

การแสดงออกของโปรตีนจิ้นมะเร็ง *c-erbB*₂ ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมในแมว

มัตยา ทวีชาติ¹ อรุมา สิริยาน¹ กฤษณรงค์ วงศ์บ้านคู¹
สุประดิษฐ์ หวังในธรรม¹ อัจฉริยา ไสละสูต¹ สุธสรร ศิริไวยพวงศ์² อนุเทพ รังสีพิพัฒน์^{1*}

Abstract

Mataya Taweechart¹ On-Uma Sirayayon¹ Grisnarong Wongbandue¹ Supradit Wangnaitam¹

Achariya Sailasuta¹ Sudson Sirividhayapong² Anudep Rungsipipat^{1*}

THE EXPRESSION OF C-ERBB₂ ONCOGENE PROTEIN AS A PROGNOSTIC FACTOR IN FELINE MAMMARY TUMORS

The study looked at the relationship between the expression of *c-erbB*₂ oncogene protein, histological types, PCNA and AgNORs indices, in feline mammary tumors. Sixty, surgically resected, mammary tumors from cats were collected and histological processed. The expression of *c-erbB*₂ oncogene protein was detected by immunohistochemistry and was seen in benign hyperplasia, adenosis and malignant groups. The *c-erbB*₂ oncogene protein expression in malignant, feline mammary tumors was 41.67% (25/60) which could be divided into simple tubular ACC, 25% (6/24), simple papillary ACC, 78.6% (11/14), solid carcinoma, 26.7% (4/15) and cribriform carcinoma, 57.14% (4/7). There were statistically significantly differences ($p<0.05$) in the expression of *c-erbB*₂ oncogene protein between simple tubular ACC, compared with simple papillary ACC and solid carcinomas. The expression of *c-erbB*₂ oncogene protein in specimens, classified by histological malignancy grades revealed, grade I, 42.11% and grade II, 41.46% but there was no statistically significant difference between them. An evaluation of a proliferative marker shown by a mean ($\pm$ SD) of PCNA, was 34.63 ± 23.87 and the mean ($\pm$ SD) of AgNORs was 1.23 ± 0.18 . There was no significant difference between the PCNA and AgNORs index of both the histological types and the histological malignancy grades. However, a statistical difference of mean PCNA and AgNORs indices was noted in both *c-erbB*₂ positive and *c-erbB*₂ negative groups. The mean PCNA indices and AgNORs indices in *c-erbB*₂ positive samples were 26.52 ± 18.68 and 1.12 ± 0.27 respectively, while the *c-erbB*₂ negative ones were 39.43 ± 26.24 and 1.28 ± 0.19 respectively. In conclusion, *c-erbB*₂ oncogene protein expression is considered to be an effective prognostic factor for adenocarcinoma subtypes of feline mammary tumors as it is in human and canine cases. However, integration of all the parameters (*c-erbB*₂ oncogene protein, PCNA index, AgNORs index, histological types and clinical data) may achieve a more precise prognosis in feline, mammary tumor cases.

Keywords : *c-erbB*₂, feline, mammary tumors, immunohistochemistry

¹Department of Pathology, ²Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

*Corresponding author

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา ²ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

มัตยา ทวีชาติ¹ อรุมา สิริยาน¹ กฤษณรงค์ วงศ์บ้านดู¹

สุประดิษฐ์ หวังในธรรม¹ อัจฉริยา ไสละสุต¹ สุดสรร ศรีไวยพงษ์² อนุเทพ รังสีพิพัฒน์^{1*}

การแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ในการพยากรณ์ โรคมะเร็งเต้านมในแมว

จุดประสงค์การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ค่าดัชนี PCNA (Proliferative cell nuclear antigen) ค่าดัชนี AgNORs (Argyrophilic nucleolar organizer region) ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมแมวจากชิ้นเนื้อจำนวน 60 ตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบในเซลล์เนื้องอกเยื่อเมือกเต้านมชนิด adenosis และ hyperplasia มะเร็งเต้านมให้ผลบวกร้อยละ 41.67 (25/60) ในกลุ่ม simple tubular adenocarcinoma ผลบวกร้อยละ 25 (6/24) กลุ่ม simple papillary adenocarcinoma ผลบวกร้อยละ 78.6 (11/14) กลุ่ม solid carcinoma ผลบวกร้อยละ 26.7 (4/15) และกลุ่ม cribriform carcinoma ผลบวกร้อยละ 57.14 (4/7) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของการแสดงออกของโปรตีนโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ระหว่างมะเร็งชนิด simple tubular adenocarcinoma กับชนิด simple papillary adenocarcinoma และระหว่างชนิด simple papillary adenocarcinoma กับชนิด solid carcinoma ส่วนการแสดงออกของ c-erbB₂ ในเนื้องอกที่มีระดับความรุนแรงเกรด I ให้ผลบวกร้อยละ 42.11 ส่วนเกรด II ให้ผลบวกร้อยละ 41.46 ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA เท่ากับ 34.63 ± 23.87 และค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.23 ± 0.18 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA และ AgNORs กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและระดับความรุนแรงของมะเร็ง แต่พบค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA และ AgNORs มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ ซึ่งมีค่า 26.52 ± 18.68 และ 1.12 ± 0.27 ตามลำดับ กับกลุ่มที่ไม่พบการแสดงออกของ c-erbB₂ มีค่า 39.43 ± 26.24 และ 1.28 ± 0.19 ตามลำดับ สรุปการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมแมวในกลุ่ม adenocarcinoma ได้เช่นเดียวกับสุนัขและคน แต่ควรใช้ร่วมกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และตัวบ่งชี้การกระจายของเซลล์มะเร็งชนิด PCNA และ AgNORs เพื่อให้การพยากรณ์โรคมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

คำสำคัญ : c-erbB₂ มะเร็งเต้านมแมว อิมมูโนฮิสโตเคมี

บทนำ

อุบัติการณ์มะเร็งเต้านมในแมวพบประมาณร้อยละ 10-15 ของมะเร็งที่พบในแมว ซึ่งพบเป็นอันดับ 3 รองจากมะเร็งระบบต่อมไร้ท่อและมะเร็งผิวหนัง (Jodi et al., 2002) เนื้องอกเต้านมในแมว มักพบชนิดร้ายแรงถึงร้อยละ 75 และประมาณร้อยละ 90 พบเป็นชนิดมะเร็งของต่อมน้ำนม (adenocarcinoma) นอกจากนี้ยังมีรายงานแมวที่ยังไม่เคยได้รับการผสมจะมีอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็งเต้านมสูงกว่าแมวที่ทำหมันแล้วถึง 7 เท่า ตำแหน่งที่พบเนื้องอกเต้านมมักพบบริเวณเต้านม 2 เต้าหลังมากกว่า 2 เต้าหน้า (Sherding, 1994) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกเต้านมในแมว สามารถแบ่งเป็นหลายชนิด ได้แก่ adenosis, tubular adenocarcinoma,

papillary adenocarcinoma และ solid carcinoma สำหรับชนิด anaplastic และ schirrhous carcinoma นั้นพบได้น้อย

ในทางสัตวแพทย์ได้มีการศึกษาหาปัจจัยการพยากรณ์โรค เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านม เช่น ระยะของโรคแบ่งตามระบบ Tumor Node Metastasis system (TNM system) ขนาดของก้อนมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมไร้ท่อและอวัยวะภายใน (Ito et al., 1996; Jodi et al., 2002; Viste et al., 2002) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การศึกษาลักษณะของนิวเคลียส (De Vico et al., 1995) การจัดระดับความรุนแรงของมะเร็ง (tumor grading) (Castagnaro et al., 1998) รวมถึง proliferative marker ผลผลิตของจีนมะเร็ง และตัวรับจำเพาะต่อฮอร์โมน เป็นต้น

จีนมะเร็งมีความเกี่ยวข้องในพยาธิกำเนิดของมะเร็งด้านม ทั้งด้านที่เป็น initiator และ promotor ซึ่งมีความสำคัญในการ ควบคุมการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรวมทั้งลักษณะการ แสดงออกของรูนต่อไป (Cockerell and Cooper, 2002) การ ที่จีนมะเร็งในกลุ่ม epidermal growth factor receptor (EGFR) มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งนั้น เนื่องจากจีนของตัว รับจำเพาะเกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เรียกว่าการเกิด gene amplification ตัวอย่างของจีนในกลุ่ม EGFR ที่มีผู้สนใจศึกษากันมาก คือ จีนมะเร็ง *c-erbB₂* การเพิ่มจำนวนของจีนชนิดนี้จะ หนึ่งยวนำให้เกิดการแสดงออกมากเกินไปของโปรตีน *c-erbB₂* (Kobayashi et al., 2002) เมื่อโปรตีนที่ได้จากตัวรับจำเพาะที่มี จำนวนมากถูกปล่อยออกจึงส่งสัญญาณให้เซลล์เกิดการแบ่ง ตัวมากมายจนกลายเป็นมะเร็ง

จีนมะเร็ง *c-erbB₂* มีชื่อพ้องว่า neu, HER2 มีความสำคัญ ในการควบคุมโปรตีนกลุ่ม transmembrane growth factor receptors มีน้ำหนักโมเลกุล 185 กิโลดาลตัน (p185) (Bortoli et al., 1991) มีสมาชิกในกลุ่ม *erbB* receptor family มีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ EGFR (*erbB₁*), *erbB₂*, *erbB₃* และ *erbB₄* (Tsutsui et al., 2003) พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่คล้าย *erbB₁* หรือ EGFR กระบวนการในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จากตัวรับ จำเพาะพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการ tyrosine phosphorylation และ phosphatidylinositol-specific phospholipase (PLC gamma) (Peles et al., 1991) โดยเกิด gene amplification หนึ่งยวนำให้เกิดการแสดงออกมากเกินไปของโปรตีน มีบทบาท สำคัญในขบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติของเซลล์ โดย epidermal growth factor จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีผลให้ *c-erbB₂* mRNA เพิ่ม จำนวนมากขึ้น จึงทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็ว และส่งผลให้เกิดมะเร็งในที่สุด

