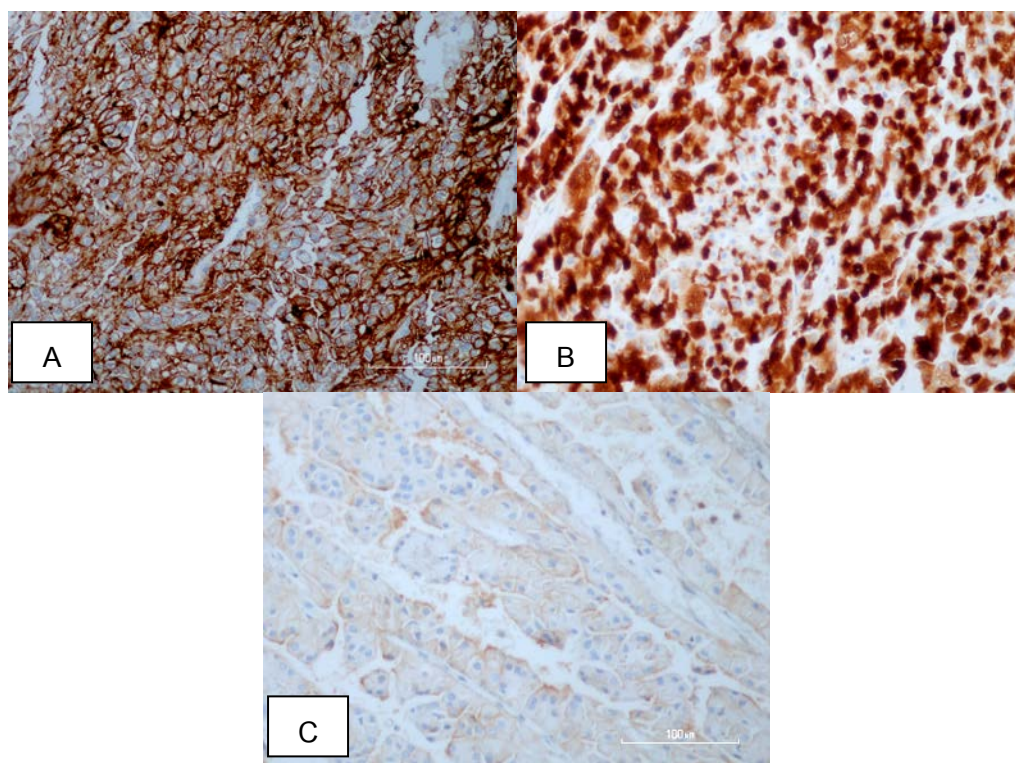
ผลการศึกษาพบว่าหลังจากที่ได้แบ่งชนิดย่อยของมะเร็งไตเป็นชนิดต่างๆ คือ Clear cell RCC, Papillary RCC และ Chromophobe RCC แล้วผลของแอนติบอดีแต่ละชนิดที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งไตชนิดต่างๆ มีผลของการแสดงออกดังตารางที่ 5

ผลของแอนติบอดีชนิดแรก คือ P504s สำหรับผลของ P504s ต่อ Clear cell RCC จะมีการแสดงออกผลเป็น negative เป็นส่วนมากจากจำนวนผู้ป่วย 55 ราย พบผล negative จำนวน 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 60 รวมถึงผลที่แสดงออกแบบจาง อีก 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 37 รวมทั้งหมดที่มีการแสดงออกเป็น negative ของ P504s ต่อ Clear cell RCC รวมทั้งหมด 53 ราย คิดเป็นร้อยละ 96 ส่วนด้านของผล positive อยู่ที่ระดับสูงสุดคือ 2+ พบจำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 4 จากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งไตชนิด Clear cell RCC ทั้งหมด 55 ราย ต่อมาเป็นผลของ P504s ต่อมะเร็งไตชนิด Papillary RCC มีผลการแสดงออกแบบจาง ให้ผลเป็น negative เพียง 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 12 จากผู้ป่วยทั้งหมด 17 ราย ทางด้านของผล positive ของ P504s มีการแสดงออกได้ดีในมะเร็งชนิด Papillary RCC คือมีการแสดงออกอยู่ที่ระดับ 2+ และ 3+ จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 88 ต่อมาเป็นผลของ P504s ต่อมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC ผลเมื่อย้อมและแปลผลออกมาปรากฏว่าผลเป็น negative การแสดงออกอยู่ที่ระดับ 0 และ 1+ รวม 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 84 ให้ผลเป็น positive 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 16



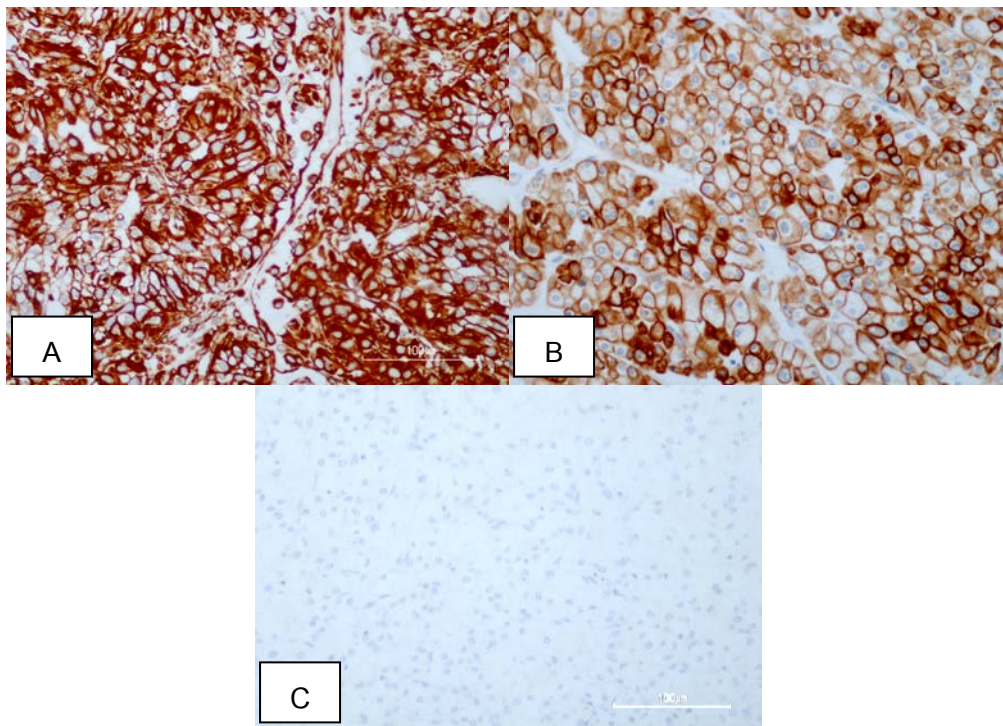
ภาพที่ 22 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (A) (H&E staining) และการแสดงออกของ P504s ใน PRCC; P504s มีการแสดงออกในไซโตพลาสซึมของ PRCC, (B); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

แอนติบอดีชนิดต่อมาคือ CD10 ผลการแสดงออกของ CD10 ต่อมะเร็งไตชนิด Clear cell RCC ให้ผล negative อยู่ในระดับ 0 จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 2 และผลอยู่ในระดับ 1+ จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 16 รวมผล negative ทั้งหมด 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 ส่วนผล positive ของ CD10 อยู่ที่ระดับ 2+ และ 3+ จำนวน 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 36 และ 25 ราย คิดเป็นร้อยละ 46 รวมผล positive ของ CD10 รวมแล้วคิดเป็นร้อยละ 82 ต่อมาเป็นผลของ CD10 ที่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิด Papillary RCC ให้ผลอยู่ในระดับ 0 และ 1+ รวมทั้งหมด 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 23 ส่วนผล positive ระดับ 2+ และ 3+ พบทั้งหมด 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 77 จากผู้ป่วยทั้งหมด 17 ราย สำหรับการแสดงออกของ CD10 ต่อ Chromophobe RCC พบ negative 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 และผลการแสดงออกเป็น positive จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 โดยมีการแสดงออกอยู่ที่ระดับ 2+ จำนวน 1 ราย และอยู่ที่ระดับ 3+ จำนวน 2 ราย จากผู้ป่วยที่ได้รับการแปลผลเป็นมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC ทั้งหมด 6 ราย



ภาพที่ 23 การแสดงออกของ CD10 ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต, CD10 มีการย้อมติดสีเข้มบริเวณขอบไซโตพลาสซึมใน CRCC (A), ติดสีเข้มในไซโตพลาสซึมของ PRCC (B) และมีการย้อมติดแบบจางในบางรายของ CHRCC (C); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

