

การแสดงออกของโปรตีน Melan A ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์^{1*} ชนินทร์ กัลล์ประวิทย์²

Abstract

Anudep Rungsipipat^{1*} Chanin Kulprawit²

MELAN A, PROTEIN EXPRESSION AS A DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC FACTOR IN CANINE ORAL MELANOMAS

The purpose of this paper is to evaluate the relationship between Melan A protein expression, histopathological appearance, clinical data and proliferative marker indices for the diagnosis and prognosis of canine oral melanomas. A retrospective study was performed on biopsy specimens of 65 dogs submitted during the years of 2000 to 2003 to the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. Our results revealed that Melan A protein expression was detected in 50.77% (33/65) malignant melanomas. The results did not show any significant differences between Melan A protein expression and histopathological classification, clinical data, average AgNORs and PCNA indices. Melan A expression could be a useful marker for melanocytic derivation diagnosis in dogs. The study indicated that the expression of Melan A protein in combination with AgNORs and PCNA indices could be used to provide a prognosis for oral melanoma in dogs.

Keywords : canine oral melanoma, Melan A protein expression, diagnosis, prognosis

¹Department of Veterinary Pathology ²Department of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330

*Corresponding author

¹ภาควิชาพยาธิวิทยา ²ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์^{1*} ชนินทร์ กัลลัประวิทย์²

การแสดงออกของโปรตีน Melan A ในการวินิจฉัย และพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ ของการแสดงออกของโปรตีน Melan A กับการจำแนกประเภทและปัจจัยทางคลินิกและค่าดัชนี proliferative markers ของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัขกับการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค โดยการศึกษาข้อมูลย้อนหลังของชิ้นเนื้อที่ส่งชันสูตร ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2546 จำนวน 65 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของโปรตีน Melan A ตรวจพบในมะเร็งเมลาโนมา ร้อยละ 50.77(33/65) แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Melan A กับ ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ข้อมูลทางคลินิก ค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs และค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA ของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข การแสดงออกของโปรตีน Melan A สามารถนำมาใช้ในการจำแนกมะเร็งที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เมลาโนไซต์ได้ และสามารถนำมาใช้ร่วมกันระหว่าง การแสดงออกของโปรตีน Melan A ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA เพื่อการพยากรณ์ความรุนแรงของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข

คำสำคัญ : เมลาโนมาในช่องปากสุนัข การแสดงออกของโปรตีน Melan A การวินิจฉัย การพยากรณ์โรค

บทนำ

โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาสามารถจำแนกประเภทตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยดูจากชนิดและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ดัชนีการแบ่งตัว และการเจริญแทรกเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงและท่อน้ำเหลือง (Goldschmidt and Hendrick, 2002) พบว่าเนื้องอกเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขมักมีความร้ายแรง การทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพของมะเร็งชนิดเมลาโนมานั้นอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ระยะการเจริญตำแหน่ง ระยะเวลาในการขยายตัว และระยะเวลาที่เกิดมะเร็งภายหลังการผ่าตัด แต่ก็อาจจะไม่เพียงพอในการทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพของมะเร็งได้อย่างแม่นยำ ปัญหาที่พบคือ เซลล์เมลาโนไซต์เจริญมาจากเนื้อเยื่อคัพภะของ neuroectoderm และมีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปร่างต่างๆ ได้แก่ spindle, epithelioid หรือ signet ring cell การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งไปเป็นเซลล์ชนิด amelanotic cell ทำให้การวินิจฉัยแยกแยะจากมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น undifferentiated carcinoma หรือ spindle cell sarcoma ทำได้ยากขึ้น (Oliver and Wolfe, 1992; Koenig et al., 2001) ดังนั้นการตรวจหาโปรตีนที่เซลล์มะเร็งเหล่านั้นแสดงออกจึง

เป็นวิธีที่นำมาช่วยในการวินิจฉัย พบการแสดงออกของโปรตีน S-100, vimentin และ neuron specific enolase ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข แต่โปรตีนเหล่านี้มีความจำเพาะต่อเซลล์เมลาโนไซต์ และเซลล์ชนิดอื่นๆ ของเนื้องอกผิวหนังร่วมด้วย (Sandusky et al., 1985; Berrington et al., 1994; Blessing et al., 1998)