ในการศึกษาตัวรับจำเพาะ *c-erbB₂* บนเซลล์มะเร็งนั้น พบว่าจีน *c-erbB₂* มีการคัดลอกสายดีเอ็นเอเฉพาะตำแหน่ง ใน มะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อ เช่น มะเร็งเต้านม และรังไข่ มีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง รวมทั้งปัจจัยในการพยากรณ์โรค โดยพบว่าปริมาณโปรตีน *c-erbB₂* ที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของมะเร็ง (Quenel et al., 1995) ผลการศึกษาทางการแพทย์พบว่า *c-erbB₂* ช่วย ในการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (McCann et al., 1989) และจากการศึกษาโปรตีน *c-erbB₂* ในเนื้องอกเต้านม สุนัข พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวสัมพันธ์กับ การแพร่กระจายของโรค (Ahern et al., 1996; Rungsipipat

et al., 1999; Rungsipipat et al., 2003^b) ฉะนั้นการตรวจพบ การแสดงออกของโปรตีน *c-erbB₂* น่าจะนำมาใช้บ่งชี้ถึงความ รุนแรงและการแพร่กระจายของเนื้องอกเต้านมในแมว ได้ เช่นเดียวกัน

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) หรือ cyclin เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ ระหว่าง 8-20 ชม. (Preziosi et al., 1995) และเป็นโปรตีน ในนิวเคลียสที่มีการแสดงออกและเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของ เซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น auxilliary protein ของ DNA Polymerase- δ เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์และซ่อมแซม DNA (Lohr et al., 1997) พบว่าเซลล์ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีการ แบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (proliferative stage) จะมีการสังเคราะห์ PCNA เพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะ G_1 จนกระทั่งสูงสุดในช่วง S-phase และคงอยู่จนถึงระยะ G_2 และ M-phase (Pena et al., 1998) ดังนั้นโดยอาศัยการย้อมอิมมูโนโนฮิสโตเคมีด้วย แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PCNA จะใช้เป็น proliferating marker ในการพยากรณ์ เนื้องอกเต้านมของสุนัขและแมวได้ เป็นอย่างดี (Preziosi et al., 1995)

Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) ประกอบด้วย nucleolin ฟอสโฟไลปิดขนาดโมเลกุล 105 กิโลดาลตัน มีความสำคัญต่อขบวนการเกิดการคัดลอกสายของ rRNA nucleoplasmin (B23protein) และฟอสโฟไลปิดขนาด 38-39 กิโลดาลตัน รวมถึง sub-unit ของ RNA polymerase I และ UFB ขบวนการสังเคราะห์ rRNA จะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่มี โปรตีนเหล่านี้ จำนวนและขนาดของ AgNORs ที่อยู่ในนิวคลีโอลัสแต่ละอันจะแตกต่างกันไป ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดการ คัดลอกสายของ rRNA ในเซลล์ที่มี ribosome biogenesis ใน ระดับต่ำ โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นอย่างมากของ nucleolin และ nucleoplasmin จากระยะต้น G_1 phase และเพิ่มสูงสุดเมื่อสิ้นสุดระยะ S phase และยังคงอยู่ในระดับสูงจนถึงระยะท้ายของ G_2 phase (Derenzini and Ploton, 1991; Sirri et al., 2000) จำนวนของ AgNORs ในระยะ interphase เกี่ยวข้องกับขบวนการ เพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ เช่น การบอกอัตราการเพิ่มขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor mass growth rate) (Ploton et al., 1986) การพยากรณ์ระยะเวลา การมีชีวิตหลังผ่าตัดในแมวที่เป็นมะเร็งเต้านม (Castagnaro et al., 1998) การใช้ AgNORs ร่วมกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และตัวบ่งชี้อื่นๆ เพื่อพยากรณ์การมีชีวิตรอดในแมวที่เป็น มะเร็งเต้านม (Preziosi et al., 2002; Rungsipipat et al., 2003^b)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ เนื้อเยื่อเต้านมที่งอกขยาย และมะเร็งเต้านมในแมว ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ กับประเภทของเนื้องอกและระดับความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา ข้อมูลทางคลินิก โดยใช้ระบบ TNM และ คัดสี PCNA และคัตสี AgNORs ในแมวที่เป็นมะเร็งเต้านม

วัสดุและวิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างทั้งแบบย้อนหลัง (retrospective) และแบบไปข้างหน้า (prospective) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง 2546 โดยเก็บตัวอย่างเต้านมแมวปกติ 5 ตัวอย่าง เต้านมที่ขยายขนาด 4 ตัวอย่างจากแมวที่ดัดท้อง และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้องอกจำนวน 60 ตัวอย่าง และ/หรือค้อนมน้ำเหลืองข้างเคียงจากเต้านมแมวที่มารับบริการรักษาที่หน่วยสูติกรรม โรงพยาบาล สัตว์เล็ก และตรวจวินิจฉัย ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการเก็บรวบรวมข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย เช่น อายุ เพศ และข้อมูลของก้อนมะเร็งตาม TNM system (Tumor Node Metastasis system) ซึ่งได้แก่ ขนาดและลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะอื่นๆ รวมทั้งติดตามรวบรวมข้อมูลการรักษา ได้แก่ ระยะเวลาการหายจากโรค ระยะเวลาการเกิดใหม่ของก้อนเนื้องอก

เก็บตัวอย่างในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินตามขั้นตอนเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา ซึ่งเริ่มจากดิ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์ 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำมาผ่านไซลีนและแช่ในพาราฟินฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4-6 ไมครอน และย้อมสี hematoxylin and eosin (H&E)

- **ให้การวินิจฉัยประเภททางจุลพยาธิวิทยา (histopathological type)** ตาม World Health Organization (WHO) classification of tumor in domestic animals (Hampe and Misdrop, 1974; Misdrop, 2002) ได้แก่ benign dysplasia, adenosia, cystic hyperplasia และ duct ectasia, simple tubular adenocarcinoma, simple papillary adenocarcinoma, solid carcinoma, cribriform carcinoma

- **จำแนกประเภทตามระดับความรุนแรง (histologic malignancy grade)** (Castagnaro, 1998; Misdrop, 2002) แบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ เกรด I, II และ III สังเกตจากลักษณะการจัดเรียงตัวเป็นท่อ รูปร่างของเซลล์ นิวเคลียสและ

ไซโตพลาสซึม และคัตสีการแบ่งตัว โดยจะแบ่งระดับจากการให้คะแนน ดังนี้

ระดับของการเรียงตัวแบบท่อ (degree of tubule formation): มีการเรียงตัวแบบท่อชัดเจน (>75%) ให้ 1 คะแนน ให้ 2 คะแนนเมื่อมีการเรียงตัวของท่อแบบปานกลาง (10-75%) และให้ 3 คะแนนเมื่อมีการเรียงตัวแบบท่อเพียงเล็กน้อยหรือไม่พบเลย (<10%) ลักษณะการติดสีเข้มของโครมาตินและเซลล์ในระยะไมโทซิส (hyperchromatism and mitoses): ให้ 1 คะแนนถ้าพบลักษณะการติดสีเข้มของโครมาตินหรือ mitotic figure 0-7 เซลล์ใน 1 HPF ให้ 2 คะแนน ถ้าพบ 8-14 เซลล์ใน 1 HPF และให้ 3 คะแนนเมื่อพบมากกว่า 15 เซลล์ ขนาดและรูปร่างของนิวเคลียสที่ผิดปกติ (irregular size and shape of nuclei): ให้ 1 คะแนนถ้านิวเคลียสมีขนาดรูปร่าง และการติดสีที่ใกล้เคียงกัน และให้ 3 คะแนนเมื่อมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จากนั้นนำคะแนนที่ได้มารวมกันสามารถแบ่งได้ดังนี้ คือ คะแนนรวม 3-5 คะแนน คือ เกรด I (well differentiated) คะแนนรวม 6-7 คะแนน คือ เกรด II (moderately differentiated) คะแนนรวม 8-9 คะแนน คือ เกรด III (poorly differentiated)

การตรวจการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยวิธี Avidin Biotin peroxidase Complex (ABC) (Rungsipat et al., 1999)

ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟินให้มีความหนา 4-6 ไมครอน ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในไซลีน Antigen retrieval โดยนำสไลด์เข้าเครื่องอบไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 5 นาที ใน PBS ทำการกำจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ 3% H₂O₂ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ทำการ block non-specific background ด้วยการใส่ 0.1% bovine serum albumin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ rabbit polyclonal anti-human c-erbB₂ oncoprotein (Dako®, Denmark) ความเข้มข้น 1:100 ลงบนสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที หรือข้ามคืนที่ 4°C. หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated goat anti-rabbit IgG (Dako®, Denmark) ความเข้มข้น 1:200 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที นำ avidin-biotin complex peroxidase solution (Dako®, Denmark) หยดลงบนสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาให้เกิด สีด้วยน้ำยา DAB (0.05% diaminozidinetetrachloride ใน 0.05 M Tris HCl pH 7.6 และ 0.03% H₂O₂) ย้อมสีทับด้วย Mayer's

hematoxylin ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงขาว สำหรับตัวควบคุมบวกคือ มะเร็งในเต้านมคนชนิด human intraductal carcinoma (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ)

แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดผลการตรวจสอบผลการแสดงออกของ c-erbB₂ ตามการประเมินแบบ semiquantitative (Jing et al., 1999) โดยนับจำนวนเซลล์มะเร็งของเยื่อบุต่อมน้ำนม (glandular epithelial tumor cells) ที่ติดสีย้อม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x ตรวจจำนวน 500 เซลล์ แล้วจัดแบ่งเป็น 4 เกรด คือ เกรด - : เซลล์มะเร็งติดสีน้อยกว่าร้อยละ 10 เกรด + : เซลล์มะเร็งติดสีประมาณร้อยละ 10-30 เกรด ++ : เซลล์มะเร็งติดสีประมาณร้อยละ 30-70 และ เกรด +++ : เซลล์มะเร็งติดสีมากกว่าร้อยละ 70

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีของ PCNA

การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) (Simoes et al., 1994; Rungsipat et al., 2003^a) ทำตามขั้นตอนข้างต้นของการย้อม c-erbB₂ หยดแอนติบอดีปฐภูมิ monoclonal mouse anti-PCNA antibody (Dako®, Denmark) ความเข้มข้น 1:200 ลงบนสไลด์ที่ไว้ข้ามคืนที่ 4°C. หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated rabbit anti-mouse IgG (Dako®, Denmark) ในอัตราส่วน 1:400 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที นำ avidin-biotin complex peroxidase solution (Dako®, Denmark) หยดลงบนสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 60 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาให้เกิด สีด้วยน้ำยา DAB ย้อมสีทับด้วย Mayer's hematoxylin ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงขาวโดยใช้กำลังขยาย 40X นับเซลล์มะเร็งจำนวน 500 เซลล์ แสดงผลเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกติดสีย้อมที่นิวเคลียสของเซลล์ ตัวควบคุมบวกที่ใช้ คือ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารหนูขาว

การย้อมฮิสโตเคมีชนิด AgNORs (Rungsipat et al., 2003^a)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน หยดสารละลาย gelatin aqueous 45 ไมโครลิตร ลงบนชิ้นเนื้อ และหยดสารละลายเข้มข้น silver nitrate 55 ไมโครลิตร บ่มในห้องมืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หยด fixing solution นาน 1 นาที ศึกษาการติดสีในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องตัวอย่างโดยไม่ใช้หลักความน่าจะเป็นแบบเจาะจง (Crocker et al., 1989) โดยนับจำนวน AgNORs ซึ่งเป็นจุดสีดำในนิวเคลียสหรือที่กระจายอยู่ในนิวเคลียส AgNORs ที่มีการ

รวมกันเป็นกลุ่มให้นับเป็น 1 อัน โดยทำการนับจากเซลล์จำนวน 200 เซลล์ ภายใต้กำลังขยาย 100X และใช้ green filter ค่า AgNORs ที่นับได้จะนำมาหาเป็น ค่าเฉลี่ย AgNORs ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากจำนวน AgNORs ทั้งหมดที่นับแล้วหารด้วยจำนวนนิวเคลียส ทั้งหมดที่นับ (De Vico et al., 1995; Xie et al., 1999)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ประเมินความสัมพันธ์ร่วมระหว่างการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ กับ ลักษณะและความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยา และข้อมูลอื่นๆ ทางคลินิก โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วย Chi-square หรือ Fisher exact test การประเมินความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอก ระดับความรุนแรงของเนื้องอก และข้อมูลอื่นๆ ทางคลินิก กับค่าดัชนี PCNA และ ดัชนี AgNORs โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ จากโปรแกรมทางสถิติ Minitab™ version 31.12 (Minitab Inc., USA)

ผล

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ชิ้นเนื้อจำนวน 60 ตัวอย่าง จำแนกประเภท histopathological type ตาม WHO ได้เป็น 4 ประเภท คือ ชนิด simple tubular adenocarcinoma ร้อยละ 40 (24/60) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมสร้างน้ำนมที่มีการจัดเรียงตัวแบบท่อ การจัดเรียงตัวประมาณ 1-2 ชั้น เซลล์มีรูปร่างคล้ายเซลล์เยื่อบุ อาจพบเนื้องอกบริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้อพร้อมด้วย (รูปที่ 1ก.) ชนิด simple papillary adenocarcinoma ร้อยละ 23.33 (14/30) มีการเรียงตัวของเซลล์มะเร็งคล้ายกิ่งไม้หรือนิ้วมือ โดยจัดเรียงตัวตามเนื้อเยื่อข้างๆ ประมาณ 1-5 ชั้น จำนวนชั้นที่พบส่วนใหญ่ คือ 1-2 ชั้น (รูปที่ 1ข.) ชนิด solid carcinoma ร้อยละ 25 (15/60) พบการจัดเรียงตัวของเซลล์มะเร็งอัดแน่นเป็นกลุ่มก้อน โดยไม่พบการจัดเรียงตัวแบบท่อ เซลล์มะเร็งมีลักษณะของ pleomorphism และ nuclear atypia มากขึ้น (รูปที่ 1ค.) ชนิด cribriform carcinoma ร้อยละ 11.66 (11/60) เซลล์มะเร็งมีการจัดเรียงตัวเป็นแถวคล้ายซี่หวีล้อมรอบกลุ่มเนื้อตายที่อยู่ตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะในมะเร็งเต้านมของแมว (รูปที่ 1ง.) แต่ละตัวอย่าง อาจพบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้มากกว่า 1 ประเภท ซึ่งการบ่งชี้ประเภทของเนื้องอกดังกล่าว ถือเอาประเภทที่มีสัดส่วนมาก

ที่สุดเป็นหลัก แต่หากมีสัดส่วนของประเภทที่ใกล้เคียงกัน การรายงานผลจะอาศัยความรุนแรงของประเภทนี้เอง นอกจากนี้เป็นที่สังเกตว่าในกรณีของ simple tubular adenocarcinoma มักจะพบลักษณะของ hyperplasia หรือ adenosis ร่วมอยู่ด้วย (รูปที่ 1จ. และ 1ค.)

การแบ่งระดับความรุนแรงพบว่า เกรด II (moderately differentiated) มีจำนวนมากที่สุดร้อยละ 68.33 (41/60) เกรด I (well differentiated) ร้อยละ 31.66 (19/60) และไม่มีตัวอย่างของเกรด III (poorly differentiated) โดยเกรด I ยังพบการเรียงตัวแบบท่อชัดเจน (มากกว่าร้อยละ 75) พบ mitotic cell จำนวน 0-7 cells/HPF ลักษณะของนิวเคลียสมีขนาด รูปร่าง และการจัดสีที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 2ก.) ส่วนในเกรด II พบการเรียงตัวแบบท่อน้อยลง (น้อยกว่าร้อยละ 75) พบ mitotic cell มากกว่า 7 cells/HPF ลักษณะของนิวเคลียสมีขนาด รูปร่าง และการจัดสีที่ผิดปกติอย่างชัดเจน เช่น พบ vesicular nuclei และ นิวคลีโอไลต์ชัดเจน (รูปที่ 2ข.) (ตารางที่ 1)

การแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB

การแสดงออกของ c-erbB₂ จากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม คนในสไลด์ควบคุมพบว่ามีเซลล์ที่ให้ผลบวกติดสีเหลือง น้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลซึ่งจะปรากฏอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 3ก.) สำหรับในเซลล์มะเร็งเต้านม พบการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสซึมโดยทั่วไป มีความเข้มข้นที่เยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับในตัวอย่างควบคุม จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ร้อยละ 41.67 (25/60) มีการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ในขณะที่ร้อยละ 58.33 (35/60) ไม่พบการแสดงออกของ c-erbB₂ ระดับการแสดงออกของ c-erbB₂ มี 3 ระดับ คือ ระดับ +, ++, +++ ซึ่งพบการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 15 (9/60), 15 (9/60) และ 11.6 (7/60) ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 1

การแสดงออกของ c-erbB₂ ในตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมที่มีการงอกขยาย ทั้งชนิด adenosis และ glandular hyperplasia นั้น พบมีการติดสีบริเวณไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม แต่ความเข้มของการให้ผลบวกจะน้อยกว่าเซลล์มะเร็งเต้านม (รูปที่ 4ข.) โดยสามารถพบการติดสีของเซลล์ที่มีการเรียงตัวเป็นท่อได้เกือบทุกเซลล์

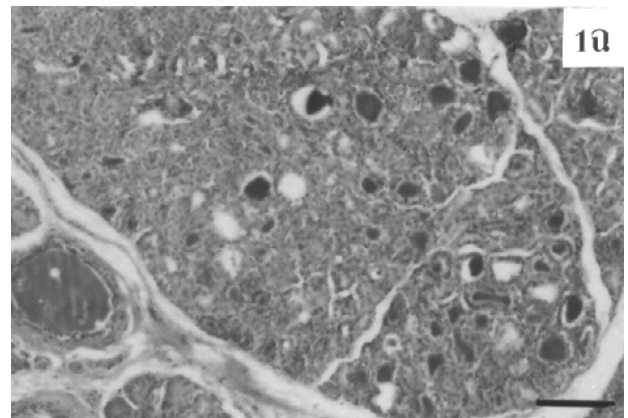
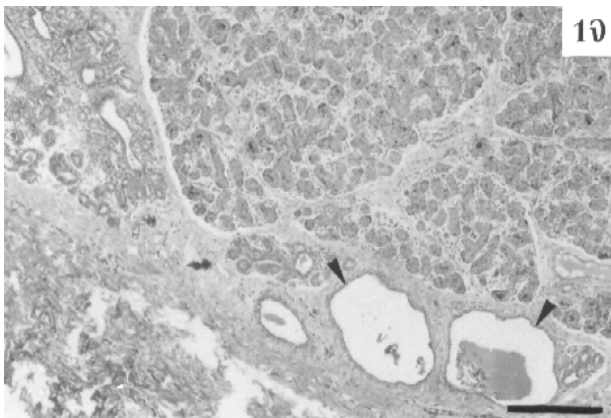
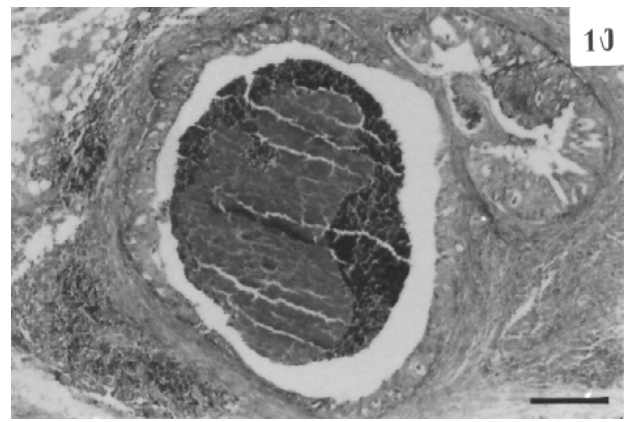
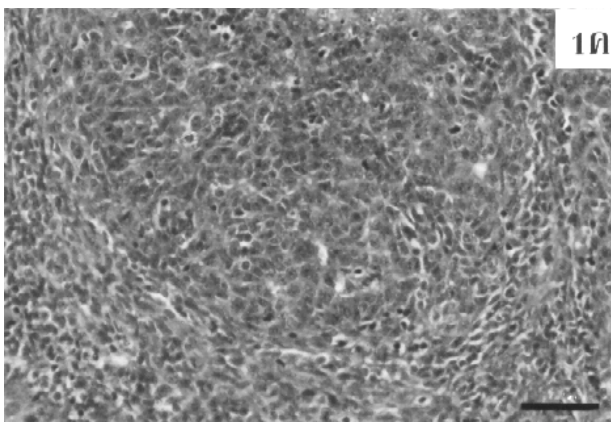
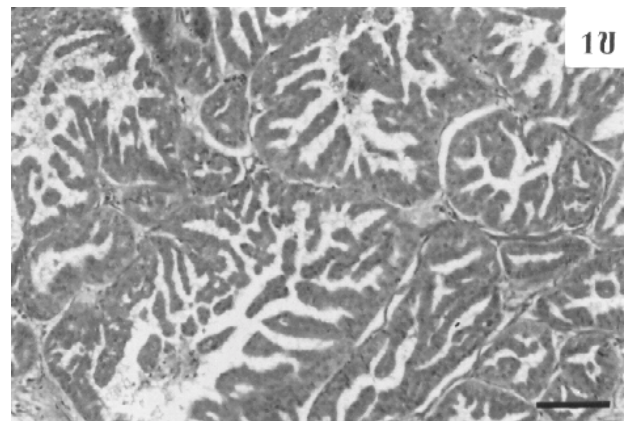
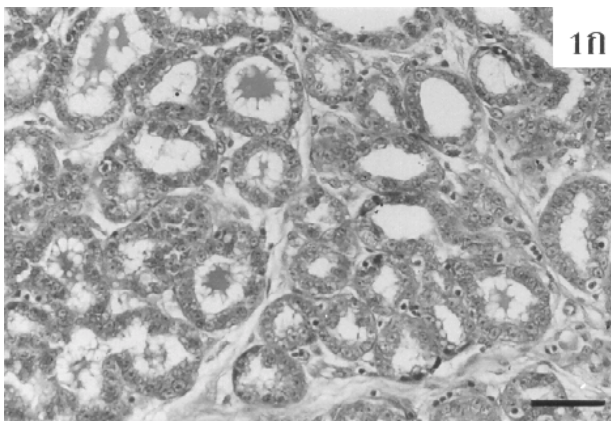
มะเร็งชนิด simple tubular adenocarcinoma มีการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 25 (6/24) (รูปที่ 3ข.) มะเร็งชนิด simple papillary adenocarcinoma มีการแสดงออกของ

c-erbB₂ ร้อยละ 78.6 (11/14) (รูปที่ 3ค.) มะเร็งชนิด solid carcinoma มีการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 26.7 (4/15) (รูปที่ 3ง.) มะเร็งชนิด cribriform carcinoma พบการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 57.14 (4/7) (รูปที่ 4ค.) เมื่อทำการวิเคราะห์ประเภทของมะเร็งเต้านมแมวต่อการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างกลุ่มที่จำแนกทางจุลพยาธิวิทยา โดยพบว่า มะเร็งชนิด simple papillary adenocarcinoma มีการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ สูงกว่ากลุ่มที่เป็น simple tubular adenocarcinoma ($p=0.002$) และ solid carcinoma ($p=0.005$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มมะเร็งชนิด simple tubular adenocarcinoma กับ solid carcinoma ($p=0.908$) สำหรับมะเร็งชนิด cribriform carcinoma นั้น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มอื่นๆ (ตารางที่ 2)

ผลการแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ ต่อระดับความรุนแรงของมะเร็ง พบการแสดงออกในมะเร็งเกรด I คิดเป็นร้อยละ 42.11 (8/19) มะเร็งเกรด II คิดเป็นร้อยละ 41.46 (17/41) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.963$) ระหว่างการแสดงออกของ c-erbB₂ ในเกรด I และ เกรด II (ตารางที่ 3)

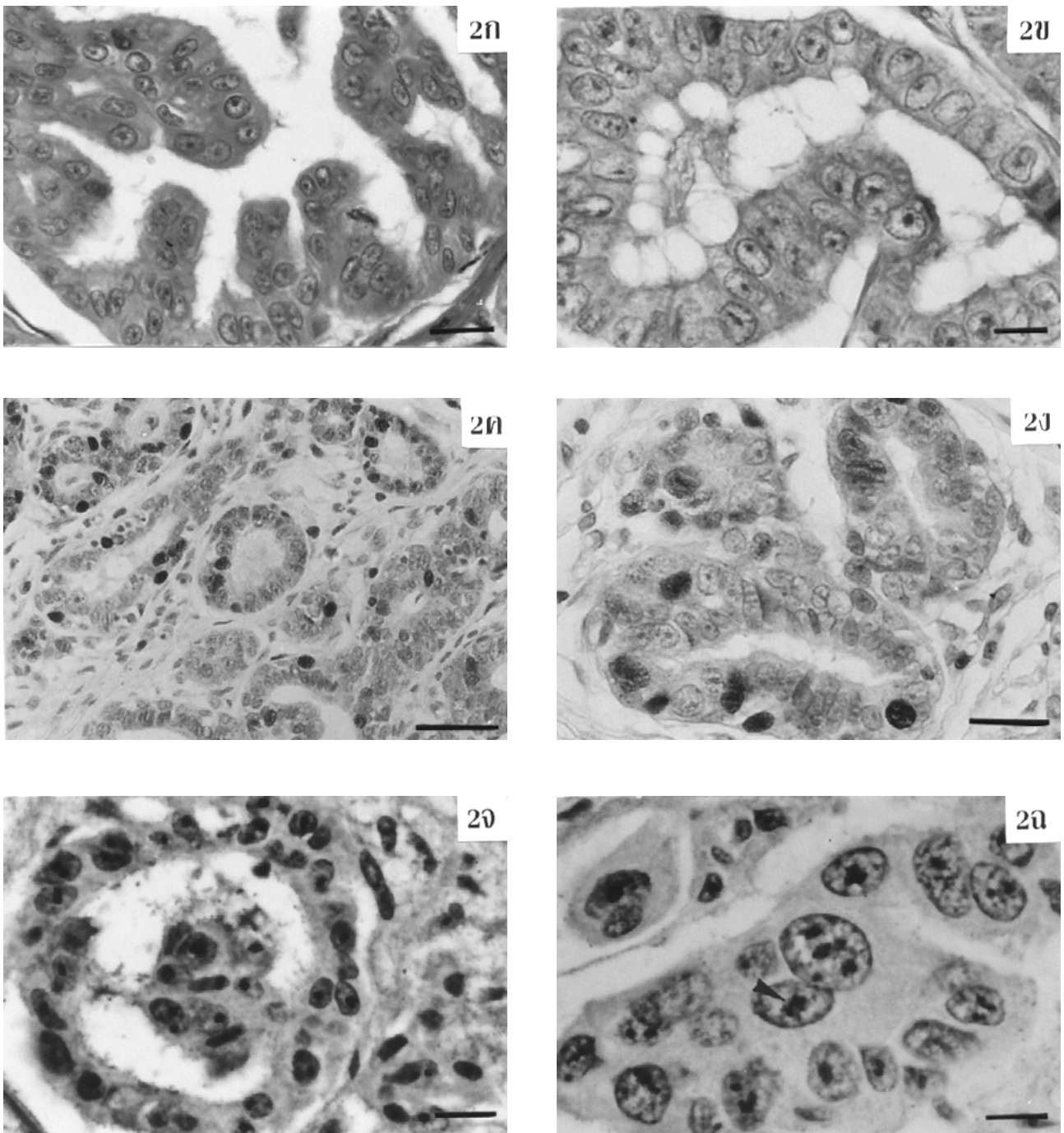
ค่าดัชนี PCNA

ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ให้ผลบวกต่อ PCNA จะพบการติดสีน้ำตาล-ส้มจนถึงสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส (รูปที่ 2ค. และ 2ง.) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA เท่ากับ 34.63 ± 23.87 พบว่าร้อยละ 42.37 (25/59) ของตัวอย่าง มีค่าดัชนี PCNA สูงกว่า ค่าเฉลี่ย ขณะที่ร้อยละ 57.63 (34/59) ของตัวอย่างมีค่าดัชนี PCNA ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย และพบว่าจำนวนชิ้นเนื้อ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ PCNA เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าดัชนี PCNA ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ($p=0.814$) และเกรดของมะเร็ง ($p=0.972$) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ และกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ โดยพบว่าค่าเฉลี่ย PCNA ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ มีค่าเท่ากับ 26.52 ± 18.68 ส่วนกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ มีค่าเท่ากับ 39.43 ± 26.24 (ตารางที่ 2 และ 4)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาตาม WHO (Hampe and Misdrop, 1974) ของมะเร็งเต้านมในแมว (H&E)

- ก. Simple tubular adenocarcinoma (bar = 20 μ m)
- ข. Simple papillary adenocarcinoma (bar = 50 μ m)
- ค. Solid carcinoma (bar = 20 μ m)
- ง. Cribiform carcinoma (bar = 20 μ m)
- จ. Benign dysplasia ชนิด hyperplasi และ cyst (หัวลูกศร) (bar = 50 μ m)
- ฉ. Benign dysplasia ชนิด adenosis (bar = 20 μ m)



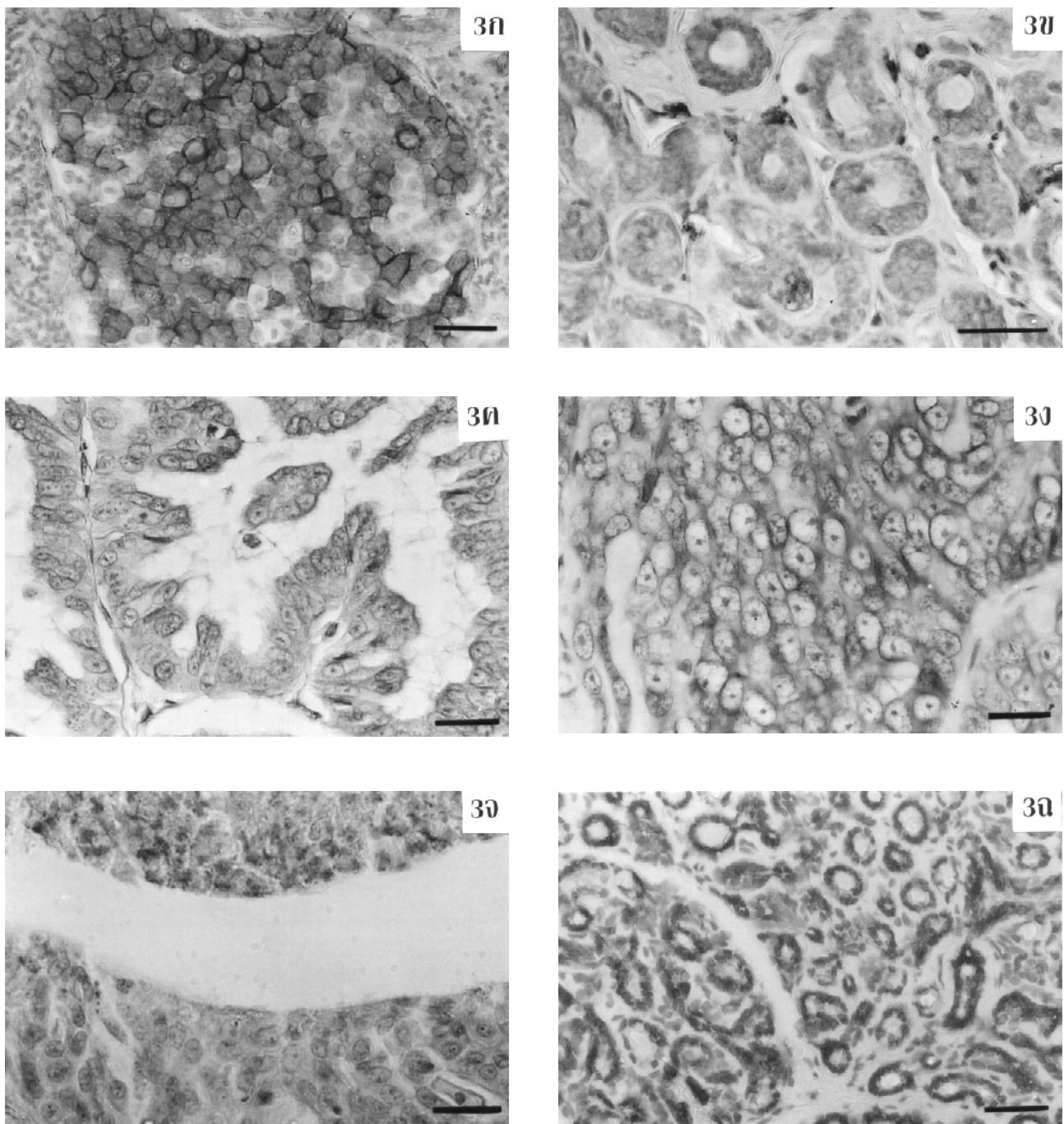
รูปที่ 2 แสดงระดับความรุนแรงของเนื้องอก การย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีชนิด PCNA และสีฮิสโตเคมี AgNORs

ก. เกรด I (well differentiated) (bar = 10 μ m)

ข. เกรด II (moderately differentiated) (bar = 5 μ m)

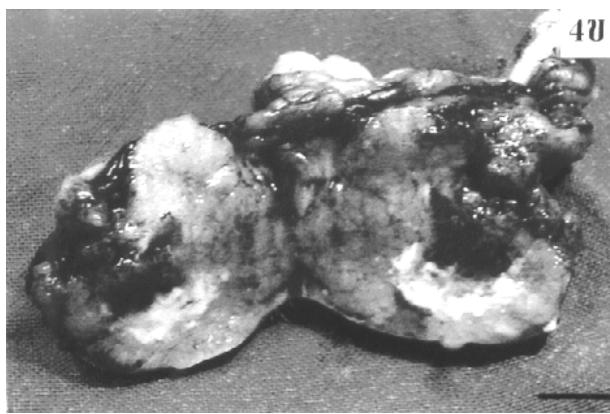
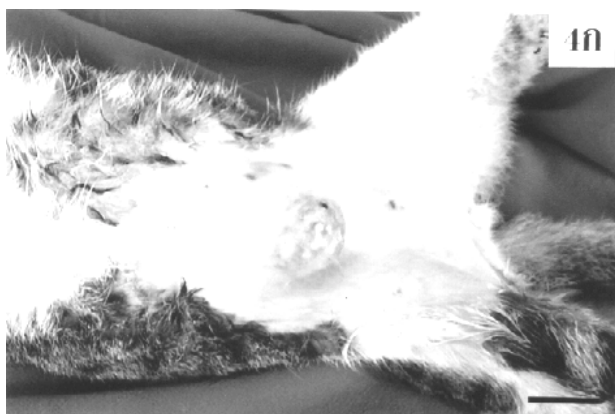
ค. ง. เซลล์มะเร็งที่ให้ผลบวกต่อ anti-PCNA; ABC-method, DAB, ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin (bar = 20 μ m)

จ. ฉ. ตำแหน่งของ AgNORs ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์เนื้องอกเต้านมแมว (bar = 10 μ m และ 5 μ m ตามลำดับ)



รูปที่ 3 การแสดงออกของโปรตีนจิ้นมะเร็ง $c\text{-erbB}_2$ ในมะเร็งเต้านมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี; ABC-method, DAB, ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin

- ก. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มเต้านมในคน ชนิด invasive ductal carcinoma (ตัวควบคุมบวก) โดยพบการติดสีน้ำตาลที่เยื่อหุ้มเซลล์ (bar = 20 μm)
- ข. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์มะเร็งชนิด simple tubular adenocarcinoma (bar = 20 μm)
- ค. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์มะเร็งชนิด simple papillary adenocarcinoma (bar = 10 μm)
- ง. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์มะเร็งชนิด solid carcinoma (bar = 10 μm)
- จ. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์มะเร็งชนิด cribriform carcinoma (bar = 20 μm)
- ฉ. ผลบวกของ $c\text{-erbB}_2$ ในเซลล์เนื้องอกชนิด hyperplasia (bar = 20 μm)



รูปที่ 4 แสดงก้อนเนื้ออกเต้านมแมว

ก. แสดงก้อนเนื้ออกเต้านมแมว ที่อยู่บริเวณเต้านมคู่สุดท้าย (bar = 2.5 ซม.)

ข. แสดงภาพตัดขวางก้อนเนื้ออกเต้านมแมว (bar = 1 ซม.)

ค่าดัชนี AgNORs

สำหรับ AgNORs จะติดสีของ silver nitrate ทำให้เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลดำ โดยจะพบการกระจายตัวของ AgNORs เป็นจุดเล็กๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออาจพบเพียงจุดเดียว (รูปที่ 2ก. และ 2ข.) ค่าเฉลี่ยของดัชนี AgNORs รวม คือ 1.23 ± 0.18 ซึ่งพบว่า ร้อยละ 42.37 (25/59) มีค่าดัชนี AgNORs สูงกว่าค่าเฉลี่ย และร้อยละ 57.63 (34/59) มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ย พบว่าดัชนี AgNORs ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ($p=0.476$) และเกรดของมะเร็ง ($p=0.205$) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ และกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ โดยพบว่า ค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ จะมีค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.12 ± 0.27 ส่วนกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของ c-erbB₂ จะมีค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.28 ± 0.19 (ตารางที่ 2 และ 4)

ข้อมูลทางคลินิก

ผลการศึกษาเนื้องอกเต้านมจากข้อมูลจำนวนตัวอย่าง ลักษณะทางพยาธิวิทยา และลักษณะทางคลินิกของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในตารางที่ 1 ขนาดของก้อนเนื้องอกจำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่ามีขนาดตั้งแต่ 0.8-8 ซม. โดยมีค่าเฉลี่ยที่ $3.27 (1.68 \text{ ซม.})$ และเมื่อนำมาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ขนาดเล็กกว่า 3 ซม. ร้อยละ 50 (30/60) กลุ่มที่ 2 ขนาด 3 ถึง 5 ซม. ร้อยละ 40 (24/60) และกลุ่มที่ 3 ขนาดใหญ่กว่า 5 ซม. ร้อยละ 10 (6/60) ดังแสดงในตารางที่ 1 พบมีการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 43.33

(13/30) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA เท่ากับ 34.4 ± 25.27 ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.28 ± 0.22 กลุ่มที่ 2 พบการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 37.5 (9/24) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA เท่ากับ 29.84 ± 23.94 ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.19 ± 0.11 และกลุ่มที่ 3 พบการแสดงออกของ c-erbB₂ ร้อยละ 33.33 (2/6) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA เท่ากับ 40.57 ± 13.9 ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.16 ± 0.10 ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 4 จากการวิเคราะห์ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติระหว่างขนาดของก้อนเนื้องอกกับการแสดงออกของ c-erbB₂ ดัชนี PCNA และดัชนี AgNORs ($p>0.05$)

สำหรับข้อมูลทางด้านอายุนั้นสามารถเก็บข้อมูลได้ทั้งหมด 39 ตัวอย่าง จากกลุ่มตัวอย่างพบว่าเกิดมะเร็งได้ตั้งแต่อายุ 4-20 ปี มีค่ามัธยฐาน (mean) 9.77 ปี ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.85 ค่ามัชฌิมเลขคณิต (median) ที่ 10 ปี และค่าฐานนิยม (mode) 10 ปี ดังแสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากข้อมูลทางด้านอายุ การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองหรืออวัยวะภายใน และข้อมูลภายหลังการรักษา ไม่สามารถติดตามได้จากการศึกษาครั้งนี้ จึงไม่สามารถนำมารวบรวมเพื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติได้

วิจารณ์

การแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง c-erbB₂ โดยการข้ามอิมมูโนโนฮิสโตเคมีพบว่าการติดสีของเซลล์มะเร็ง เต้านมสตรีเกิดขึ้นอย่างชัดเจนที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ในขณะที่มะเร็งเต้านมของแมวสามารถพบการติดสีทั้งบริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมและไซโตพลาสซึม ซึ่งพบในมะเร็งเต้านมสตรีได้เช่นกัน (Kerns et al., 1990) และพบว่าสอดคล้องกับรายงาน

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่าง ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา อายุ ขนาดของก้อนเนื้อ เกรด และผลการแสดงออกของ c-erbB₂,
ดัชนี PCNA และ ดัชนี AgNORs

หมายเลข	อายุ (ปี)	ขนาดของ ก้อนเนื้อ (ซม.)	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา	เกรด	การแสดงออก ของ c-erbB ₂	ดัชนี PCNA (ร้อยละ)	ดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)
1	11	5	Simple papillary ACC	I	+++	44.53	1.044
2	10	3	Simple tubular ACC	II	-	34.73	1.196
3	10	5	Simple tubular ACC	II	-	65.93	1.142
4	10	4	Simple papillary ACC	I	++	34.07	1.116
5	8	8	Cribiform carcinoma	II	++	55.93	1.044
6	-	2.5	Simple tubular ACC	II	-	65.80	1.092
7	8	6	Simple tubular ACC	I	-	39.06	1.120
8	10	2	Simple tubular ACC	II	+	22.13	1.112
9	-	1.5	Cribiform carcinoma	II	+	30.07	1.172
10	10	5	Simple tubular ACC	II	-	63.20	1.154
11	-	1	Simple tubular ACC	II	+	24.73	1.056
12	6	5	Solid carcinoma	II	-	45.33	1.186
13	8	1.5	Simple tubular ACC	I	-	35.69	1.080
14	8	5	Simple tubular ACC	II	-	22.20	1.048
15	-	2	Cribiform carcinoma	II	+++	-	-
16	7	1	Solid carcinoma	II	++	41.60	1.104
17	10	5	Simple tubular ACC	I	-	36.67	1.038
18	5	3	Solid carcinoma	II	+++	29.20	1.096
19	4	2.5	Simple tubular ACC	II	-	23.53	1.016
20	-	0.8	Simple tubular ACC	II	+	21.00	1.080
21	8	1	Simple tubular ACC	I	++	40.69	1.086
22	10	7	Solid carcinoma	II	-	56.73	1.192
23	10	2	Simple papillary ACC	II	+++	68.33	1.040
24	12	2.5	Solid carcinoma	II	-	13.20	1.210
25	6	7	Simple tubular ACC	II	-	21.33	1.280
26	13	7	Solid carcinoma	II	+++	39.55	1.144
27	14	2.5	Simple tubular ACC	I	-	75.20	1.516
28	9	4	Simple papillary ACC	II	-	79.00	1.195
29	8	3.5	Simple tubular ACC	II	-	14.30	1.356
30	10	4	Simple tubular ACC	I	-	5.20	1.459
31	-	2	Simple tubular ACC	I	+	15.70	1.362
32	-	2.5	Cribiform carcinoma	II	-	66.50	1.439
33	10	6	Solid carcinoma	II	-	30.80	1.328
34	9	2.5	Simple papillary ACC	I	+++	9.10	1.535
35	11	4	Simple papillary ACC	I	+	9.90	1.176
36	-	2.5	Cribiform carcinoma	II	++	16.20	1.072

หมายเลข	อายุ (ปี)	ขนาดของ ก้อนเนื้อ (ซม.)	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา	เกรด	การแสดงออก ของ c-erbB ₂	ดัชนี PCNA (ร้อยละ)	ดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)
37	13	3.5	Simple papillary ACC	I	++	18.20	1.172
38	-	2	Simple papillary ACC	II	+	32.50	1.500
39	10	3.5	Solid carcinoma	II	-	88.60	1.300
40	9	2.5	Simple tubular ACC	I	-	88.00	1.233
41	7	3	Solid carcinoma	II	-	18.00	1.290
42	-	2	Simple tubular ACC	I	-	1.60	1.423
43	-	1.5	Simple papillary ACC	II	++	12.80	1.273
44	9	4	Simple papillary ACC	I	-	47.30	1.123
45	15	2.5	Cribiform carcinoma	II	-	17.70	1.925
46	-	3	Solid carcinoma	II	-	5.00	1.253
47	-	2	Solid carcinoma	II	-	40.20	1.698
48	11	4	Solid carcinoma	II	-	73.30	1.310
49	11	5	Simple papillary ACC	II	++	3.90	1.055
50	-	2	Simple papillary ACC	I	-	22.40	1.385
51	-	1.5	Cribiform carcinoma	II	-	85.30	1.283
52	20	1	Simple papillary ACC	I	++	64.80	1.168
53	-	3	Solid carcinoma	II	-	28.80	1.094
54	-	3	Simple tubular ACC	II	+	11.10	1.348
55	-	3	Solid carcinoma	II	+	13.40	1.105
56	9	4.5	Simple tubular ACC	I	-	20.80	1.362
57	-	2	Simple tubular ACC	I	-	10.70	1.549
58	12	3	Simple tubular ACC	II	-	19.40	1.218
59	-	4	Simple papillary ACC	II	+++	3.60	1.240
60	-	2	Solid carcinoma	II	-	18.40	1.260
ค่าเฉลี่ย		3.27±1.68				34.63±23.87	1.23±0.18

หมายเหตุ ACC : adenocarcinoma, I : well differentiated grade, II : moderately differentiated grade

- : negative, + : mild positive, ++ : moderate positive, +++ : strong positive

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เกรด ขนาดของก้อนเนื้อกับการแสดงออกของ c-erbB₂,
ดัชนี PCNA และ ดัชนี AgNORs

ประเภทเนื้องอก	การแสดงออกของ c-erbB ₂ (ร้อยละ)	ดัชนี PCNA (ต่อ เซลล์)	ดัชนี AgNORs
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histological type)			
Simple tubular adenocarcinoma	6/24(25.00%) ^{a*}	32.45±23.20	1.22±0.16
Simple papillary adenocarcinoma	11/14±78.60%) ^{b*}	32.17±25.21	1.22±0.16
Solid carcinoma	4/15(26.70%) ^{a*}	36.14±23.13	1.24±0.15
Cribiform carcinoma	4/7(57.14%)	45.31±25.83	1.32±0.30
เกรด (histologic malignancy grade)			
เกรด I	8/19(42.11%)	32.16±24.05	1.26±0.18
เกรด II	18/41(43.90%)	34.60±23.89	1.23±0.18
ขนาดของก้อนเนื้อ (tumor size; ซม.)			
เล็กกว่า 3	13/30(43.33%)	34.40±25.27	1.28±0.22
ระหว่าง 3-5	9/24(37.50%)	29.84±23.94	1.19±0.11
ใหญ่กว่า 5	2/6(33.33%)	40.57±13.90	1.16±0.10
ค่าเฉลี่ย		34.63±23.87	1.23±0.18

*ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของจำนวนตัวอย่างและเกรดที่แสดงออกของ c-erbB₂ ในระดับต่างๆ

ระดับการแสดงออก c-erbB ₂	ผลลบ (Negative)	ผลบวก + (Mild positive)	ผลบวก ++ (Moderate positive)	ผลบวก +++ (Strong positive)
เกรด				
I	57.89(11/19)	10.53(2/19)	21.05(4/19)	10.53(2/19)
II	58.54(24/41)	17.07(7/41)	12.20(5/41)	12.20(5/41)
จำนวนตัวอย่าง	35(58.3%)	9(15%)	9(15%)	7(11.6%)

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ c-erbB2 กับดัชนี PCNA และ AgNORs โดยการจำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เกรด และขนาดก้อนเนื้อ

ลักษณะของมะเร็ง	ร้อยละของตัวอย่างในการแสดงออกของ		ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA (ร้อยละ)		ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)	
	c-erbB ₂ (-)	c-erbB ₂ (+)	c-erbB ₂ (-)	c-erbB ₂ (+)	c-erbB ₂ (-)	c-erbB ₂ (+)
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา						
Simple tubular ACC	18/24(75.00%)	6/24(25.00%)	35.74±25.54	22.56±15.69	1.25±0.17	1.13±0.11
Simple papillary ACC	3/14(21.40%)	11/14(78.60%)	49.57±28.37	27.43±23.44	1.23±0.14	1.22±0.12
Solid carcinoma	11/14(73.30%)	4/14(26.70%)	38.03±26.15	30.94±12.89	1.28±0.15	1.11±0.02
Cribiform carcinoma	3/7(42.86%)	4/7(57.14%)	56.50±34.89	36.92±17.43	1.55±0.34	1.19±0.19
Histologic malignancy grade						
เกรด I	11/19(57.89%)	8/19(42.11%)	34.78±27.48	29.62±19.77	1.30±0.19	1.20±0.16
เกรด II	24/41(58.84%)	17/41(41.46%)	41.55±25.98	26.63±18.0	1.27±0.20	1.15±0.13
ขนาดก้อนเนื้อ (ซม.)						
เล็กกว่า 3	16/30(53.33%)	14/30(46.67%)	42.80±29.00	30.74±18.77	1.35±0.24	1.12±0.169
ระหว่าง 3-5	15/24(62.50%)	9/24(37.50%)	36.54±26.41	18.66±14.25	1.22±0.12	1.15±0.097
ใหญ่กว่า 5	4/6(66.67%)	2/6(33.33%)	36.98±15.03	47.74±11.59	1.19±0.10	1.094±0.07

ACC: adenocarcinoma, -: ผลลบ, +: ผลบวก

ในเนื้อเยื่อเต้านมของสุนัขในประเภทต่างๆ ที่พบการแสดงออกของ c-erbB₂ ในเซลล์เนื้องอกเยื่อใยเต้านมด้วย (Rungsipat et al., 1999, 2003^b)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบได้มากในมะเร็งเต้านมของแมว ได้แก่ ชนิด simple tubular adenocarcinoma ซึ่งสอดคล้องกับที่ Castagnaro และคณะ (1998) รายงานไว้ นอกจากนี้ยังสามารถพบมะเร็งชนิด solid carcinoma รวมถึง cribriform carcinoma ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่มีลักษณะจำเพาะและพบได้น้อยในสุนัข อย่างไรก็ตามในกรณีของมะเร็งชนิด benign mixed tumor และ complex adenocarcinoma ที่พบได้มากในสุนัขนั้นไม่พบรายงานเนื้องอกชนิดดังกล่าวในแมว (Misdrop et al., 1999) มะเร็งเต้านมในแมวจะพบเซลล์มะเร็งของเยื่อใยเป็นหลัก ระดับความรุนแรงที่พบในมะเร็งเต้านมแมวนั้นโดยมากจะอยู่ในระดับปานกลาง โดยจะพบลักษณะของมะเร็งที่เป็นก้อนขนาดใหญ่ และเซลล์มี pleomorphism และ nuclear atypia สูง แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบตัวอย่างมะเร็งในเกรด III อาจเนื่องจากลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบมีลักษณะของเซลล์ที่แบ่งตัวที่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่ตั้งไว้

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ c-erbB₂ ในมะเร็งเต้านมแมวกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบ

ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง simple tubular adenocarcinoma กับ simple papillary adenocarcinoma และระหว่าง simple papillary adenocarcinoma กับ solid carcinoma ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่าง simple tubular adenocarcinoma กับ solid carcinoma ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการที่จีน c-erbB₂ สามารถแสดงออกได้สูงในช่วงของ hyperplasia และ adenocarcinoma แต่เมื่อมะเร็งมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นในระดับของ carcinoma กลับพบการแสดงออกที่ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษามะเร็งเต้านมสตรี โดย Schimmelpenninck และคณะ (1992) รายงานถึงการนำผลผลิตของจีน c-erbB₂ มาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมในสตรีได้ดีในประเภท ductal carcinoma *in situ* (DCIS) ถึงแม้ว่าจะพบว่าการแสดงออกของ c-erbB₂ ไม่สัมพันธ์กับการเกิดการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง (tumor invasion) แต่การแสดงออกของ c-erbB₂ มีความสัมพันธ์กับมะเร็งเต้านมชนิด invasive carcinoma ที่มี DCIS component อยู่ด้วยมากกว่าไม่มี DCIS component และยังพบความสัมพันธ์กับการกระจายแบบ intraductal spread (Kobayashi et al., 2002) ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการแสดงออกของ c-erbB₂ ในมะเร็งเต้านมสุนัขที่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม adenocarcinoma (Rungsipat et al., 2003^b) การแสดงออกของโปรตีนจีนมะเร็ง

c-erbB₂ สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมในแมวเฉพาะกลุ่มที่จำแนกตามประเภททางจุลพยาธิวิทยาได้เป็นอย่างดีสำหรับระดับความรุนแรงของมะเร็งเต้านมนั้น การแสดงออกของ c-erbB₂ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าความเข้มของการย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีรวมทั้งปริมาณเซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสีไม่สัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของมะเร็ง อย่างไรก็ตามการจำแนกระดับความรุนแรงเป็นการประเมินผลโดยเฉลี่ยความรุนแรงของชิ้นเนื้อตัวอย่างทั่วทั้งชิ้นเนื้อ ดังนั้นหากใช้ระดับความรุนแรงของมะเร็งเพียงอย่างเดียวในการพยากรณ์โรคอาจทำให้เกิดความผิดพลาดขึ้นได้ ซึ่งสัมพันธ์กับที่ Misdrop และคณะ (1999) ได้กล่าวถึงมะเร็งเต้านมในแมวกลุ่ม carcinoma พบลักษณะ pleomorphism ของเซลล์มะเร็งสูงและระดับความร้ายแรงของมะเร็งไม่มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค ด้วยเหตุนี้ถึงแม้จะไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกับการแสดงออกของ c-erbB₂ แต่หากนำเอาข้อมูลข้างต้นมาประกอบกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาแล้วจะทำให้การพยากรณ์โรคมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ทั้งนี้เพราะจากการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ c-erbB₂ ในเซลล์มะเร็งเยื่อเมือกจะอยู่ในช่วงปานกลาง (++) และมาก (+++) โดยที่มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาอยู่ในกลุ่มของ adenocarcinoma มากกว่าชั้น carcinoma

ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยากับดัชนี PCNA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีข้อสังเกต คือ ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA ของมะเร็งชนิด solid carcinoma จะสูงกว่ามะเร็งในกลุ่ม adenocarcinoma อย่างไรก็ตามพบว่าดัชนี PCNA มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นตามความร้ายแรงของมะเร็ง แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างดัชนี PCNA กับระดับความรุนแรงของมะเร็ง (Rungsipat et al., 2003^a) ซึ่งแตกต่างจากรายงานในสุนัข (Lohr et al., 1997) โดยอาจเกิดจากการที่เซลล์ในตัวอย่างมะเร็งเต้านมที่ทำการศึกษานั้นส่วนใหญ่ไม่อยู่ในช่วง s-phase จึงทำให้มีจำนวนเซลล์มะเร็งที่ให้ผลบวกต่อ PCNA น้อย ดังนั้นการใช้ดัชนี PCNA เพียงอย่างเดียวอาจทำให้ผลการพยากรณ์โรคเกิดความผิดพลาดได้

ค่าดัชนี AgNORs พบว่าให้ผลทางสถิติคล้ายคลึงกับ PCNA โดยไม่พบความสัมพันธ์ของดัชนี AgNORs กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและระดับความรุนแรงของมะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Juntas และ Pogacnik (2000) ที่พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม simple tubular adeno-

carcinoma กับ simple papillary adenocarcinoma ส่วนรายงานของ De Vico และคณะ (1995) ที่ศึกษาถึง AgNOR cluster size ในมะเร็งเต้านมแมว ก็ให้ผลไปในทางเดียวกันโดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว (mitotic figure) ระยะของก้อนเนื้อและลักษณะของนิวเคลียส อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 2 บ่งชี้ว่าดัชนี PCNA และ AgNORs มีแนวโน้มของค่าทางสถิติที่สูงขึ้นตามความรุนแรงของลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็ง

สำหรับข้อมูลทางคลินิกพบว่าขนาดของมะเร็งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของจีโนมมะเร็ง พบระดับของ c-erbB₂ มากที่สุดในกลุ่มที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยกว่า 3 ซม. ซึ่งแตกต่างจากที่ Rungsipat และคณะ (2003^b) รายงานในสุนัขว่าพบระดับของ c-erbB₂ มากที่สุดในกลุ่มที่มีขนาดก้อนมะเร็ง 3-5 ซม. จากตารางที่ 2 พบว่าค่าดัชนี PCNA ของมะเร็งที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 ซม. มีค่าสูงที่สุด ในขณะที่ค่า AgNORs ไม่สอดคล้องตามกัน สำหรับช่วงอายุนั้นพบว่าแมวสามารถเกิดมะเร็งเต้านมได้ตั้งแต่ช่วงอายุ 4-20 ปี โดยมีค่าเฉลี่ย 9.77 ± 2.85 ปี โดยพบว่าส่วนมากจะพบที่อายุ 10 ปี ซึ่งใกล้เคียงกับอายุในสุนัขที่เกิดมะเร็งเต้านม (Rungsipat et al., 2003^a)

จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าการพยากรณ์ความรุนแรงของมะเร็งเต้านมแมวโดยอาศัยการแสดงออกของโปรตีนจีโนมมะเร็ง c-erbB₂ จะให้ผลดีในเนื้องอกเต้านมกลุ่ม adenocarcinoma อย่างไรก็ตามเพื่อให้การวินิจฉัยหรือการพยากรณ์โรคมีความถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด ควรมีการจำแนกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การจำแนกเกรด proliferative marker ได้แก่ ค่าดัชนี PCNA และ AgNORs รวมถึงการใช้ข้อมูลทางคลินิกนำมาใช้ประกอบการพยากรณ์โรคมะเร็งเต้านมเช่นเดียวกับในสุนัขและมนุษย์ เพื่อผลในการรักษาที่ดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เงินทุนวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ ปีงบประมาณ 2546 และ 2547 โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผศ.สพ.ญ.สมลักษณ์ พวงชมพู และ คุณสุนันทา เลิศจริยศักดิ์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในการอนุเคราะห์เนื้อเยื่อเต้านมควบคุมบวก น.สพ. ศิริชัย เศรษฐ์ชัยกุล และ สพ.ญ.สุกัญญา มณีอินทร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการ

สืบพันธุ์ ซึ่งให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ
 ผศ.น.สพ.ดร.เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทาง
 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คุณโสภณ วุฒรา สำหรับความช่วยเหลือ
 ในงานด้านจุลพยาธิวิทยาและการปฏิบัติงานทางห้อง
 ปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Ahern, T.E., Bird, R.C., Church, A.E. and Wolfe, L.G. 1996. Expression of the oncogene *c-erbB₂* in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 57: 693-696.
- Bortoli, M.D., Dati, C., Antoniotti, S., Maggiora, P. and Sapei, M.L. 1991. Hormone regulation of *c-erbB₂* oncogene expression in breast cancer cell. *Proceedings of the 4th International Congress on Hormones and Cancer, Amsterdam, The Netherlands, September.* 21-25.
- Castagnaro, M., Casalone, C., Ru, G., Nervi, G.C., Bozzeta, E. and Caramelli, M. 1998. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.* 64: 97-100.
- Cockerell, G.L. and Cooper, B.J. 2002. Disorders of cell growth and cancer biology. In: *Mechanisms of Disease.* 2nd ed., D.O. Slauson and B. J. Cooper (ed.), St. Louis, Mosby Inc. 299-376.
- Crocker, J., Boldy, D.A. and Egan, M.J. 1989. How we should count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *J. Pathol.* 158: 185-188.
- De Vico, G. and Maiolino, P. 1997. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.* 117: 99-105.
- De Vico, G., Maiolino, P. and Restucci, B. 1995. Silver-stained nucleolar (Ag-NOR) cluster size in feline mammary carcinoma: lack of correlation with histological appearance, mitotic activity, tumor stage, and degree of nuclear atypia. *J. Comp. Pathol.* 113: 69-73.
- Derenzini, M. and Ploton, D. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 150-192.
- Hampe, J.E. and Misdrop, W. 1974. Tumors and dysplasias of the mammary gland. *Bull. WHO.* 50: 111-133.
- Ito, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R. and Sasaki, N. 1996. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J. Vet. Sci.* 58(8): 723-726.
- Jing, X., Kakndo, K., Murakami, M., Nakamura, M., Yokoi, T., Young, Q. and Sakurai, T. 1999. Intraductal spread of invasive carcinoma has a positive correlation with *c-erbB-2* overexpression and vascular invasion *Cancer.* 86: 439-448.
- Jodi, R.V., Sherry, L.M., Baljit, S. and Elemir, S. 2002. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Can. Vet. J.* 43: 33-37.
- Juntes, P. and Pogacnik, M. 2000. Morphometric analysis of AgNORs in tubular and papillary parts of canine mammary gland tumors. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 22 : 185-192.
- Kerns, B.M., Pence, J.C., Huper, G., Kinney, R.B. and Iglehart, J.D. 1990. *C-erbB-2* expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry. *Histochem. Cytochem.* 38: 1823-1830.
- Kobayashi, M., Ooi, A., Oda, Y. and Nakanishi, I. 2002. Protein overexpression and gene amplification of *c-erbB-2* in breast carcinomas: a comparative study of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.* 33: 21-26.
- Lohr, C.V., Teifke, J.P., Failing, K. and Weiss, E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.* 34: 212-221.
- McCann, A., Johnston, P.A., Dervan, P.A., Gullick, W.J. and Carney, D.N. 1989. *c-erbB-2* oncoprotein expression in malignant and nonmalignant breast tissue. *Ir. J. Med. Sci.* 158: 137-140.
- Misdrop, W 2002. Tumors of the Mammary Gland.

- In: Tumor in Domestic Animals, 4th ed. D.J. Meuten (ed.), Ames, Iowa State Press. 575-606.
- Misdrop, W., Else, R. W., Hellmen, E. and Lipscomb, T. P. 1999. Definition and explanatory notes; histological classification of mammary tumors of the dogs and the cats. The Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.: 25.
- Peles, E., Levy, R.B., Or, E., Ullrich, A. and Yarden, Y. 1991. Oncogenic forms of the neu/HER2 tyrosine kinase are permanently coupled to phospholipase c-gamma. EMBO J. 10: 2077-2086.
- Pena, L.L., Nieto, A.I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P. and Castano, M. 1998. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary gland tumors: relationship to clinical and pathologic variables. J. Vet. Diagn. Invest. 10: 237-246.
- Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J.J. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. Histochem. J. 8: 5-14.
- Preziosi, R., Sarli, G., Benazzi, C. and Marcato, P.S. 1995. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. J. Comp. Pathol. 113: 301-313.
- Quenel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., Durand, M., Avril, A. and Coindre, J.M. 1995. The prognostic value of *c-erbB-2* in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res. Treat. 35: 283-291.
- Rungsipipat, A., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Uchida, K., Miyoshi, N. and Hayashi, T. 1999. Immunohistochemical analysis of *c-yes* and *c-erbB-2* oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. J. Vet. Med. Sci. 61: 27-32.
- Rungsipipat, A., Sailasuta, A., Sirividhayapong, S., Tangkawattana, S. and Wangnathum, S. 2003^a. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) count and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index as prognostic indicator in feline mammary carcinoma. Proceeding of the 11th ISWAVLD and OIE seminar on Biotechnology. Bangkok, Thailand, 9-13 November. P32-33.
- Rungsipipat, A., Tangkawattana, A., Sailasuta, A., Lohachit, C. and Chariyalertsak, S. 2003^b. Expression of *c-erbB-2* oncogene and *p21^{WAF/CIP1}* tumor suppressor gene as clinicopathological factors of canine mammary adenocarcinomas. Proceeding of the 11th ISWAVLD and OIE seminar on Biotechnology. Bangkok, Thailand, 9-13 November. P34-35.
- Schimmelpenninck, H., Eriksson, E.T., Pallis, L., Skoog, L., Cedermark, B. and Auer, G.U. 1992. Immunohistochemical *c-erbB-2* proto-oncogene expression and nuclear DNA content in human mammary carcinoma. Pathol. Pattern. 97: S49-61.
- Sherding, G.R. 1994. The Cat Diseases and Clinical Management. Vol. 1, 2nded., London, Churchill Livingstone Inc. 1874-1875.
- Simoes, J.P.C., Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine tumors: a comparison of three methods. Vet. Pathol. 31: 637-647.
- Sirri, V., Roussel, P. and Hernandez-Verdum. 2000. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. Micron. 31: 121-126.
- Trere, D., Pession, A., ontanaro, L., Chieco, P. and Derenzini, M. 1997. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. Eur. J. Histochem. 41: 153-154.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Muragami, S., Kataoka, A., Kimoshita, J. and Hachitanda, Y. 2003. Prognosis value of the combination of epidermal growth factor receptor and *c-erbB-2* in breast cancer. Surgery 113: 219-221.
- Viste, J.R., Myyers, S.L. and Simko, E. 2002. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. Can. Vet. J. 43: 33-37.
- Xie, X., De Angelis, P., Clausen, O.P.F. and Boysen, M. 1999. Prognostic significance of proliferative and apoptotic makers in oral tongue squamous cell carcinomas. Oral Oncology 35: 502-509.