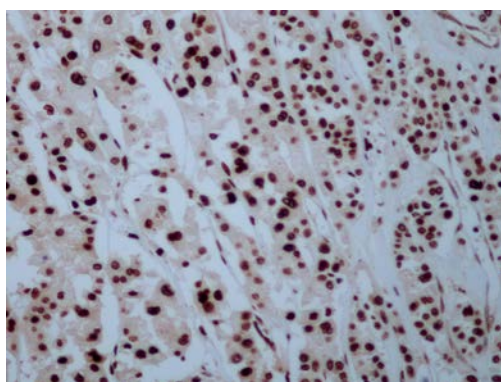
ผลของแอนติบอดีชนิดที่ 3 คือ CK7 ผลของ CK7 ต่อการแสดงออกของมะเร็งไตชนิด Clear cell RCC โดยผลของ CK7 จะมีการแสดงออกส่วนมากให้ผลเป็น negative อยู่ในระดับ 0 และ 1+ จำนวนทั้งหมด 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 93 จากจำนวนทั้งหมด 55 ราย และมีการแสดงออกที่ระดับสูงสุดเป็น positive อยู่ที่ระดับ 2+ เพียง 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 7 เท่านั้น ส่วนการแสดงออกของ CK7 ต่อ Papillary RCC มีการแสดงออกเป็น positive จำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 65 ส่วนที่เหลืออีก 6 รายให้ผลเป็น negative คิดเป็นร้อยละ 35 จากผู้ป่วยทั้งหมด 17 ราย สำหรับการแสดงออกของ CK7 ต่อ Chromophobe RCC เป็นการแสดงออกที่ดีที่สุดของ CK7 ในมะเร็งชนิดนี้คือ มีผลเป็น negative 1 ราย ผลที่แสดงออกเป็น positive 5 ราย โดยมีการแสดงออกอยู่ที่ระดับ 2+ เป็นจำนวน 1 รายคิดเป็นร้อยละ 16 และการแสดงออกอยู่ที่ระดับ 3+ จำนวน 4 รายคิดเป็นร้อยละ 68 รวมแล้วผลการแสดงออกของ CK7 ต่อมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC มีการแสดงออกเป็นร้อยละ 84 จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 6 ราย



ภาพที่ 24 การแสดงออกของ CK7 ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต, CK7 มีการแสดงออกแบบเข้มในไซโตพลาสซึมของ PRCC (A) และ CHRCC (B), CK7 มีผลเป็นลบใน CRCC (C); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

ผลของแอนติบอดีชนิดต่อมาคือ TFE3 การแสดงออกของ TFE3 ต่อมะเร็งไตชนิดต่างๆ ทั้ง Clear cell RCC, Papillary RCC และ Chromophobe RCC มีผลการแสดงออกเป็น negative ทั้งหมด มีเพียงบางรายที่มีการแสดงออกแบบจางมาก อยู่ที่ระดับ 1+ แต่เป็นจำนวนที่น้อยมาก และมีเปอร์เซ็นต์ต่ำจึงแสดงให้เห็นว่า TFE3 ไม่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดที่พบได้บ่อย

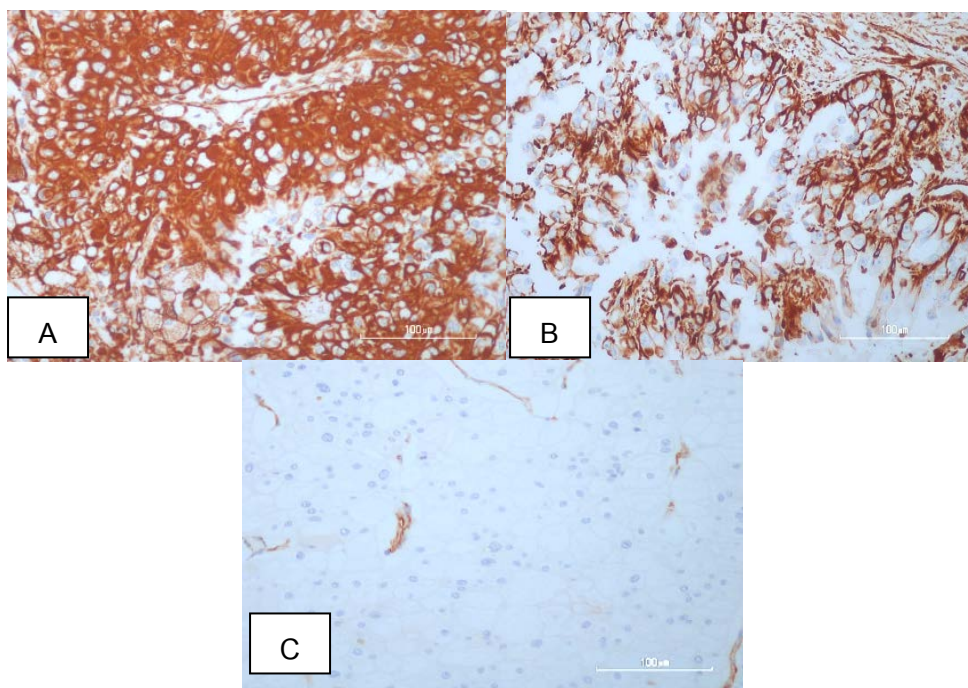
ผลของแอนติบอดีชนิดที่ 5 คือ Parvalbumin จากการศึกษาพบว่า Parvalbumin ไม่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิด Clear cell RCC และ Papillary RCC เลย โดยที่ทั้งสอง subtypes ให้ผลเป็น negative ทั้งหมด ส่วนมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC มีการแสดงออกได้ดีกับ Parvalbumin โดยมีการแสดงออกอยู่ที่ระดับ 2+ และ 3+ จำนวนทั้งหมด 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 32 จากทั้งหมด 6 ราย ซึ่ง Chromophobe RCC เป็นมะเร็งไตชนิดเดียวของทั้ง 3 ชนิดย่อยที่ทำการศึกษาที่มีการแสดงออกต่อ Parvalbumin มากที่สุดเมื่อเทียบกับชนิดอื่น



ภาพที่ 25 การแสดงออกของ Parvalbumin ใน CHRCC, Parvalbumin มีผลเป็นบวกใน CHRCC โดยมีการติดสีเข้มในนิวเคลียสมากกว่าในไซโตพลาสซึม; (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

ผลของแอนติบอดีชนิดสุดท้ายคือ Vimentin โดย Vimentin มีการแสดงออกที่หลากหลายสำหรับ มะเร็งไตชนิด Clear cell RCC มีผลการแสดงออกเป็น negative ในระดับ 0 จำนวน 8 รายคิดเป็นร้อยละ 14, ระดับ 1+ จำนวน 11 รายคิดเป็นร้อยละ 20 ตามลำดับ สำหรับผล positive ของ Vimentin พบการแสดงออกอยู่ในระดับ 2+ เป็นจำนวน 17 รายคิดเป็นร้อยละ 31 และในระดับ 3+ จำนวน 19 รายคิดเป็นร้อยละ 35 รวมจำนวนของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกต่อ Vimentin จำนวน 36 รายคิดเป็นร้อยละ 66 ของจำนวนผู้ป่วย Clear cell RCC ทั้งหมด 55 ราย เช่นเดียวกับผลของ Vimentin ต่อ Papillary RCC ที่มีการแสดงออกที่หลากหลายเช่นกัน โดยมีการแสดงออกเป็น positive 14 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 17 ราย คิดเป็นร้อยละของการแสดงออกเป็นร้อยละ 82 ส่วนที่เหลืออีก 3 รายผลเป็น negative ส่วนผลของมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC ที่มี

หลายรายงานการวิจัยที่สรุปผลว่า Vimentin จะมีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิด Chromophobe น้อยมากหรือมีผลเป็น negative และผลของ Chromophobe RCC ในการศึกษาครั้งนี้ก็มีผลเป็น negative ทั้งหมดจากจำนวนผู้ป่วย 6 ราย