โปรตีน Melan A (Melan A/MART 1, melanoma antigen recognized by T-cell) เป็นแอนติเจนที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ (Busam et al., 1998; Ramos-Vara et al., 2002) ได้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน melan A ในเซลล์เมลาโนไซต์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเมลาโนมา พบว่ามีการแสดงออกที่จำเพาะและมีความไวในมะเร็งเมลาโนมา ใน คน สุนัข และ แมว (Bolon et al., 1990; Hofbauer et al., 1998; Laprie et al., 2001) จากรายงานการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Melan A พบการแสดงออกที่จำเพาะในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอกเมลาโนมา และมีความแตกต่างของการแสดงออกในแต่ละกลุ่มเซลล์ตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา จากการศึกษาการแสดงออกในประเภทต่างๆ ของเนื้องอก

เมลานอมาในคน พบว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการแยกประเภทของเนื้องอกเมลานอมาชนิด melanotic nevi จากมะเร็งเมลานอมาชนิดอื่นๆ (Berset et al., 2001) โปรตีน Melan A มีประโยชน์ในการแยกประเภทมะเร็งเมลานอมาในคนได้เป็นอย่างดี (Blessing et al., 1998) สำหรับในสุนัขมีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานอมาและมะเร็งเมลานอมาทั้งแบบมีเม็ดสีและไม่มีเม็ดสีเมลานิน พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มของมะเร็ง (Koenig et al., 2001) โดยพบการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเมลานอมาในระยะแรก ซึ่งพบการสร้างเม็ดสีเมลานินน้อย (Berrington et al., 1994)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Melan A กับชนิดของมะเร็งเมลานอมา การจำแนกความรุนแรงจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histologic malignancy grade) ข้อมูลทางคลินิก ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ทำการศึกษาย้อนหลัง (retrospective study) มะเร็งเมลานอมาในช่องปาก ของสุนัขที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็กและรับบริการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อจากหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2546 เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อที่วินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งเมลานอมาจำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย อาทิเช่น พันธุ์สัตว์ เพศ อายุ ขนาดก้อนมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงหรือเนื้อเยื่อข้างเคียงระยะเวลาการเกิดโรค

ตัวอย่างชิ้นเนื้อ นำมาเก็บรักษาสภาพในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อทางฮิสโตเทคนิค และนำมาศึกษาการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา การย้อม สี Masson-Fontana Silver (MFS) การจำแนกระดับความรุนแรง (histologic malignancy grade) ค่าดัชนี proliferative markers ชนิด Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) และ Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) (ใช้ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมา; อนุเทพและคณะ, 2004) สำหรับการศึกษาในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ Melan A มีขั้นตอนดังนี้

1. การย้อมเพื่อตรวจสอบโปรตีน Melan A อาศัยหลักการย้อมอิมมูโนโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) จากเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน ตัวควบคุมบวกที่ใช้คือ ชิ้นเนื้อมะเร็งเมลานอมาในช่องปากของคน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ antigen retrieval โดยการนำสไลด์ที่แช่ใน Tris HCl buffer, pH 8.0 เข้าเครื่องอบไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C. นาน 5 นาทีแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ 3% H₂O₂ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ทำการ nonspecific background blocking ด้วยการใส่ bovine serum albumin (Fluka®, Japan) ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 30 นาที หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ monoclonal mouse anti-human Melan A antibody (DAKO®, Denmark; ความเข้มข้น 1: 50) (ซึ่งแอนติบอดีนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน Melan A ของสุนัขได้; Berrington et al., 1994; Ramos-Vara et al., 2000) ลงบนสไลด์ อุณหภูมิ 4°C. นาน 12 ชม. หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated rabbit anti-mouse Ig (DAKO®, Denmark; ความเข้มข้น 1: 400) บ่มที่ 37°C. นาน 30 นาที หยด avidin-biotin complex peroxidase solution (ABC kit, DAKO®, Denmark) ลงบนสไลด์ บ่มที่ 37°C. นาน 30 นาที ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วย DAB (0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.01 M Tris HCl pH7.6 and 0.03% H₂O₂) นาน 5 นาทีย้อมสีทับ (counter stain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin

การวัดและวิเคราะห์ผล แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา การแสดงออกของโปรตีน Melan A โดยประเมินการย้อมติดสีตัวรับจำเพาะดังนี้ (Ramos-Vara et al., 2000) ใช้การประเมินแบบ semiquantitative โดยการนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีในชิ้นเนื้อมะเร็ง คือ ผลบวก คือ เซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสีน้อยกว่าร้อยละ 10 ผลบวก +1 คือ เซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสีน้อยกว่าร้อยละ 30 ผลบวก +2 คือ เซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสีประมาณร้อยละ 30-70 และผลบวก +3 คือ เซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสีมากกว่าร้อยละ 70

2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิกที่ปรากฏของโรคมะเร็งชนิดเมลานอมาในช่องปากสุนัข โดยการเก็บรวบรวมข้อมูลจากใบบันทึกประวัติสัตว์ป่วยที่นำมาทำการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก และส่งตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อที่ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะอาการที่ปรากฏทางคลินิกภาพถ่ายทางรังสีวิทยา ระยะเวลาการเกิดโรค ระยะเวลาการมีชีวิตรอดภายหลังการรักษา และการตายเนื่องจากสาเหตุของมะเร็งเมลาโนมา หรือการตายจากสาเหตุอื่นๆ เช่น อุบัติเหตุ หรือ โรคติดเชื้ออื่นๆ

3. ประเมินความสัมพันธ์ร่วมระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและ proliferative markers (ค่าดัชนี AgNORs และ PCNA) และข้อมูลที่ปรากฏทางคลินิก กับการแสดงออกของ Melan A โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี one way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ (โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป Minitab™ version 13.32, Minitab Inc.)

ผล

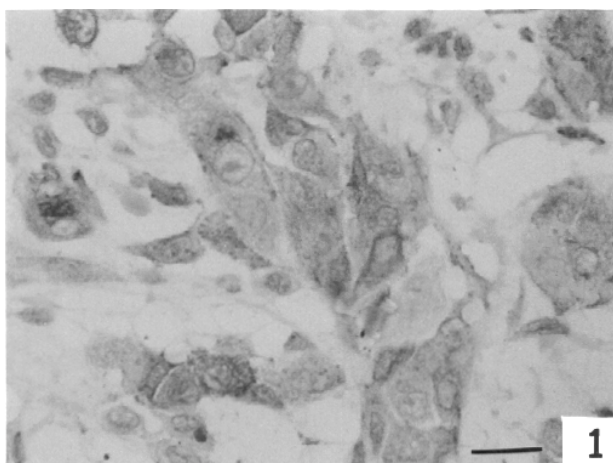
ผลการศึกษาเนื้องอกเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขจำนวน 65 ตัวอย่าง จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็น epithelioid type ร้อยละ 49.23 (32/65), spindle type ร้อยละ 24.62 (16/65) และ mixed type ร้อยละ 26.15 (17/65) (อนุเทพและคณะ, 2004)

ลักษณะการแสดงออกของโปรตีน Melan A เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของสุนัข ให้ผลบวกติดสีเหลืองน้ำตาลจนถึงน้ำตาลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยพบว่ามีระดับความเข้มของการติดสีที่ใกล้เคียงกับชิ้นเนื้อมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของคน ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก (รูปที่ 1 และ 2) ตัวอย่างที่ให้ผลบวก มีจำนวนร้อยละ 50.77 (33/65) ผลลบจำนวนร้อยละ 49.23 (32/65) (ตารางที่ 1) เมื่อทำการจำแนกตามระดับการให้ผลบวก จาก +1, +2 และ +3 พบร้อยละ 9.23 (6/65), 12.31 (8/65) และ 29.23 (19/65) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อทำการจำแนกตามลักษณะมะเร็งทางจุลพยาธิวิทยา ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในกลุ่ม epithelioid type ร้อยละ 24.62 (16/65), spindle type 12.30 (8/65) และ mixed type ร้อยละ 13.85 (9/65) (ตารางที่ 2) ค่าดัชนี AgNORs เฉลี่ยในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อโปรตีน Melan A คือ 1.320 ± 0.352 และในกลุ่มที่ให้ผลบวก คือ 1.420 ± 0.367 พบว่าค่าดัชนี AgNORs ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.489$) (ตารางที่ 1) ค่าดัชนี PCNA เฉลี่ยในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อโปรตีน Melan A คือ 62.63 ± 30.15 และในกลุ่มที่ให้ผลบวก คือ 70.71 ± 20.70 พบว่าค่าดัชนี PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.211$) (ตารางที่ 1) เมื่อทำการจำแนก