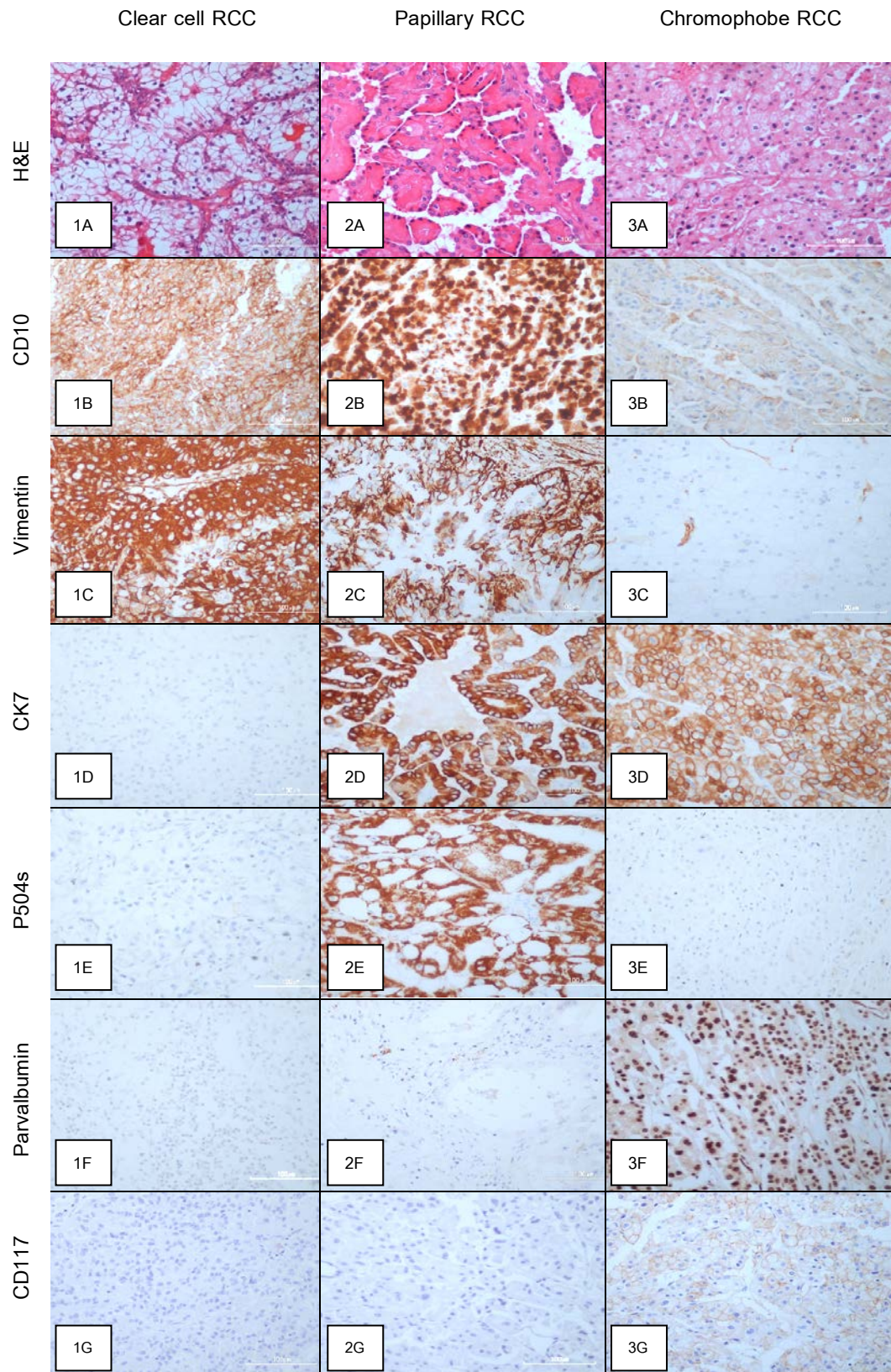


ภาพที่ 26 การแสดงออกของ Vimentin ต่อชนิดย่อยของมะเร็งไต, Vimentin มีการย้อมติดแบบ strongly ในไซโตพลาสซึมของ CRCC (A) and PRCC (B) แต่มีผลเป็นลบใน CHRCC (C); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

จากผลการย้อมของการศึกษา ทั้งหมดจะมีแอนติบอดีชนิดหนึ่งคือ TFE3 ที่จะไม่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดที่สามารถพบได้บ่อยๆอย่าง Clear cell RCC, Papillary RCC หรือ Chromophobe RCC เพราะจากที่ได้กล่าวมาแล้วในช่วงต้นของการทบทวนวรรณกรรมว่า TFE3 จะมีความจำเพาะและมีการแสดงออกได้ดีเป็นเปอร์เซ็นต์สูงในการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดที่พบได้น้อยแต่มีความรุนแรงและมีการทำนายโรคได้ยากอย่างชนิด Xp11 translocation RCC ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก TFE3 เข้ามาในการศึกษาด้วยเพื่อหวังว่าอาจจะพบผู้ป่วยในรายที่วินิจฉัยผ่านมาแล้วเป็นมะเร็งไตชนิดนี้ จะได้เป็นการหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Xp11 translocation RCC เพื่อประโยชน์สำหรับการช่วยวินิจฉัยและทำนายโรคต่อไปในอนาคต แต่จากการศึกษาเป็นที่น่าเสียดายที่จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 83 ราย ไม่มีรายไหนที่มีการแสดงออกต่อ TFE3 เลย จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาให้ละเอียดในมะเร็งไตชนิด Xp11 translocation RCC ได้

ตารางที่ 6 สรุปผลการแสดงออกของ Antibody 6 ชนิดต่อ Renal Cell Carcinoma subtypes

Immunohistochemical and histochemical evaluation of renal cell carcinoma subtypes							
RCC types / Antibody	P504s	CD10	CK7	TFE-3	PARV-19	Vimentin	CD117
Clear cell RCC (%)	Pos/Neg 4/96	Pos/Neg 82/18	Pos/Neg 7/93	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 66/34	Pos/Neg 5/95
Papillary RCC (%)	Pos/Neg 88/12	Pos/Neg 77/23	Pos/Neg 65/35	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 82/18	Pos/Neg 12/88
Chromophobe RCC (%)	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 50/50	Pos/Neg 84/16	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 32/68	Pos/Neg 0/100	Pos/Neg 100/0
Xp11 translocation RCC (%)	-	-	-	-	-	-	-



ภาพที่ 27 The microscopic feature and Immunohistochemical illustrations

คำอธิบายภาพที่ 27 : ลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อของ Clear cell RCC (1A), Papillary RCC (2A) และ Chromophobe RCC (3A); Strongly positive staining ของ CD10 ติดบริเวณระหว่าง cytoplasmic border ของ CRCC (1B), ติดใน cytoplasm ของ PRCC (2B) และมีการย้อมติดแบบจางในบางรายของ CHRCC (3B); การแสดงออกแบบ Strongly positive ของ Vimentin ในบริเวณ cytoplasm ของ CRCC (1C) และ PRCC (2C), ผลเป็น negative ใน CHRCC (3C); การแสดงออกเป็น negative ของ CK7 ใน CRCC (1D), ผลการย้อมแสดงออกเป็น positive ของ CK7 ใน cytoplasm ของ PRCC (2D) และ CHRCC (3D); P504s มีการแสดงออกเป็น positive บริเวณ cytoplasm ของ PRCC (2E) และ negative ใน CRCC (1E) และ CHRCC (3E); Parvalbumin มีผลเป็น negative ใน CRCC (1F) และ PRCC (2F) แต่มีการแสดงออกเป็น positive ใน CHRCC และมีการติดสีเข้มใน nucleus มากกว่า cytoplasm (3F); ผล negative ของ CD117 ใน CRCC (1G) และ PRCC (2G) แต่มีผลการย้อมเป็น positive ในบริเวณ cytoplasmic membrane ของ CHRCC (3G)

4.1.2 ผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีที่ไม่สามารถใช้ในการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตได้ตรงตามการวินิจฉัยเดิม

จากการศึกษาจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 83 ราย ผลปรากฏว่ามีจำนวนผู้ป่วย 5 รายที่ไม่สามารถแยกชนิดย่อยได้จากการ ย้อมด้วย P504s, CD10, CK7, TFE3, Parvalbumin และ Vimentin จึงได้เลือกแอนติบอดีเพิ่มอีก 1 ชนิดคือ CD117 เพราะจากการศึกษาทางานวิจัยหลายงานวิจัยที่ผ่านมา CD117 จะมีการแสดงออกได้ดีในมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC [60] และในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการย้อม CD117 กับจำนวนตัวอย่างทั้งหมดทั้งในกลุ่มที่วินิจฉัยได้และในกลุ่มที่ผลของอิมมูฮิสโตเคมีไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับ morphology ผลปรากฏว่า CD117 ให้ผลเป็น negative ทั้งหมดในผู้ป่วยที่เป็น Clear cell RCC และ papillary RCC และให้ผลเป็น positive ในทุกรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Chromophobe RCC ดังนั้น CD117 จึงเป็นแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถช่วยแยกชนิดย่อยได้ เช่นกัน ซึ่งผลของจำนวนผู้ป่วย 5 รายที่ผลอิมมูโนฮิสโตเคมีไม่ตรงตามการวินิจฉัยเดิมด้วย morphology มีผลการแสดงออกดังตารางที่ 7

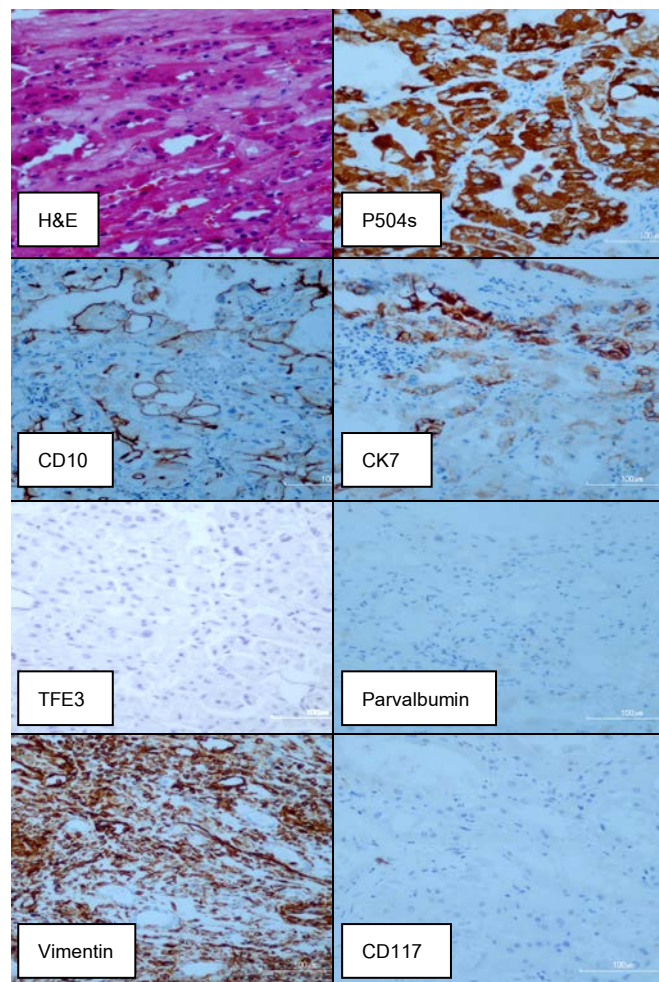
ตารางที่ 7 ผลของแอนติบอดีใน 5 รายที่มีความแตกต่างจากการวิจัยเดิม

No.	การวินิจฉัย เดิมด้วย morphology	P504s	CD10	CK7	TFE3	Parvalbumin	Vimentin	CD117	การวินิจฉัย ภายหลังด้วย IHC
1	CRCC	-	+	+	-	-	-	-	-
2	CRCC	+	+	+	-	-	+	-	PRCC
3	CHRCC	-	+	-	-	-	+	-	-
4	PRCC	-	+	-	-	-	+	-	-
5	PRCC	-	-	+	-	-	-	+	-

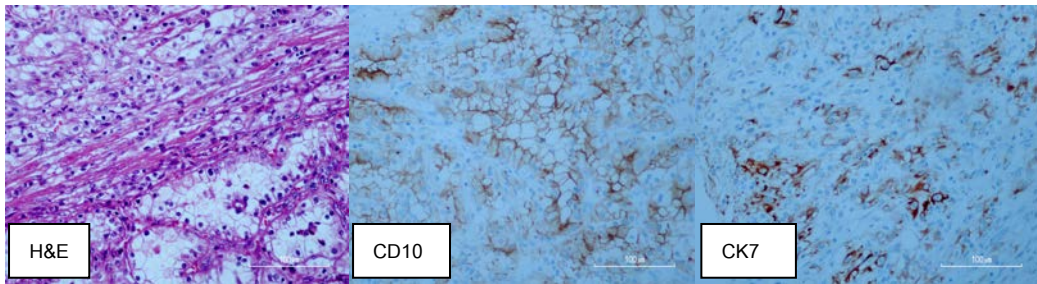
ผลการศึกษารายที่ 1 เดิมการวินิจฉัยเป็น Clear cell RCC มีลักษณะ morphology เป็น Clear cell และ papillary ร่วมกับผลของอิมมูโนฮิสโตเคมีจะมีการติดแบบ inhomogeneous ผลร่วมกันระหว่าง papillary และ Clear cell (mixed type) จึงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นกลุ่มไหน และเมื่อมาพิจารณาผลของแอนติบอดีแต่ละชนิด ปรากฏว่าผล คือ CK7(+), CD10(+) ซึ่งผลของ IHC ก็ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้ เพราะผลของ IHC ก็มีความกำกวมไม่มีแอนติบอดีตัวไหนที่มีการแสดงออกเด่นชัดเพื่อยืนยันได้ว่าเป็นมะเร็งไตชนิดไหน (ภาพที่ 29) ในรายงานนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพราะเมื่อศึกษาเพิ่มเติมด้วย IHC ก็ยังไม่สามารถช่วยวินิจฉัยชนิดย่อยได้

เช่นเดียวกับ รายที่ 3, 4 และ 5 ผลของ IHC ก็ไม่สามารถช่วยวิเคราะห์ได้เพราะเมื่อมาพิจารณาลักษณะทาง morphology มีความกำกวมระหว่าง subtypes ในขณะเดียวกันผลของ IHC ก็ไม่มีรูปแบบที่จำเพาะต่อชนิดย่อย ดังนั้นในรายงานนี้จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ดังภาพที่ 30-32) จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

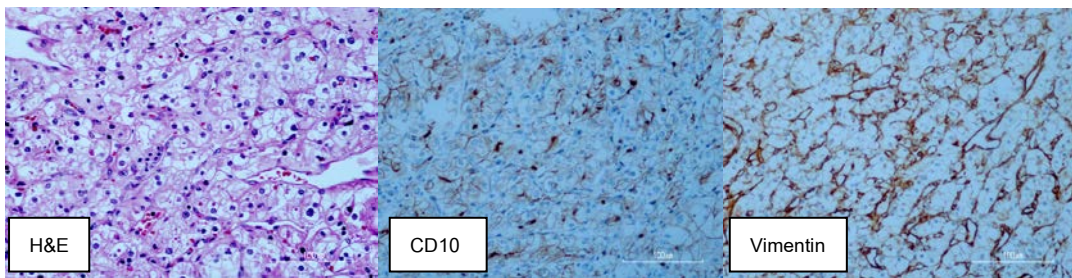
ผลของการศึกษาในรายที่มีการวิเคราะห์ที่ไม่เหมือนเดิมปรากฏว่าในจำนวน 5 ราย IHC สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้จำนวน 1 ราย คือ รายที่ 2 การวินิจฉัยเดิมด้วย morphology เป็น CRCC แต่โดยลักษณะของเนื้องอกมี morphology ที่หลากหลาย เซลล์มีไซโตพลาสซึมสีชมพู บางตำแหน่งมีลักษณะเป็น papillary บางแห่งพบเป็น tubular pattern มีการเรียงตัวเป็น papillary เมื่อดูจากผลของ IHC มีผลคือ Vimentin(+), CD10(+), CK7(+) และ P504s ก็มีการแสดงออกที่เข้ม ดังนั้นจากผลของ IHC pattern สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยรายนี้เป็นมะเร็งไตชนิด PRCC ผลดังภาพที่ 28



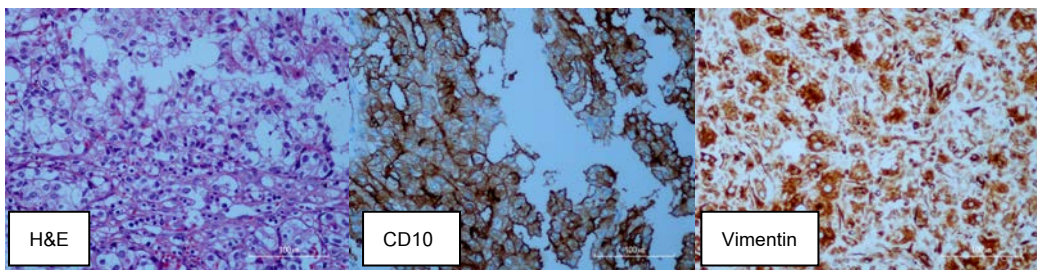
ภาพที่ 28 แสดงผล IHC ในผู้ป่วยที่สามารถใช้ภูมิโมโนโคลนอลในการช่วยวินิจฉัย, โดยมีการแสดงออกเป็น positive ใน P504s, CD10, CK7 และ Vimentin; (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)