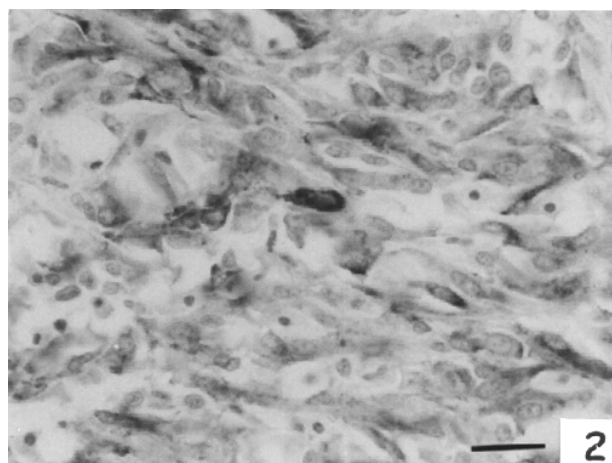
ตามเกรดพบว่า จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเกรด I ร้อยละ 7.70 (5/65) เกรด II ร้อยละ 26.15 (14/65) และ เกรด III ร้อยละ 10.77 (7/65) เมื่อทำการจำแนกตามการให้ผลบวกต่อสีย้อม MFS พบว่า ผลบวก +1, +2 และ +3 มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการแสดงออกของโปรตีน Melan A ร้อยละ 10.77 (7/65), 18.46 (12/65) และ 21.54 (14/65) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มพันธุ์แท้ ร้อยละ 51.35 (19/37) และในกลุ่มพันธุ์ผสม ร้อยละ 50 (14/28) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี ร้อยละ 40.91 (18/44) และในกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 10 ปี ร้อยละ 71.43 (15/21) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มเพศผู้ ร้อยละ 51.02 (25/49) และในกลุ่มเพศเมีย ร้อยละ 46.67 (7/15) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ของกลุ่มมะเร็งที่มีขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) น้อยกว่า 2 ซม. ร้อยละ 50.00 (3/6) กลุ่มมะเร็งที่มีขนาด 2-4 ซม. ร้อยละ 35.71 (5/14) และกลุ่มมะเร็งที่มีขนาดมากกว่า 4 ซม. ร้อยละ 59.89 (22/38) (ตารางที่ 3)

เนื่องจากข้อมูลทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับช่วงเวลาของการมีชีวิตรอด (survival time) นั้นมีไม่เพียงพอ ซึ่งอาจจะเกิดจากการจัดเก็บประวัติสัตว์ป่วยไม่ดีและการกรอกรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลประวัติสัตว์ป่วยไม่ครบถ้วน จึงไม่สามารถสรุประยะเวลาการมีชีวิตรอดของสุนัขได้ทั้งหมด จากข้อมูลจำนวน 44 ราย พบว่าสุนัขเสียชีวิตร้อยละ 97.73 (43/44) และมีชีวิตรอดร้อยละ 2.27 (1/44) แต่พบการงอกขยายของก้อนเนื้ออยู่ พบว่ามีจำนวนตัวอย่างร้อยละ 39.53 (17/43) ของสุนัขที่เสียชีวิต ที่ให้ผลบวกต่อการแสดงออกของโปรตีน Melan A ช่วงเวลาของการมีชีวิตรอดจากการศึกษาในครั้งนี้อยู่ในช่วง 7-537 วัน โดยมีค่าเฉลี่ย 93.62 ± 123.73 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน แต่จากข้อมูลที่มีอยู่พบว่าสุนัขที่เป็นเมลาโนมาชนิด epithelioid type มีช่วงเวลาการรอดชีวิตโดยเฉลี่ยคือ 142.77 ± 142.46 วัน ค่ามัธยฐาน 79 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน ส่วน spindle type มีช่วงเวลาการรอดชีวิตโดยเฉลี่ยคือ 122.89 ± 121.69 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน และ mixed type มีช่วงเวลาการรอดชีวิตโดยเฉลี่ย 105.90 ± 97.07 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 30 วัน โดยในทุกกลุ่มให้ผลบวกต่อการย้อม Melan A จำนวนร้อยละ 33.33 (12/36) (ตารางที่ 4)