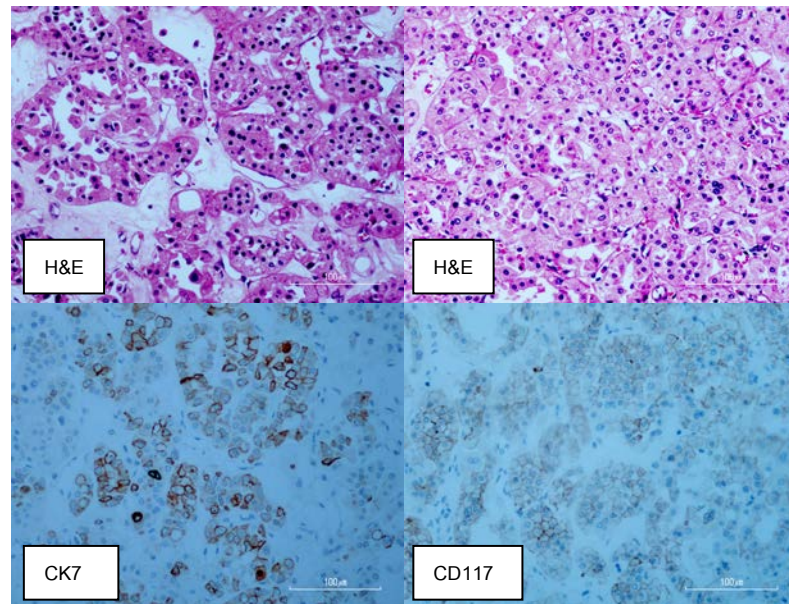
ภาพที่ 29 แสดงผลทาง morphology และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 1, ผลของการย้อม H&E มีลักษณะทาง morphology คือ พบลักษณะของ clear cell โดย cytoplasm มีสีใส และพบลักษณะของ papillary ในบางบริเวณ ในรายเช่นนี้ การใช้ภูมิโมโนโคลนัลไอโซโตเคมีไม่สามารถช่วยวินิจฉัยได้ (มี CD10 และ CK7 positive); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)



ภาพที่ 30 แสดงผลของ H&E staining และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 3, ลักษณะทาง morphology คือ จะพบทั้ง ลักษณะของ clear cell และ chromophobe การใช้ภูมิโมโนโคลนัลไอโซโตเคมีไม่สามารถช่วยวินิจฉัยได้ (มี CD10 และ Vimentin positive); (กำลังขยายต้นฉบับ; 200X)



ภาพที่ 31 แสดงผลของ H&E staining และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 4, ลักษณะทาง morphology จะพบ cytoplasm ใส มีลักษณะเป็น papillary ด้วยในบางบริเวณ การใช้ภูมิโมโนโคลนัลไอโซโตเคมีไม่สามารถช่วยวินิจฉัยได้ (มี CD10 และ Vimentin positive); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)



ภาพที่ 32 แสดงผลทาง morphology และ IHC ในผู้ป่วยรายที่ 5, ลักษณะของ tumor จะพบลักษณะของเซลล์ที่หลากหลาย cytoplasm มีสีชมพู ซึ่งสามารถพบได้ทั้ง PRCC, CHRCC, CRCC และ Oncocytoma การใช้ immunohistochemistry ไม่สามารถช่วยวินิจฉัยได้เพราะมีลักษณะการแสดงออกที่กำกวม ไม่จำเพาะ (มี CK7 และ CD117 positive); (กำลังขยายต้นฉบับ 200X)

บทที่ 5

วิเคราะห์และสรุปผลวิจัย

งานวิจัยนี้จึงสังเกตเห็นประโยชน์ของวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีว่าหากมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียวกับการศึกษาโดยอาศัยอิมมูโนฮิสโตเคมีหลังจะได้รับการวินิจฉัยแล้วด้วย การดูลักษณะทาง morphology จะมีผลการวินิจฉัยที่แตกต่างกันหรือไม่เพื่อที่จะดูถึงบทบาทของอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต โดยทำการศึกษาจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยการใช้จุลพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว เพื่อนำมาศึกษาต่อโดยอิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่มีความจำเพาะและให้ผลดีต่อมะเร็งไตชนิดต่างๆที่ได้รับการยืนยันจากหลายงานวิจัยต่อการแยกชนิดย่อยของมะเร็งไต [49,60] โดยได้ทำการเลือกแอนติบอดีที่จะนำมาศึกษาเป็นจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ P504s, CD10, CK7, Parvalbumin, Vimentin และ TFE3 ซึ่งแอนติบอดีตัวสุดท้ายเป็นแอนติบอดีที่มีหลายงานวิจัยที่ใช้ในการย่อยแยกชนิดย่อยของมะเร็งไตที่สามารถพบได้น้อยและมีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่หลากหลาย มีการทำนายโรคได้ยากอย่าง Xp11 translocation renal cell carcinoma งานวิจัยนี้จึงเลือก TFE3 เข้ามาด้วยเพื่อดูว่า จากที่ผ่านมากการวิจัยเดิมนั้นมีผู้ป่วยรายใดบ้างที่เป็น Renal cell carcinoma ชนิดที่พบยากนี้บ้าง และหากพบจะมีอุบัติการณ์เป็นเท่าใด

จากการศึกษาพบว่าการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีในการศึกษา จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการดูลักษณะทางพยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียว มีผลการวินิจฉัยที่เปลี่ยนไปจากเดิมจำนวนเพียง 5 ราย จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 83 ราย จึงทำให้เห็นบทบาทของแอนติบอดีและอิมมูโนฮิสโตเคมีว่าสามารถ เปลี่ยนการวินิจฉัยจากเดิมได้ เพราะจากการแปลผลนั้นจะมีการดูทั้งลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และดูการแสดงออกของแอนติบอดี แต่ละชนิดซึ่งบางชนิดก็มีการแสดงออกแบบเฉพาะเพียงบาง subtypes เท่านั้น แต่จากการศึกษาการวินิจฉัยเดิมกับการศึกษาใหม่ส่วนมากไม่ค่อยแตกต่างกันเท่าไร ดังนั้นจึงนำไปสู่การที่เราจะดูการแสดงออกของแอนติบอดีแต่ละชนิดว่ามีผลการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดต่างๆนั้นเป็นอย่างไร

จากที่กล่าว การทดลองใช้แอนติบอดี ร่วมกัน 6 ชนิด คือ P504s, CD10, CK7, Parvalbumin, TFE3 และ Vimentin ในครั้งแรกและยังไม่มี การใช้ CD117 เพื่อช่วยยืนยันหลังจากการใช้แอนติบอดีทั้ง 6 ชนิด แล้วไม่สามารถแยกชนิดได้ ปรากฏว่าการใช้แอนติบอดีร่วมกัน 6 ชนิด สามารถ

ช่วยแยกชนิดย่อยได้ตรงตามการวินิจฉัยเดิมทั้งหมด 78 ราย จากทั้งหมด 83 ราย คิดเป็นร้อยละ 94 ที่สามารถใช้วินิจฉัยได้ตรง โดยพบ CRCC จำนวน 55 ราย, PRCC 17 ราย และ CHRCC 6 ราย และสรุปผลของการแบ่งชนิดย่อยของมะเร็งไตด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยส่วนมาก CRCC จะมี Vimentin +, CD10 +, CK7 - ; PRCC จะมี Vimentin +, CD10 +, CK7 +, P504s +, Parvalbumin -; CHRCC จะมี Vimentin -, CD10 -, CK7 + และ Parvalbumin + ในรายที่วินิจฉัยด้วย IHC เหมือนกับการวินิจฉัยก่อนหน้าด้วย morphology แต่สำหรับ cases ที่ไม่สามารถแยกชนิดย่อยด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีก็ได้มีการย้อม CD117 เพิ่มเพื่อที่จะสามารถช่วยแยกชนิดย่อยหรือยืนยันผลได้มากขึ้นป รากฎว่า CD117 ให้ผลเป็น positive ในทุกๆ cases ที่เป็น Chromophobe และจะ negative ในทุก cases ที่เป็น CRCC และ PRCC

โดยจากการศึกษาพบว่าแอนติบอดีบางชนิด มีการแสดงออกมากใน subtype หนึ่งแต่ในขณะที่ยีก subtype แอนติบอดีชนิดนี้ไม่แสดงออกเลย และจะมีบางแอนติบอดีที่มีการแสดงออกได้ดีต่อมะเร็งไตมากกว่าหนึ่งชนิด อย่าง P504s ที่มีการแสดงออกผลเป็น positive ถึงร้อยละ 88 ในมะเร็งไตชนิด Papillary RCC ซึ่งตรงกับหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า P504s มีการแสดงออกได้ดีต่อ Papillary RCC อย่างเช่น งานวิจัยของ Tretiakava และคณะ ในปี 2004 [61] ที่มีการพูดถึงถึงผลการแสดงออกที่ดีของ P504s นอกจากนั้นยังมีอีกหลายงานวิจัยที่สรุปถึงผลการย้อมติดของ P504s ว่ามีผลการย้อมติดที่ดีใน Papillary RCC อยู่ที่ประมาณร้อยละ 80 ถึง 100 ซึ่งก็ถือว่ามี ความใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ และ P504s กับการแสดงออกใน Clear cell RCC ของงานวิจัยอยู่ที่ร้อยละ 4 ส่วน Chromophobe RCC สำหรับงานวิจัยนี้ P504s มีการแสดงออกที่น้อย ซึ่งก็เป็นไปในทางเดียวกันกับรายงานการวิจัยของ Lin และคณะในปี 2004[56], Allory และคณะ ในปี 2008[54] ที่รายงานผลการแสดงออกของ P504s ต่อ Clear cell RCC อยู่ที่ประมาณร้อยละ 4 ถึง 68 และการแสดงออกต่อ Chromophobe RCC อยู่ที่ประมาณร้อยละ 0 ถึง 29

สำหรับ CD10 มีการแสดงออกต่อ Clear cell RCC และ Papillary RCC เป็นการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันทั้งสองชนิด คือ ร้อยละ 82 และ 77 ตามลำดับ ซึ่งผลก็สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมาที่ผลการแสดงออกของ CD10 อยู่ที่ประมาณร้อยละ 94-100 ใน Clear cell RCC และประมาณร้อยละ 67-93 ใน Papillary RCC จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Clear cell RCC มีการแสดงออกที่มีความใกล้เคียงกัน และผลการแสดงออกของ CD10 ต่อ CHRCC จาก

หลายงานวิจัยมีการแสดงออกอยู่ที่ประมาณร้อยละ 0-72 [54,60] สำหรับผลของ CD10 ต่อ Chromophobe RCC ในงานวิจัยนี้มีการแสดงออกอยู่ที่ประมาณร้อยละ 50

แอนติบอดีชนิดต่อมาคือ CK7 โดย CK7 มีการแสดงออกดีที่สุดที่สุดใน Chromophobe RCC คือมีการแสดงออก 5 ราย ของผู้ป่วย Chromophobe RCC คิดเป็น 84% รองลงมาเป็น Papillary RCC ที่มีการแสดงออกอยู่ที่ร้อยละ 65 ตรงกันข้ามกับผู้ป่วย Clear cell RCC ที่พบว่ามีการแสดงออกเป็นลบคิดเป็นร้อยละ 93 ผลก็เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ อย่างเช่น Adley และคณะในปี 2006[62] ของ Skinnider และคณะในปี 2005[63] เป็นต้น ที่ CK7 จะมีการแสดงออกได้ดีใน Chromophobe RCC และ Papillary RCC แต่จะให้ผลลบเป็นส่วนมากใน Clear cell RCC

สำหรับ Parvalbumin เป็นแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งที่มีความโดดเด่น เพราะจากการศึกษาพบว่า Parvalbumin มีการแสดงออกแต่เพียงในกลุ่มผู้ป่วย Chromophobe RCC เท่านั้น ถึงแม้จะมีการแสดงออกเป็นเปอร์เซ็นต์เพียงร้อยละ 32 จากการศึกษานี้ ซึ่งอาจจะต่างจากงานวิจัยของ Martignoni และคณะในปี 2001[40] ของ Adley และคณะในปี 2006[62] และงานวิจัยของ Abrahams และคณะในปี 2004[58] ที่มีผลการแสดงออกที่สูงกว่าถึงมากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งเป็นไปได้ว่าจำนวนผู้ป่วยที่จะนำมาศึกษาในกลุ่มของ Chromophobe RCC มีจำนวนน้อย แต่ผลการศึกษาก็ทำให้เราทราบว่า Parvalbumin นั้นมีความจำเพาะ (specificity) กับมะเร็งไตชนิด Chromophobe RCC มากที่สุดเพราะในชนิดย่อยอื่นๆ Parvalbumin ไม่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดอื่นๆเลย Parvalbumin จึงเป็นแอนติบอดีอีกชนิดหนึ่งที่เหมาะสำหรับยืนยันการวินิจฉัย Chromophobe RCC

แอนติบอดีชนิดต่อมาคือ Vimentin จากงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ผ่านมาอย่างเช่น Skinnider และคณะในปี 2005 [63] ของ Allory และคณะในปี 2008[54] และอีกหลายงานวิจัยที่ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า Vimentin มีการแสดงออกได้ดีใน Papillary RCC มากที่สุด และรองลงมาจะเป็น Clear cell RCC ทั้งสองชนิดก็มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกที่สูง คืออยู่ที่ประมาณร้อยละ 70-100 แต่ตรงกันข้ามกับ Chromophobe RCC ที่หลายงานวิจัยรายงานว่าไม่มีการแสดงออกเลย คือผลมักจะเป็นผลลบทั้งหมด เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่ Vimentin มีการแสดงออกสูงสุดในผู้ป่วย Papillary RCC คิดเป็นร้อยละ 82 รองลงมาเป็น Clear cell RCC ที่มีการแสดงออกของ Vimentin คิดเป็นร้อยละ 66 และชนิดสุดท้ายคือ Chromophobe RCC ผลจะ

เป็นลบทั้งหมด ซึ่งผลของ Vimentin ต่อมะเร็งไตชนิดต่างๆก็มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

แอนติบอดีชนิดสุดท้าย คือ TFE3 ที่งานวิจัยนี้ได้เลือกเข้ามาเพื่อใช้ในการศึกษาหาคูบติการณ่มะเร็งไตชนิดย่อยชนิดใหม่อย่าง Xp11 translocation RCC แต่เป็นที่น่าเสียดายจากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งไตทั้งหมด 83 รายไม่พบรายใดที่มีการแสดงออกต่อ TFE3 เลย ทำให้ไม่สามารถเห็นการแสดงออกของ TFE3 ได้ เพราะสำหรับ TFE3 จากหลายงานวิจัยได้สรุปว่า TFE3 จะไม่มีการแสดงออกต่อมะเร็งไตชนิดอื่นนอกจากชนิด Xp11 translocation RCC เท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงไม่มีการแสดงออกของ TFE3 แต่อย่างใด

สำหรับบางรายที่ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น มะเร็งไตชนิดย่อยชนิดไหนด้วยแอนติบอดี ชุดแรกก็จะมีที่ยืนยันด้วยแอนติบอดีอีกชนิดคือ CD117 ที่จะสามารถช่วยแยก CRCC และ PRCC ออกจาก CHRCC เพราะ CD117 จะ positive ในทุก cases ของ CHRCC และจะ negative ใน Type อื่นๆ

บางรายเมื่อดูลักษณะของ morphology จากสไลด์ที่ย้อม H&E พบว่า cell มีลักษณะการเรียงตัวเหมือน papillary แต่ในบางตำแหน่งจะพบว่ามี cytoplasm ที่ใสซึ่งเป็นลักษณะของ Clear cell ลักษณะแบบนี้จะเป็น psudopapillary lesion หรืออาจจะเป็น True papillary lesion ก็เป็นไปได้ ใน case เช่นนี้หากมีการศึกษาแบบ Immunohistochemical genetic จะมีประโยชน์มากและแม้จะใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีมาช่วยแล้วก็ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้

ในการศึกษาผู้ป่วยในรายที่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็น PRCC พบว่าลักษณะผลของอิมมูโนฮิสโตเคมี จะมีผลที่หลากหลาย ผลของการแสดงออกของแอนติบอดี จะมีทั้ง positive บ้าง negative บ้างทั้งที่เป็นชนิดเดียวกัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการเลือกแอนติบอดีที่ให้ผล positive สูงสุดใน PRCC มาเป็น marker ด้วย อย่าง P504s ซึ่งจากผลของแอนติบอดี ที่ออกมาแล้วมีความหลากหลายอาจเป็นไปได้ว่า PRCC จะเป็นชนิดย่อยของมะเร็งไตที่มีการแยกย่อยไปอีก 2 ชนิด คือ PRCC Type1 (basophilic) และ PRCC Type2 (eosinophilic)