รูปที่ 1 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสซึม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมาชนิด epithelioid ในช่องปากของคน; ตัวควบคุมบวก (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar=20 μ m)



รูปที่ 2 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสซึม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมาชนิด epithelioid ในช่องปากของสุนัข (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar=20 μ m)

ตารางที่ 1 แสดงผลการแสดงออกโปรตีน Melan A ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA จำนวน 65 ตัวอย่าง

ผลการแสดงออกโปรตีน Melan A	จำนวนตัวอย่างร้อยละ (จำนวน)	ค่าดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)	ค่าดัชนี PCNA (ร้อยละ)
ผลลบ	49.23(32/65)	1.320 $\pm$ 0.352	62.63 $\pm$ 30.15
ผลบวก	50.77(33/65)	1.420 $\pm$ 0.367	70.71 $\pm$ 20.70
ผลบวก +1	9.23(6/65)	1.299 $\pm$ 0.323	75.22 $\pm$ 20.34
ผลบวก +2	12.31(8/65)	1.511 $\pm$ 0.251	68.33 $\pm$ 23.58
ผลบวก +3	29.23(19/65)	1.420 $\pm$ 0.421	70.30 $\pm$ 20.53

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของตัวอย่างมะเร็งเมลาโนมา ที่ให้ผลบวกและผลลบโปรตีน Melan A จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและผลการย้อม MFS จำนวนตัวอย่าง 65 ตัวอย่าง

การจำแนกประเภท	ผลบวกโปรตีน Melan A (ร้อยละ)	ผลลบโปรตีน Melan A (ร้อยละ)
Histopathological type		
Epithelioid type	24.62(16/65)	24.62(16/65)
Spindle type	12.30(8/65)	12.30(8/65)
Mixed type	13.85(9/65)	12.30(8/65)
Histologic malignancy grade		
เกรด I	7.70%(5/65)	7.70%(5/65)
เกรด II	26.15%(21/65)	23.08%(15/65)
เกรด III	10.77%(7/65)	18.46%(12/65)
ผลการย้อมสี MFS		
ผลบวก +1	10.77%(7/65)	23.08%(15/65)
ผลบวก +2	18.46%(12/65)	12.31%(8/65)
ผลบวก +3	21.54%(14/65)	13.84%(9/65)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างผลของการแสดงออกโปรตีน Melan A จำแนกตามกลุ่มข้อมูลทางคลินิก

ข้อมูลทางคลินิก	ผลการแสดงออกโปรตีน Melan A (ร้อยละ)	
	ผลบวก	ผลลบ
ช่วงอายุ		
≤ 10 ปี	40.91(18/44)	59.09(26/44)
> 10 ปี	71.43(15/21)	28.57(6/21)
เพศ*		
เพศผู้	51.02(25/49)	48.99(24/49)
เพศเมีย	46.67(7/15)	53.33(8/15)
พันธุ์		
พันธุ์แท้	51.35(19/37)	48.65(18/37)
พันธุ์ผสม	50.00(14/28)	50.00(14/28)
ขนาดก้อนเนื้อ**		
< 2 ซม.	50.00(3/6)	50.00(3/6)
2-4 ซม.	35.71(5/14)	64.29(9/14)
> 4 ซม.	57.89(22/38)	42.11(16/38)
สถานภาพ***		
ตาย	39.53(17/43)	60.47(26/43)
มีชีวิตรอด	-	100(1/1)

*จำนวนตัวอย่าง 64 ตัวอย่าง **จำนวนตัวอย่าง 58 ตัวอย่าง ***จำนวนตัวอย่าง 43 ตัวอย่าง
ข้อมูลตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน คือ ตัวอย่างที่ไม่สามารถเก็บข้อมูลทางคลินิกได้

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลกลุ่มสุนัขที่แสดงออกโปรตีน Melan A อัตราการรอดชีวิต ดัชนี AgNORS และดัชนี PCNA

กลุ่มสุนัขที่มีข้อมูล (จำนวน 36 ตัวอย่าง)	ช่วงเวลาการ มีชีวิตรอด(วัน)	ดัชนี AgNORS (ต่อเซลล์)	ดัชนี PCNA (ร้อยละ)
ผลลบ Melan A จำนวน 66.67% (24/36)	158.21±138.61	1.334±0.357	68.44±28.03
ผลบวก Melan A จำนวน 33.33% (12/36)	66.25±48.84	1.291±0.283	62.79±23.91

วิจารณ์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์มะเร็งเมลาโนมา มีการแสดงออกของโปรตีน Melan A ร้อยละ 50.77 โดยส่วนใหญ่จะแสดงออกในระดับสูง ซึ่งพบได้ในทั้งสามกลุ่มที่จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยมะเร็งเมลาโนมาในกลุ่ม epithelioid cell ให้ผลบวกสูงสุด ซึ่งสามารถนำเทคนิคการย้อมimmunohistochemistryของโปรตีน Melan A มาช่วยในการวินิจฉัยได้เป็นอย่างดี โดยพบว่า โปรตีน Melan A เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ CD⁸⁺ cytotoxic T-cell มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ของเซลล์เมลาโนไซต์ (Busam et al., 1998) ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินของเอนไซม์ tyrosinase ที่สามารถตรวจสอบจาก DOPA test ได้ (Ramos-Vara et al., 2000) มีรายงานการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลาโนมา พบการแสดงออกหรือย้อมติดสีเป็นกลุ่มบริเวณ polar perinuclear และขยายออกไปยังไซโตพลาสซึม โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์รูปกระสวย (Koenig et al., 2001) การศึกษาครั้งนี้ให้ผลไปในแนวทางเดียวกันกับรายงานการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเนื้อเยื่อเมลาโนมา โดยพบจำนวนร้อยละ 90 พบว่าเซลล์กลุ่ม amelanotic melanoma ให้ผลบวกร้อยละ 32 และในบางรายงานพบว่าร้อยละ 90 ของเนื้อเยื่อที่มีการสร้างเม็ดสีจำนวนมาก ให้ผลบวก แต่ให้ผลลบต่อเซลล์ melanophages (Ramos-Vara et al., 2000; Ramos-Vara et al., 2002) โปรตีน Melan A ให้ผลบวกต่อเซลล์เมลาโนไซต์บริเวณชั้นหนังแท้ และพบว่าเซลล์มะเร็งชนิด epithelioid cell และ spindle cell ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการแสดงออกของโปรตีน Melan A แต่มีข้อสังเกต คือ เซลล์ชนิดรูปกระสวยให้ผลบวกที่มากกว่าบริเวณชั้นหนังกำพร้า เช่นเดียวกับกลุ่มเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายออกไป (Orosz, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ในกลุ่มมะเร็งเมลาโนมาชนิด mixed ที่พบเซลล์ชนิดรูปกระสวยให้ผลบวกมากกว่าเซลล์ชนิดคล้ายเยื่อ (epithelioid) ในชั้นเนื้อเดียวกัน ในบางครั้งอาจพบการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยง และเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ซึ่งสามารถอธิบายหลักการในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากโปรตีน Melan A เป็นแอนติเจนของเซลล์มะเร็งที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดี (Koenig et al., 2001)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน Melan A และค่าดัชนี proliferative marker พบว่าในกลุ่มที่ให้ผลลบมีค่าดัชนี AgNORs และ PCNA ที่ต่ำกว่าในกลุ่มที่ให้ผลบวก แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นคุณค่าในการพยากรณ์โรคของการแสดงออกของโปรตีน Melan A ที่มีการเจริญแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา มีรายงานศึกษาความสัมพันธ์พฤติกรรมชีวภาพ เป็นตัวแปรอิสระกับเซลล์เมลาโนมาชนิดที่สร้างเม็ดสี (Ramos-Vara et al., 2000) การแสดงออกของโปรตีน Melan A มีความสัมพันธ์กับการลดลงของช่วงเวลาปลอดโรค (disease free interval) และอัตราการรอดชีวิต (overall survival rate) ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเมลาโนมาในช่องปาก (Berset et al., 2001) จากข้อมูลช่วงเวลาการมีชีวิตรอด พบว่าสุนัขในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อการย้อม มีค่าการรอดชีวิตที่สูงกว่ากลุ่มสุนัขที่ให้ผลบวกประมาณ 2-2.5 เท่า แต่จำนวนของสุนัขในกลุ่มที่ให้ผลลบมีจำนวนสัตว์ป่วยที่ตายสูงกว่ากลุ่มที่ให้ผลบวก (ตารางที่ 3) ดังนั้นความสำคัญของการแสดงออกของโปรตีน Melan A ที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคอาจยังไม่เด่นชัดนัก ซึ่งควรทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกให้ละเอียดมากขึ้น แต่ปัญหาหลักของการติดตามข้อมูลทางคลินิกในสัตว์ คือ การนำสุนัขป่วยมาทำการรักษาขาดความต่อเนื่อง และมีการเปลี่ยนผู้ดูแลสุนัขป่วย สัตว์ป่วยมักจะเสียชีวิตที่บ้านในช่วงของการรักษา ทำให้การติดตามอาการทางคลินิกกระทำไม่ได้ต่อเนื่อง กล่าวโดยสรุป การแสดงออกของโปรตีน Melan A. ในมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข ใช้ช่วยในการวินิจฉัย และ เป็นตัวเลือกในการนำมาใช้พยากรณ์โรคได้ โดยร่วมกับตัวแปรการพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมา ชนิดอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2546 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ คุณสุประดิษฐ์ หวังในธรรม และคุณโสภณ วุฒรา ที่ช่วยเหลืองานห้องปฏิบัติการ และ ผศ.น.สพ.ดร.สุกษัย เนื่อนนวลสุวรรณ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ สิริวดี ใจ นิกากรณ์ พัฒนไทยานนท์ พรทิพา เลิศรัตนชัยกุล ครรชิต พงษ์เพชร และชนินทร์ กัลลป์ระวิทย์ 2004 (2547) ความสัมพันธ์ของดัชนี AgNORs และดัชนี PCNA กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และปัจจัยทางคลินิก ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมา ในช่องปากสุนัข. เวชศาสตร์สัตว์แพทย์ (ต้นฉบับส่งตีพิมพ์)

- Berrington, A.J., Jimbow, K. and Haines, D.M. 1994. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. *Vet. Pathol.* 31(4): 455-461.
- Berset, M., Cerottini, J.P., Guggisberg, D., Romero, P., Burri, F., Rimoldi, D. and Panizzon, R.G. 2001. Expression of Melan-A/ MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 20(95): 73-77.
- Blessing, K., Sanders, D.S. and Grant, J.J. 1998. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody Melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. *Histopathology* 32(3): 139-146.
- Bolon, B., Calderwood Mays, M.B. and Hall, B.J. 1990. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet. Pathol.* 27(2): 96-102.
- Busam, K.J., Chen, Y.T., Old, L.J., Stockert, E., Iversen, K., Coplan, K.A., Rosai, J., Barnhill, R.L. and Jungbluth, A.A. 1998. Expression of melan-A (MART-1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 22(8): 976-982.
- Goldschmidt, M.H. and Hendrick, M.J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. In: *Tumors in Domestic Animals*. D.J. Meuten 4th (ed.) Ames, Iowa State. Press: 45-84.

- Hofbauer, G.F., Kamarashev, J., Geertsens, R., Boni, R. and Dummer, R. 1998. Melan-A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma. Res.* 8(4): 337-343.
- Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R. and Modiano, J.F. 2001. Expression of s100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet. Pathol.* 38(4): 427-435.
- Laprie, C., Abadie, J., Amardeilh, M.F., Net, J.L., Lagadic, M. and Delverdier, M. 2001. MIB-1 immunoreactivity correlates with biological behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet. Dermatol.* 12(3): 139-147.
- Oliver, J.L. and Wolfe, L.G. 1992. Antigen expression in canine tissues, recognized by a monoclonal antibody generated against canine melanoma cells. *Am. Vet. Res.* 53(1): 123-128.
- Orosz, Z., 1999. Melan-A/ MART-1 expression in various melanocytic lesions and in non melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology* 34(6): 517-525.
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A. and Kottler, S.J. 2000. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* 37(6): 597-608.
- Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Johnson, G.C., Turnquist, S.E., Kreeger, J.M. and Watson, G.L. 2002. Melan-A and S-100 protein immunohistochemistry in feline melanoma: 48 cases. *Vet. Pathol.* 39: 127-132.
- Sandusky, G.E., Carlton, W.W. and Wightman, K.A. 1985. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Vet. Pathol.* 22(6): 577-581