นอกจากนั้นยังพบว่า CHRCC ในบางรายที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วย Immunohistochemical marker ในกลุ่มแรกได้นั้นเพราะบางครั้งถึงแม้จะเป็นลักษณะ

morphology เป็น CHRCC ก็ตามแต่ผลของแอนติบอดี แต่ละตัวก็ไม่เข้ากันกับ CHRCC จึงทำให้ผลไม่ตรงกันเพราะ CHRCC มี IHC phenotype ที่หลากหลายหรือ variable ซึ่งการที่ผลของ morphology กับ IHC ไม่ไปด้วยกันด้วย แอนติบอดี ใน 6 ชนิดแรก ผู้วิจัยจึงเลือกย้อม CD117 เพิ่มเพื่อช่วยยืนยันการวินิจฉัยมะเร็งไตชนิด Chromophobe อย่างไรก็ตาม morphology ก็ยังมีความสำคัญควรจะใช้ประกอบกันกับ อิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยเพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยมากยิ่งขึ้น

การใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีเข้ามามีบทบาทในการใช้แยกชนิดย่อยของมะเร็งไตนั้นถือว่าได้รับประโยชน์บ้างในบางราย แต่ก็ไม่สามารถใช้ได้หมดในทุกๆ ราย ซึ่งอิมมูโนฮิสโตเคมีก็สามารถช่วยทำให้การวินิจฉัย มีความแม่นยำ มากยิ่งขึ้น และ อาจเป็น ผลดีสำหรับผู้ป่วยมะเร็งไตที่มีความหลากหลายทาง morphology ที่เมื่อดูแล้วไม่สามารถทราบได้ว่าเป็น Type ไหน การใช้ IHC ก็จะช่วยยืนยันชนิดของมะเร็งไต แต่ในการวินิจฉัยแต่ละครั้งก็ควร ดูลักษณะทาง morphology ควบคู่ไปด้วย และ เนื่องจากการ วินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไตยังไม่มี gold standard ที่ใช้วินิจฉัยที่แน่นอนยังคงต้องใช้ความชำนาญของพยาธิแพทย์ในการวินิจฉัยแต่ละครั้งด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดที่จะหาวิธีที่จะมาช่วยในการวินิจฉัยให้ได้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำมีราคาที่ไม่แพงมากหากจะนำมาใช้ได้จริงสำหรับ คนไข้ แต่การที่จะหา gold standard ได้นั้นเป็นเรื่องที่ยากสำหรับการวินิจฉัยชนิดย่อยของมะเร็งไต อย่างเช่นการทำ Cytogenetic อีกวิธีการหนึ่งที่น่าจะใช้เป็น gold standard ได้ แต่มีข้อจำกัดเป็นจำนวนมาก อย่างเช่น cytogenetic นั้นต้องทำในระยะ metaphase ใน cell culture แต่ตัวอย่างที่เราใช้ในการศึกษาไม่สามารถใช้ได้เพราะเก็บตัวอย่างเป็น paraffin-block และอีกวิธีการหนึ่งคือการทำ FISH (Fluorescence *In situ* hybridization) ก็ต้องใช้ probe จำนวนหลายตัว เพราะ RCC แต่ละ Types จะมีลักษณะของ Chromosome ที่หลากหลายทั้ง deletion หรือ การ gain ของ Chromosome หลายตัวในแต่ละ Types จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายที่สูงมากๆ ดังนั้นการใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ดี สะดวก ราคาถูกมากกว่าวิธีอื่นๆ ถึงแม้ว่าจะยังไม่ได้ผลที่ร้อยเปอร์เซ็นต์ในแต่ละชนิดแต่ผลการทดลองก็เป็นไปในแนวโน้มที่ดีที่สอดคล้องกับการวินิจฉัยเดิมเป็นจำนวนมากและสำหรับรายที่ morphology ไม่สามารถวินิจฉัย

ได้ IHC ก็สามารีวิวินิจฉัยแยกชนิดย่อยออกมาได้ว่าน่าจะเป็นชนิดไหนจากผลของแอนติบอดี แต่ ละชนิด

และสรุปโดยรวมจากตัวอย่างทั้งหมด 83 รายมีการวินิจฉัยตรงตามการวินิจฉัยเดิมจำนวน 78 ราย และไม่ตรงตามเดิมหรือบางรายแอนติบอดี 6 ชนิดแรกไม่สามารถวินิจฉัยได้จำนวน 5 ราย ในกลุ่ม 78 ราย ประกอบด้วย CRCC 55 ราย, PRCC 17 ราย และ CHRCC 6 ราย โดย Clear cell RCC จะมีลักษณะของ แอนติบอดี marker คือ Vimentin +, CD10 +, CK7 -, PRCC จะพบ Vimentin +, CD10 +, CK7 + และใช้ P504s + ช่วยยืนยัน ส่วน CHRCC จะพบ Vimentin -, CD10 ±, CK7 + และใช้ Parvalbumin หรือ CD117 ในการช่วยยืนยัน ส่วน 5 รายเป็นกลุ่มที่มีการ วินิจฉัยระหว่าง อิมมูโนฮิสโตเคมี และ morphology ไม่สอดคล้องกันเพราะมีลักษณะ morphology ที่หลากหลาย การใช้อิมมูโนฮิสโตเคมีร่วมกับ morphology จึงสามารถช่วยวิเคราะห์ และเป็นที่น่าเสียดายจากการตั้งวัตถุประสงค์ของในงานวิจัยนี้เพื่อที่จะศึกษาหาอุบัติการณ์เกิดของ มะเร็งไตชนิดย่อยชนิดใหม่อย่าง Xp11-translocation ซึ่งเป็น Type ที่มีความพิเศษน่าสนใจจึงมี การเลือกใช้ TFE3 antibody ซึ่งจากหลายงานวิจัยยืนยันว่าจะมีการแสดงออกใน Xp11 translocation เพียงชนิดเดียว และเนื่องจากเป็นมะเร็งชนิดที่พบได้น้อยมาก จากการศึกษาครั้งนี้ จึงไม่พบอุบัติการณ์เกิดของ Xp11 translocation จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะความพิเศษ ของมะเร็งชนิดนี้ได้รายงานวิจัย

รายการอ้างอิง

- [1] Motzer, R.J., Bander, N.H., and Nanus, D.M. Renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 335 (1996) : 865-75.
- [2] Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Montironi, R., and Kirkali, Z. 2004 WHO Classification of the Tumors of the Adults. European Urology 49 (2006) : 798-805.
- [3] Zhou, M., Roma, A., and Galluzzi, C.M. The Usefulness of Immunohistochemical Markers in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms. Clin Lab Med. 25 (2005) : 247-54.
- [4] Argani, P., et al. Aberrant nuclear immunoreactivity for TFE3 in neoplasms with TFE3 gen fusions: A sensitive and specific immunohistochemical assay. Am J Surg Pathol. 27 (2003) : 750-61.
- [5] Thibodeau, G.A., and Patton, K.T. Anatomy & Physiology. 4th ed. pp. 824. Missouri: Mosby, 1999.
- [6] Moore, K.L., and Dalley, A.F. Clinical oriented Anatomy. 4th ed. pp. 285. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- [7] Martini, F.H., and Bartholomew, E.F. Structure and function of the human body. pp. 328. Prentice Hall, 1999.
- [8] Ljungberg, B., et al. Renal Cell Carcinoma Guideline. Actas Urologicas espanolas. 33 (2009) : 270-9.
- [9] Kovacs, G., et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. J Pathol. 183 (1997) : 131-3.
- [10] Lipworth, L., Tarone, R.E., and McLaughlin, J.K. The epidemiology of renal cell carcinoma. J Urol. 176 (2006) : 2353-8.
- [11] Bergstrom, A., et al. Obesity and renal cell cancer—a quantitative review. Br J Cancer. 85 (2001) : 984-90.
- [12] Trichopoulou, A., et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. Am J Epidemiol. 167 (2008) : 438-46.

- [13] Ferlay, J., et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol. 18 (2007) : 581-92.
- [14] Parkin, D.M., Whelan, S.L, Ferlay, J., Teppo, L., and Thomas, D.B. Cancer incidence in Five Continents. Lyon: IARC Press, 2003.
- [15] Parkin, D.M., Pisani, P., Lopaz, A.D., and Masuyer, E. At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Int J Cancer. 59 (1994) : 494-504.
- [16] Parkin, D.M., Whelan, S.L., Ferlay, J., Teppo, L., and Thomas, D.B. Overall evaluations of carcinogenicity. Lyon: IARC Press, 1987.
- [17] Chow, W.H., Gridley, G., Fraumeni, J.F., and Jarvholm, B. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. N Engl J Med. 343 (2000) : 1305-11.
- [18] Grossman, E., Messerli, F.H., Boyko, V., and Goldbourt, U. Is there an association between hypertension and cancer mortality?. Am J Med. 112 (2002) : 479-86.
- [19] Yuan, J.M., Castela, J.E., Gago-Dominguez, M., Ross, R.K., and Yu, M.C. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. Br J Cancer. 77 (1998) : 1508-13.
- [20] Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I., and Sesterhenn, I.A. World Health Organization Classification of Tumours. In Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, pp. 37-38. France: IARC press, 2004.
- [21] Sobin, L.H., Gospodariwicz, M., and Wittekind, C. TNM classification of malignant tumors. In UICC International Union Against Cancer, pp. 255-257. Wiley-Blackwell, 2009.
- [22] Herbert, T.C, and Francis, J.M. MEDICAL PROGRESS: Renal cell Carcinoma. N ENGL J MED. 353 (2005) : 23.
- [23] Gibbons, R.P., Monte, J.E., Correa, R.J.J., and Mason, J.T. Manifestations of renal cell carcinoma. Urology 8 (1976) : 201-6.

- [24] Murphy, W.M., Beckwith, J.B., and Farrow, G.M. Atlas of tumor pathology. In Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures, pp. 1885-1947. Washington D.C. : Armed Forces Institute of Pathology, 1994.
- [25] Bennington, J.L. Tumors of the kidney. In N. Javadpour and S.H. Barsky (eds.), Surgical Pathology of Urologic Diseases, pp.120-122.
- [26] Fukuoka, T., et al. Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature. Urol Int. 42 (1987) : 458-60.
- [27] Schraml, P., et al. Mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density and patient prognosis in Clear cell renal cell carcinoma. J Pathol. 196 (2002) : 186-93.
- [28] Vecchio, M.T., et al. DNA ploidy pattern in papillary renal cell carcinoma: Correlation with clinicopathological parameters and survival. Pathol Res Pract. 194 (1998) : 325-33.
- [29] Mydlo, J.H., and Bard, R.H. Analysis of papillary renal adenocarcinoma. Urology 30 (1987) : 529-34.
- [30] Amin, M.B., et al. Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: Histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. Am J Surg Pathol. 21 (1997) : 621-35.
- [31] Delahunt, B., et al. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. Hum Pathol. 32 (2001) : 590-5.
- [32] Ornstein, D.K., et al. Prevalence of microscopic tumors in normal appearing renal parenchyma of patients with hereditary papillary renal cancer. J Urol. 163 (2000) : 431-3.
- [33] Renshaw, A.A., and Corless, C.L. Papillary renal cell carcinoma: Histology and Immunohistochemistry. Am J Surg Pathol. 19 (1995) : 842-9.
- [34] Delahunt, B., and Eble, J.N. Papillary renal cell carcinoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. Mod Pathol. 10 (1997) : 537-44.

- [35] Mancilla-Jimenez, R., Stanley, R.J., and Blath, R.A. Papillary renal cell carcinoma: A clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases. Cancer 38 (1976) : 2469-80.
- [36] Galatica, Z., Kovatich, A., and Miettinen, M. Consistent expression of cytokeratin 7 in papillary renal cell carcinoma. J Urol Pathol. 3 (1995) : 205-11.
- [37] Tretiakova, M.S., et al. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 28 (2004) : 69-76.
- [38] Crotty, T.B., Farrow, G.M., and Lieber, M.M. Chromophobe cell renal carcinoma: Clinicopathological features of 50 cases. J Urol. 154 (1995) : 964-7.
- [39] Avery, A.K., Beckstead, J., Renshaw, A.A., and Corless, C.L. Use of antibodies to RCC and CD10 in differential diagnosis of renal neoplasms. Am J Surg Pathol. 24 (2000) : 203-10.
- [40] Martignoni, G., et al. Parvalbumin is constantly expressed in chromophobe renal carcinoma. Mod Pathol. 14 (2001) : 760-7.
- [41] McGregor, D.K., et al. Diagnosing primary and metastatic renal cell carcinoma: The use of the monoclonal antibody Renal Cell Carcinoma Marker. Am J Surg Pathol. 25 (2001) : 1485-92.
- [42] Argani, P., Antonescu, C.R., and Illei, P.B. Primary renal neoplasms with the ASPL-TFE3 gene fusion of alveolar soft part sarcoma: a distinctive tumor entity previously included among renal cell carcinomas of children and adolescents. Am J Clin Pathol. 159 (2001) : 179-92.
- [43] Xiao, L., Lu, X.Y., and Yin, Y.L. Clinicopathological features of renal cell tumor: An analysis of 229 cases. J Clin Exp Pathol. 22 (2006) : 158-64.
- [44] Armah, H.B., and Pawani, A.V. Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma. Arch Pathol Lab Med. 134 (2010) : 124-9.
- [45] Argani, P., et al. Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma in Adults: Expanded Clinical, Pathologic, and Genetic Spectrum. Am J Surg Pathol. 31 (2007) : 1149-60.

- [46] Komai, Y., et al. Adult Xp11 Translocation Renal cell Carcinoma Diagnosed by Cytogenetics and Immunohistochemistry. Clin Cancer Res. 15 (2009) : 1170-6.
- [47] Delahunt, B., et al. Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. Hum Pathol. 32 (2001) : 590-5.
- [48] Pignot, G., et al. Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: Prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. Urology 69 (2007) : 230-5.
- [49] Truong, L.D., and Shen, S.S. Immunohistochemical Diagnosis of Renal Neoplasms. Arch Pathol Lab Med. 135 (2011) : 92-109.
- [50] Schweizer, J., et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. J Cell Biol. 174 (2006) : 169-74.
- [51] Chu, P., Wu, E., and Weiss, L.M. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. Mod Pathol. 13 (2000) : 962-72.
- [52] Moll, R., et al. Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. Lab Invest. 49 (1983) : 599-610.
- [53] Skinnider, B.F., et al. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. Am J Surg Pathol. 29 (2005) : 747-54.
- [54] Allory, Y., et al. Profiling and classification tree applied to renal epithelial tumours. Histopathology 52 (2008) : 158-66.
- [55] Argani, P., and Ladanyi, M. Translocation Carcinomas of the Kidney. Clin Lab Med. 25 (2005) : 363-78.
- [56] Lin, F., Brown, R.E., Shen, T., Yang, X.J., and Schuerch, C. Immunohistochemical detection of P504s in primary and metastatic renal cell carcinomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 12 (2004) : 153-9.

- [57] Ohta, Y., Suzuki, T., Shiokawa, A., Mitsuya, T., and Ota, H. Expression of CD10 and cytokeratins in ovarian and renal clear cell carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 24 (2005) : 239-45.
- [58] Abrahams, N.A., et al. Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative study of histopathological, immunohistochemical and ultrastructural features using high throughput tissue microarray. Histopathology 45 (2004) : 593-602.
- [59] Zhang, Y., Li, Q., and Zhu, F. Subcellular localization of APMCF I and its biological significance of expression pattern in normal and malignant human tissue. J Exp Clin Cancer Res. 21 (2009) : 111-6.
- [60] Liu, L., et al. Immunohistochemical analysis of Chromophobe renal cell carcinoma, Renal oncocytoma, and Clear cell carcinoma. Arch Pathol Lab Med. 131 (2007) : 1290-7.
- [61] Tretiakova, M.S., et al. Expression of alphas-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 28 (2004) : 69-76.
- [62] Adley, B.P., Papavero, V., Sugimura, J., The, B.T., and Yang, X.J. Diagnostic value of cytokeratin 7 and parvalbumin in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. Anal Quant Cytol Histol. 28 (2006) : 228-36.
- [63] Skinnider, B.F., et al. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: Potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. Am J Surg Pathol. 29 (2005) : 747-54.
- [64] Pwint, T.P., Macaulay, V., Ian, R., Sullivan, M., and Protheroe, A. An adult Xp11.2 translocation renal carcinoma showing response to treatment with sunitinib. Urologic Oncology. Seminars and Original Investigations. 2009.

- [65] Srinivasa, R., et al. Common and uncommon histologic subtypes of renal cell carcinoma: imaging spectrum with pathologic correlation. Radio Graphics. 26 (2006) : 1795-1810.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุทธิพร นามนาค เกิดเมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2530 มีภูมิลำเนา บ้านเลขที่ 138/2 ม.8 ต. คลองใหญ่ อ. แหลงมอบ จ. ตราด 23120 ประเทศไทย

ประวัติการศึกษา

- ปีพ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยม โรงเรียนแหลงมอบวิทยาคม จังหวัดตราด
- ปีพ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
- ปีพ.ศ. 2552 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาพยาธิวิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย