

รายงานผลการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

Molecular Genetic Alterations in Bladder Cancer

โดย

ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุน

RCM โดยโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์

RC

280

85

8315

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 64426

วัน,เดือน,ปี. 1.1.0.ย. 2549

ปีงบประมาณ 2548

b..... 1164859A
i.....

## บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วยคนไทย จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในตำแหน่งของยีน *c-myc* ซึ่งเป็น oncogene ที่อยู่บนโครโมโซม 8q24 โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 202 คู่เบส เพื่อตรวจสอบการมี amplification ของยีน *c-myc* พบว่ามี amplification คิดเป็นร้อยละ 40 โดยเนื้อเยื่อระยะ noninvasive ก็ในระยะ invasive มีการ amplification ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการ amplification ของยีน *c-myc* อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาถึงตำแหน่งต่าง ๆ ให้มากขึ้น และหลายๆเทคนิค เพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยในอนาคต

## ABSTRACT

The genetic aberration in bladder cancer was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using DNA isolated from 20 Thai bladder cancer patient tissues. The product of *c-myc* gene which is located on chromosome 8q24 is 202 bp. Investigated *c-myc* gene amplification, the result showed that the DNA amplification of *c-myc* gene in bladder cancer tissues were 40%. There were no differences in *c-myc* amplification between noninvasive and invasive tissues. The results of this study indicated that *c-myc* amplification may be process in bladder oncogenesis. However, should more study in positions on several gene, chromosomes and various technique for precise diagnosis in the future.

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	a
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	b
สารบัญ	c
สารบัญตาราง	d
สารบัญรูป	e
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 มะเร็ง	4
2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง	5
2.3 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	6
2.4 วิธีการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	9
2.5 ปฏิกริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส	12
2.6 ยีน <i>c-myc</i>	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี	15
3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	16
3.3 วิธีการทดลอง	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	20
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยใช้ฐานข้อมูลของยีน <i>c-myc</i> เป็นต้นแบบ	18
2	แสดงสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา	18
3	แสดงผลการทดลองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรสของผู้ป่วยโรคมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะจำนวน 20 ราย	23
4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดความผิดปกติของยีน <i>c-myc</i> กับระยะของโรค	24

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะ	7
2	เยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ	7
3	แสดงผลขนาดขึ้นและความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการตรวจสอบ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	20

# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันในประเทศไทย โรคมะเร็งจัดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากเป็นอันดับ 3 รองจากโรคหัวใจ และอุบัติเหตุ โดยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) พบได้มากเป็นอันดับ 5 ในเพศชายรองจากมะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งช่องปอด โดยมีโอกาสเกิดขึ้น 5.2 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน (Deerasamee และคณะ, 1999) ซึ่งต่างจากประเทศทางตะวันตกที่มีอุบัติการณ์สูงกว่าเป็น 18 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากปัจจัยทั้งสารพันธุกรรมที่แตกต่างกันและด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การสูบบุหรี่ สารเคมี และการติดเชื้อ เป็นต้น

โรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งตามพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิดที่ไม่ลุกลามถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะหรือชนิดพื้นผิว (noninvasive tumor : pTa-pT1) และชนิดลุกลามจนถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะ และ/หรือกระจายไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย (invasive tumor : pT1-pT4) โดยประมาณ 70 % เป็นชนิดที่ไม่ลุกลามถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้แม้ว่าจะรักษาให้หายได้ด้วยวิธีการส่องกล้องผ่าตัดแต่เป็นปัญหาสำหรับแพทย์ในการวางแผนการรักษา เนื่องจากจะมีโอกาสเกิดเป็นซ้ำได้ถึง 50-80% ในเวลาหลายปีต่อมา และสามารถดำเนินโรคเป็นมะเร็งชนิดลุกลามจนถึงชั้นกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะ และ/หรือกระจายไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ถึง 10-20 %

การเกิดมะเร็งเป็นขบวนการที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนโดยยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ oncogene คือ ยีนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง และ tumor suppressor gene คือ ยีนที่ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ถ้ายีนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้ง 2 กลุ่ม เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ซึ่งโดยความผิดปกติที่พบโดยส่วนใหญ่ oncogene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ (amplification) และยีนในกลุ่ม tumor suppressor gene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (deletion) มีผลทำให้เกิดความไม่สมดุลในจีโนม ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดโรคมะเร็งได้

ประเทศทางตะวันตกได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในหลายเทคนิค เช่น Tumor Cytogenetics (TC), Comparative Genomic Hybridization (CGH), Fluorescence in situ Hybridization (FISH), Loss of Heterozygosity (LOH), Polymerase Chain Reaction (PCR) , DNA cytometry และ Northern blot analysis เป็นต้น และการศึกษาการแสดงออกของยีน เช่น DNA microarrays เป็นต้น และเพื่อการหาตำแหน่งของยีนหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นและการดำเนินของโรค ในอันที่จะมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกให้เกิด

ประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วยทั้งด้านร่างกาย จิตใจ และสังคม จึงมีงานวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการวินิจฉัย วางแผนการรักษา และการติดตามผลการรักษา ดังเช่นปัจจุบันมีชุดสำหรับตรวจมะเร็งกระเพาะปัสสาวะด้วยเทคนิค FISH ของ Vysis (UroVysis bladder cancer recurrence kit) ในตำแหน่งของโครโมโซมที่ 3, 7, 9 และ 17 เป็นต้น แล้ว

ในประเทศไทยปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคและติดตามผลการรักษาในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกระทำโดยศัลยแพทย์ส่งกล้องเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะเพื่อตัดชิ้นเนื้อมาให้พยาธิแพทย์ตรวจว่าเป็นเซลล์มะเร็งชนิดใดและ/หรือมีการเป็นซ้ำหรือไม่ ซึ่งเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายและสร้างความเจ็บปวดต่อผู้ป่วยมากพอสมควร ก่อนหน้านี้ สุพัตราและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาวิจัยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้นด้วยเทคนิค CGH ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของทั้งจีโนมในเวลาเดียวกันได้ นิยมใช้ในการศึกษาความผิดปกติของยีนที่ไม่เคยทราบมาก่อน (unknown genetic aberration) ในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยพบว่าความผิดปกติที่พบได้บ่อย คือ มีการขาดหายไป (deletion) ของโครโมโซม Y และ 10q เกิดการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซม (gain) พบได้บ่อยในบริเวณ 1q, 8q และ 9q นอกจากนี้พบตำแหน่งที่เกิด amplification ได้บ่อยคือ 8q21-qter, 6p21-p25 และ 10p13-p15 และความผิดปกติชนิด amplification มีความผิดปกติต่อตัวอย่างในระยะ invasive มากกว่าระยะ noninvasive tumor ถึง 3 เท่า โดยมีทั้งตำแหน่งและความถี่ต่างไปจากซีกโลกตะวันตก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขบวนการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความแตกต่างกัน

และเพื่อที่จะนำประเทศไปสู่การพึ่งตนเองทั้งการพัฒนาองค์ความรู้และเพิ่มระดับคุณภาพของชีวิตของประชาชน ในการที่จะนำไปสู่การสร้างเทคโนโลยีเอง โดยเทคโนโลยีนั้นต้องเหมาะสมกับการใช้ในประเทศไทย จึงต้องมีการศึกษาวิจัยถึงข้อมูลของโรคในประชากรไทย ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในตำแหน่งที่มีการ amplification ของยีนหรือส่วนของโครโมโซมโดยเทคนิค PCR โดยเป็นเทคนิคที่ใช้เพียงดีเอ็นเอของสิ่งส่งตรวจนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ใช้เวลาสั้นในการตรวจ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาประยุกต์และพัฒนาการตรวจสู่ระดับคลินิกได้ง่าย เพื่อการวิเคราะห์โรคมะเร็งในระดับโมเลกุลทั้งในระยะ noninvasive และ invasive cancer อันนำไปสู่การวินิจฉัยโรค การพยากรณ์โรค และดูแลตอบสนองต่อการรักษาต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อจากข้อมูลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของผู้ป่วยคนไทยโดยเทคนิค CGH โดยมีวัตถุประสงค์คือ

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในตำแหน่งที่เกิดความผิดปกติได้บ่อยในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

2. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและลักษณะทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยการเปรียบเทียบความผิดปกติระหว่างชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะชนิด noninvasive และ invasive cancer อันจะเป็นแนวทางในการจำแนกระยะของการดำเนินโรคด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลต่อไป

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 มะเร็ง (cancer)

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติที่กลไกของร่างกายไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตได้ โดยเซลล์ที่ผิดปกตินี้จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนเป็นก้อนหรือแตกเป็นแผล และมีความสามารถในการเบียดตัวหรือแทรกแซงไปยังอวัยวะข้างเคียงที่ปกติหรือสามารถกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น กระจายไปตามกระแสเลือดหรือทางเดินน้ำเหลือง พร้อมกับมีความสามารถฝังตัวและเจริญเติบโตที่อวัยวะใดของร่างกายได้ หากอวัยวะนั้นเป็นอวัยวะที่สำคัญ เช่น ปอด ตับ สมอง หัวใจ ผู้ป่วยก็จะมีชีวิตอยู่รอดไม่นาน ปัจจุบันได้มีการศึกษาเรื่องราวต่าง ๆ ของโรคมะเร็งละเอียดมากขึ้นจนถึงระดับของสารพันธุกรรม ทำให้ทราบถึงความผิดปกติ พื้นฐานที่สำคัญคือ การทำงานของยีนที่มีความผิดปกติ โดยเฉพาะส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเกิดมะเร็งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีหลายขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เรียกว่าขั้นตอนเริ่มต้น (Initiation) โดยที่สารพันธุกรรมได้รับสารก่อมะเร็งหรือขบวนการอื่น ๆ ที่ทำลายหน้าที่ปกติของสารพันธุกรรม ขบวนการดังกล่าวนี้เกิดอยู่ตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่าขั้นตอนส่งเสริม (Promotion) โดยจะส่งเสริมให้สารพันธุกรรมมีความผิดปกติมากขึ้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 3 เรียกว่าขั้นตอนเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็ง (Conversion) หากไม่ได้รับการตรวจค้นหามะเร็งระยะแรกเริ่ม และไม่ได้รับการรักษา ขบวนการเกิดโรคมะเร็งจะดำเนินต่อไปตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 4 เรียกว่าขั้นตอนแพร่กระจาย หรือลุกลามของโรคมะเร็ง (Progression) เซลล์มะเร็งจากต้นกำเนิดกระจายไปที่เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะข้างเคียง หรือกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกายโดยผ่านทางทางเดินน้ำเหลืองหรือกระแสเลือด และฝังตัวในอวัยวะต่าง ๆ พร้อมทั้งทำให้การทำงานของอวัยวะที่สำคัญของร่างกายล้มเหลว อันเป็นผลให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งถึงแก่ชีวิตในที่สุด ซึ่งผู้ป่วยโรคมะเร็งส่วนมากในประเทศไทย หรือประเทศที่ด้อยพัฒนา จะมาพบแพทย์เพื่อขอรับการรักษาเมื่อเป็นมะเร็งในระยะสุดท้าย ([http://www.chulacancer.net/p0000027\\_3.htm](http://www.chulacancer.net/p0000027_3.htm))

##### 2.1.1 อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2536 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งในเพศชาย 10 อันดับแรก คือ มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งต่อมน้ำเหลือง, มะเร็งหลังโพรงจมูก และมะเร็งหลอดอาหาร ในเพศหญิง 10

อันดับแรก มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเต้านม, มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งรังไข่, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งต่อมไทรอยด์, มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งปากมดลูก

(<http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm>)

### 2.1.2 สาเหตุของโรคมะเร็ง

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทที่สำคัญ คือ

1. เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือภายนอกในร่างกาย ซึ่งปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามะเร็งส่วนใหญ่เกิดจากสาเหตุได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อรา ที่มีชื่อ อัลฟาโทกซิน (alfatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้งย่าง พวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ในขบวนการถนอมอาหาร ชื่อไนโตรซามีน (nitrosamine) สีสผสมอาหารที่มาจากสีข้อมผ้า รังสีเอ็กซ์เรย์ อุลตราไวโอเลตจากแสงแดด เชื้อไวรัส ไวรัสตับอักเสบ บี ไวรัสฮิวแมนแพพพิลโลมา การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ รวมทั้งจากพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มสุรา เป็นต้น

2. เกิดจากความผิดปกติภายในร่างกาย ซึ่งมีเป็นส่วนน้อย เช่น เด็กที่มีความพิการมาแต่กำเนิดมีโอกาสเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง ภาวะทุพโภชนาการ เช่น การขาดวิตามินบางชนิด เช่น วิตามินเอ และ วิตามินซี เป็นต้น และความผิดปกติทางพันธุกรรม (<http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm>)

## 2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

ในการเกิดมะเร็งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.2.1 ยีนก่อมะเร็ง (Proto-oncogene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้จะแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดแสดงออกเซลล์จะหยุดการแบ่งเซลล์ ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์จนยีนแสดงออกตลอดเวลา เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด oncogene เป็นยีนกลุ่มแรก ๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ยีนนี้พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างของไวรัสพวกนี้คือ rous sarcoma virus (RSV) เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้วจะใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้างดีเอ็นเอขึ้นจากอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอนี้เรียกว่า provirus สามารถแทรกตัวเข้ากับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านแล้วทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ ในธรรมชาติพบ RSV สองกลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า non acute virus กับกลุ่มที่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้ เรียกว่า acute transforming virus จีโนมของไวรัสพวก acute transforming virus มียีนที่แตกต่างจากพวก non acute virus ยีนที่ทำให้เซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งได้ เรียกว่า viral oncogene หรือ v-oncogene เมื่อศึกษาลึกลงไปพบว่า v-oncogene มีลักษณะคล้ายกับ proto-oncogene มาก มีเพียงบางส่วนที่แตกต่างกันออกไป เชื่อกันว่า v-oncogene นี้มาจาก proto oncogene ซึ่งกลายพันธุ์แล้วไวรัสนำออกจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง proto-oncogene ที่กลายพันธุ์อยู่ในเซลล์แล้วทำให้

เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า cellular oncogene หรือ c-oncogene เกิดจากการเปลี่ยนแปลงจาก proto-oncogene เป็น oncogene นั้นเกิดขึ้นได้หลายแบบ เช่น point mutation, translocation, overexpression of gene product โดยการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป อาจสืบเนื่องจากการแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิด โปรโมเตอร์ใหม่ การแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิด enhancer รวมทั้งการเพิ่มจำนวนมาก ๆ ของ proto-oncogene เป็นต้น ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ เช่น *c-myc*, *BRC1*, *BRC2* และ *Ras* เป็นต้น

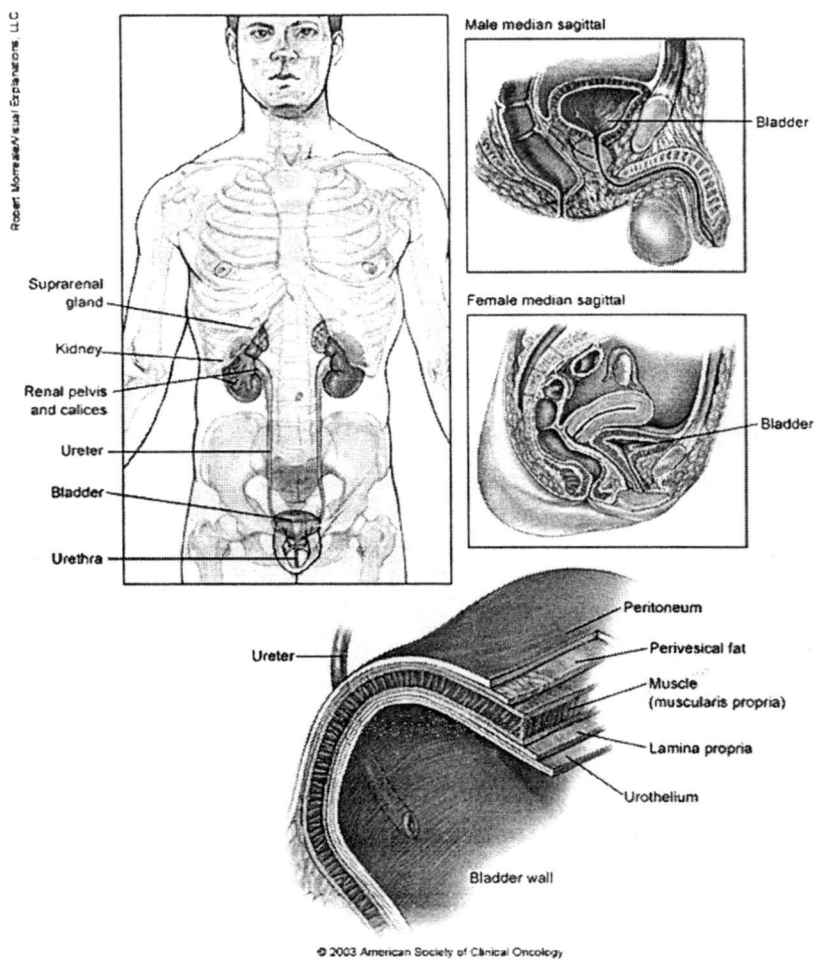
2.2.2 ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่สำคัญคือ ยีนจะหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนทำงานเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว เมื่อใดก็ตามที่ยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ที่ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด ตัวอย่างของยีนในกลุ่มนี้เช่น *p53*, *DCC* และ *APC* เป็นต้น โดยยีน *p53* เป็น tumor suppressor gene ยีนหนึ่งซึ่งสร้าง transcription factor จะแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ ยีน *p53* จะทำงานโดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ ในภาวะที่เซลล์ขาด *p53* เซลล์ไม่สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายก่อนที่จะเข้าสู่ระยะ S ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ในกรณีที่ดีเอ็นเอแตกหักเสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมให้กลับดังเดิมได้ *p53* จะกำหนดให้เซลล์ตาย (apoptosis)

### 2.3 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

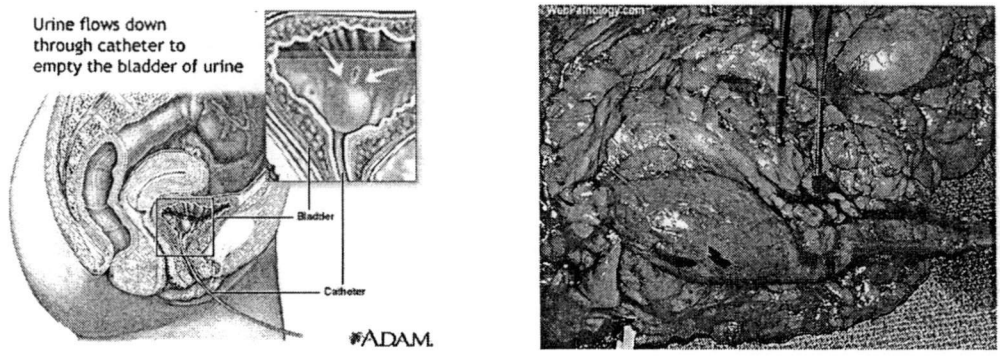
เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในระบบอวัยวะขับถ่ายและอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศชาย โดยโครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะดังรูปที่ 1 จะมีลักษณะเป็นถุงสำหรับเก็บน้ำปัสสาวะมีตำแหน่งอยู่ที่ในช่องท้องระดับ หัวเหน่า กระเพาะปัสสาวะจะมีหน้าที่รับน้ำปัสสาวะที่ไตกรองออกมาแล้วส่งผ่านลงมาทางท่อไตลงมาถึงในกระเพาะปัสสาวะ เมื่อมีปริมาณน้ำปัสสาวะมากพอสมควรกระเพาะปัสสาวะจะขับน้ำปัสสาวะออกทิ้งทางท่อปัสสาวะต่อไป

มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่เกิดขึ้นมาจากเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะดังรูปที่ 2 มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติจนกลายเป็นก้อนเนื้องอกขึ้นมา ก้อนเนื้อที่งอกขึ้นมานี้จะเจริญเติบโตขึ้นมาเรื่อย ๆ จนอาจโตเต็มกระเพาะปัสสาวะ และลุกลามออกไปยังอวัยวะข้างเคียง และต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ซิดได้ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาให้ถูกต้อง

(<http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor>)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะ  
 ที่มา: <http://www.plwc.org/plwc/MainConstructor>



รูปที่ 2 เชื้อนุภายในกระเพาะปัสสาวะ  
 ที่มา: <http://www.webpathology.com/image.cfm?n=22&Case=56>

### 2.3.1 อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นมะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในระบบอวัยวะขับถ่ายและอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายรองมาจากมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยพบประมาณ 2.88 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็งทั้งหมด ส่วนใหญ่พบในคนอายุ 60-70 ปีขึ้นไป ในปี 1990 และ 1995 จะพบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในประเทศไทยอายุโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยจะอยู่ระหว่าง 50-70 ปี ([www.elibonline.com/doctors/cancer\\_skin.html](http://www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html)) โดยเพศชายพบมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 2 ต่อ 1

### 2.3.2 สาเหตุของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

พบอุบัติการณ์สูงในคนที่สูบบุหรี่และผู้ที่ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมทำสี โรงงานทอผ้า โรงงานฟอกหนัง อุตสาหกรรมยาง พลาสติก สิ่งพิมพ์ โลหะบางชนิด รวมถึงช่างทำผม สารเคมีจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีหลักฐานว่าทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น B-Naphthylamine, Xenylamine, 4-Nitrocbiphenyl, Benzidine จากสถิติพบว่า 33 เปอร์เซ็นต์ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นคณงานหรือผู้ที่อยู่ใกล้เคียงกับโรงงานอุตสาหกรรมดังกล่าว รวมทั้งการระคายเคืองและอักเสบเรื้อรังของกระเพาะปัสสาวะ ไม่ว่าจะเนื่องจากการติดเชื้อโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะเชื้อไวรัสพยาธิพอกซิโตโซมา (*Schistosoma Haematobium*) หรือจากก้อนนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ การคั่งของน้ำปัสสาวะนาน ๆ จากโรคอัมพาตครึ่งล่างของร่างกาย หรือโรคอื่น ๆ เช่น โรคไขสันหลัง โรคเบาหวาน ก็เป็นสาเหตุชักนำของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้เช่นกัน

### 2.3.3 อาการของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

พบว่าประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยมักมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด โดยไม่มีอาการเจ็บปวด บางรายอาจมีเพียงเลือดหยดออกมาเมื่อปัสสาวะสุด บางครั้งอาจจะมีอาการคล้ายกระเพาะปัสสาวะอักเสบ คือ ถ่ายปัสสาวะบ่อยแสบหรือขัดเนื่องจากเลือดที่ออกจับตัวเป็นลิ่ม ในระยะลุกลามจะมีอาการปวดได้มากและบางรายมีการอุดตันของท่อไต ทำให้มีอาการปวดหลังได้ด้วยเช่นกัน

### 2.3.4 การวินิจฉัยโรค

การตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคโดยการตรวจปัสสาวะนั้น มักจะพบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงหรือเลือดมีจำนวนมาก หากสงสัยจะทำการตรวจโดยการส่องกล้องเข้าไปในกระเพาะปัสสาวะ (cystoscopy) หรือเอ็กซเรย์โดยการฉีดสารทึบรังสีที่ขับออกทางปัสสาวะ เพื่อแสดงตำแหน่งหรือร่องรอยของโรคภายในกระเพาะปัสสาวะ รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อจากกระเพาะปัสสาวะ

### 2.3.5 ลักษณะทางพยาธิวิทยา

โดยส่วนใหญ่ประมาณ 90-95% ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีลักษณะเป็น Transitional Cell Carcinoma (TCC) แต่สามารถพบเป็นชนิด Adenocarcinoma ได้ 3% และชนิด Squamous cell carcinoma พบได้ 3-7%

### 2.3.6 ระยะและระดับเกรดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

นิมรายนผลเป็นทั้งระยะ (stage) และระดับเกรด (grade) โดยระยะของมะเร็งเป็นการบ่งบอกข้อมูลจากการวินิจฉัยของแพทย์ว่ามะเร็งมีการกระจายไปมากเพียงใด เพื่อการวิเคราะห์การบำบัดรักษาต่อไป ในทางการแพทย์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะนิยมแบ่งระยะของมะเร็งเป็นระบบ TNM (TNM classification) TNM มีความหมายคือ tumor node และ metastasis โดย tumor เป็นการบอถึงถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ node เป็นการบอถึงถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองและ metastasis เป็นการแสดงถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น ๆ ที่อยู่ไกลออกไป สำหรับการรายงานผลนิมรบอกระยะเป็น early (superficial) bladder cancer หรือ noninvasive และ invasive bladder cancer

### 2.3.7 การรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

แนวทางในการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งได้ดังนี้

1. Surgery คือ การผ่าตัดเอาเนื้อร้ายออก เพื่อป้องกันการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้
2. Radiation therapy คือ ใช้รังสีในการรักษาร่วมกับการผ่าตัด โดยอาจให้ก่อนหรือหลังการผ่าตัด
3. Chemotherapy คือการใช้สารเคมีในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

## 2.4 วิธีการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

### 2.4.1 วิธีการศึกษาทั่วไป

เป็นการศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อเยื่อ เช่น การตรวจด้วยรังสีเอ็กซ์ การใช้กล้องส่องตรวจภายในกระเพาะปัสสาวะ และการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อโดยแพทย์พยาธิแพทย์ว่าผู้ป่วยมีลักษณะของเนื้อเยื่ออยู่ในระยะใด

### 2.4.2 วิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

การศึกษการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมะเร็งโดยวิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น Tumor Cytogenetics (TC), Polymerase Chain Reaction (PCR), Comparative Genomic Hybridization (CGH) และ Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) เป็นต้น

ซึ่งศึกษาโดยใช้เทคนิคทาง TC โดยวิธีการเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วตามด้วยการย้อมสีพิเศษชนิด G-band และ karyotype พบความผิดปกติกับโครโมโซมหลายแห่ง ความผิดปกติที่พบบ่อย ได้แก่ ความผิดปกติทางจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมแห่งที่ 1, 3, 6, 11 และ 17 (Gibes และคณะ, 1984; Berger และคณะ, 1986; Babu และคณะ, 1987; Smeets และคณะ, 1987; Vanni และคณะ, 1988)

สำหรับเทคนิค FISH เป็นเทคนิคในการหาช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (gene mapping) โดย Stefan และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วยชาย 1 คน และหญิง 1 คน ในประเทศเยอรมัน โดยเทคนิค FISH โดยใช้ตัวติดตามจากชุด CEP 9 และ 17 ของ Vysis พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมดังกล่าว เช่นเดียวกับ Hussein และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 50 ปี ในประเทศอิตาลี โดยใช้เทคนิค FISH พบการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 7 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9, 10, 11, 17, 19 และโครโมโซม Y รวมทั้ง Slovak และคณะ (2001) ได้ศึกษาโดยใช้เทคนิค S-FISH (Spectral Fluorescence *in situ* Hybridization) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบความผิดปกติของโครโมโซมที่ 7, 8, 9, 10, X และ Y

เช่นเดียวกับ Michael และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 105 คน โดยใช้ตัวติดตามโครโมโซมคู่ 1, 17 และ Y พบการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 1 ร้อยละ 46 และโครโมโซมคู่ 17 ร้อยละ 40 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y ร้อยละ 20 รวมทั้ง Aurelia และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 63 ปี ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 7 และ 8 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9, 10, 11, และโครโมโซม Y

โครโมโซมร่างกายที่นิยมทำการศึกษาด้วยเทคนิค FISH คือ โครโมโซมคู่ที่ 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 17 และ 19 รวมทั้งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเพศ ดังเช่น Stamouli และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาคความผิดปกติของโครโมโซมเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยใช้ตัวติดตามเฉพาะ โครโมโซม X และ Y พบว่า ในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นเพศชาย จะมีการขาดหายไปของโครโมโซม Y และโครโมโซม X เพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ แต่ในรายที่ผู้ป่วยเป็นเพศหญิง กลับพบว่าโครโมโซม X มีจำนวนโครโมโซมปกติ

นอกจากการศึกษาจากเนื้อเยื่อแล้วยังมีผู้ศึกษาเซลล์มะเร็งที่ได้จากน้ำปัสสาวะ ดังเช่น Ishiwata และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 44 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 69.2 ปี ในประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เทคนิค FISH ศึกษาเซลล์จากน้ำปัสสาวะ และใช้ตัวติดตามโครโมโซมคู่ 9 และ 17 จากชุด Vysis พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9 ร้อยละ 75 และโครโมโซมคู่ที่ 17 ร้อยละ 51 รวมทั้ง Jaime และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุตั้งแต่ 20 - 80 ปี ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยตัวติดตามคือโครโมโซม X และ Y พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y เฉลี่ยเป็นร้อยละ 3.1 โดยอัตราดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับอายุของผู้ป่วย

## 2.5 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction หรือ PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล โดยเป็นวิธีเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (in vitro) เนื่องจากยีนแต่ละชนิดจะมีจำนวนน้อยในจีโนม ดังนั้นถ้าจะศึกษา ยีนใดๆจะต้องมีวิธีเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอชิ้นนั้นให้มากขึ้น เพื่อที่จะมีปริมาณที่พอเพียงในการนำมาทำการทดลองต่างๆได้ วิธี PCR สามารถทำให้เราศึกษา ยีนต่างๆได้ง่ายขึ้นโดยการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัดจำนวน (ทวิศักดิ์, 2541)

วิธีการ PCR คิดขึ้นโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราะห์ ชาวอเมริกัน ในปีค.ศ. 1985 โดย PCR มีทฤษฎีคล้ายกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในเซลล์ (DNA replication) กล่าวคือ เป็นวิธีการที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) สร้างดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบโดยการต่อสาย โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) แต่ขบวนการ PCR อาศัย oligonucleotide primer 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะจับกัน (anneal) กับดีเอ็นเอเส้นตรงข้าม เนื่องจากมีเบสคู่สมกัน (complementary) โดยไพรเมอร์จะหันปลายด้าน 3'-OH ของไพรเมอร์เข้าหากัน ถ้ามีเอนไซม์ DNA polymerase อยู่ด้วยก็จะเกิดการสร้างดีเอ็นเอขึ้นโดยการต่อปลายจากไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้น ตามดีเอ็นเอต้นแบบจนกระทั่งสุดปลายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการสร้างดีเอ็นเอจะทำได้ในทิศทางเดียว คือ จาก 5' ไปยัง 3' ผลที่ได้คือดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ที่เกิดจากดีเอ็นเอต้นแบบ การสร้างดีเอ็นเอทำซ้ำอีกได้โดยการนำปฏิกิริยามาทำที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ก็จะเป็นการแยกดีเอ็นเอเส้นคู่ที่ได้ใหม่ให้เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ถ้าลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสม คือ ที่อุณหภูมิจึงไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งเส้นเก่าและเส้นที่สร้างใหม่ จากนั้น DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอขึ้นมา โดยอาศัยวิธีการเป็นรอบๆซ้ำๆกัน กล่าวคือทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบกลายเป็นเส้นเดี่ยว ให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอ และการสร้างดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ DNA polymerase ในที่สุดจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็นทวีคูณ ถ้าทำแบบนี้ 20 รอบจะได้ดีเอ็นเอจำนวนประมาณ 1 ล้านเท่า โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถตั้งโปรแกรมการทำงานให้เป็นรอบๆได้ การทำ PCR ทำได้โดยการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนเป็นที่เรียบร้อยแล้วซึ่งประกอบด้วย ส่วนประกอบของปฏิกิริยาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ (primer) dNTP บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีไอออนบวกเช่น  $Mg^{2+}$  และเอนไซม์ Taq polymerase

## 2.6 ยีน *c-myc*

โดยยีน *c-myc* เป็น oncogene ที่สำคัญยีนหนึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมมนุษย์คือ 8q24 ซึ่งจะประกอบไปด้วยตำแหน่งที่มีการถ่ายทอดสับยีน (exon) 3 บริเวณ การถอดรหัสจะเริ่มต้นที่บริเวณที่เป็นตำแหน่งที่ RNA polymerase มาจับเพื่อเริ่มต้นการสร้าง RNA (promoter) การแปลรหัสจะเริ่มด้วยรหัส AUG ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณตำแหน่ง exon ที่ 2 จะผลิตกรดอะมิโนหลัก ๆ ได้หลาย

ชนิดรวมทั้ง โปรตีนจากยีน *c-myc* ด้วย (64 kDa *c-Myc* protein) การแปลรหัสจะเริ่มจากที่ตำแหน่ง บริเวณดังกล่าวทั้งโปรตีนในรูปแบบที่เป็นสายสั้นและสายยาว

ในเซลล์ปกติการแสดงออกของยีน *c-myc* จะถูกควบคุมโดยสัญญาณจากภายนอกเช่น growth factor และการเชื่อมต่อกับของเหลวภายนอกเซลล์ เซลล์ปกติจะมีการแสดงออกของยีน *c-myc* เล็กน้อย แต่ถ้าหากมีการกระตุ้นโดย growth factor จะมีการแสดงออกของยีน *c-myc* เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นการตอบสนองของยีนอย่างทันที การแสดงออกของยีน *c-myc* จะเกิดขึ้นใน กระบวนการแบ่งเซลล์และสามารถกลับสู่สภาวะปกติในรูปของเซลล์ลูก (daughter cell) ในเซลล์ ระยะเริ่มแรกจะมีการป้องกันเซลล์ที่ผิดปกติของยีน *c-myc* โดยวิธีที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์โดย จะขึ้นอยู่กับการทำงานของยีน *p19/p14 ARF* และ *p53* แสดงให้เห็นว่าในยีนปกติจะมีกระบวนการ กำจัดยีน *c-myc* ที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เซลล์ที่ผิดปกตินั้นตาย (apoptosis) จึงเป็นการป้องกันการแปรเปลี่ยนไปของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตด้วย

การทำงานของยีน *c-myc* ซึ่งมีผลทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์สามารถเกิดได้หลายวิธี เช่นเกิดการย้ายที่ของส่วนของโครโมโซมในกรณีของ Burkitt's lymphoma การเพิ่มจำนวนของยีน *myc* ทำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน *myc* เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด ดังเช่น Karasawa และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ใน CML (Chronic Myelogenous Leukemia) โดยใช้เทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์บริเวณ exons ที่ 1 ของ ยีน *c-myc* และใช้ตำแหน่งของยีน  $\beta$ -globin เป็นตัวควบคุม จากการศึกษาพบว่ามีเกิดการ เพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และ Chrzan และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* ในมะเร็งเต้านม และ adjacent non-neoplastic tissue โดยความสัมพันธ์ของจำนวนของยีน *c-myc* และระดับการทำงานในการแสดงออกของยีน *c-myc* ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดความผิดปกติของมะเร็งเต้านม การเพิ่มขึ้นของ ยีน *c-myc* ที่ศึกษาด้วยเทคนิค PCR เพิ่มขึ้น 21 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Watson และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ทั้งในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งเต้านม เนื้อเยื่อ มะเร็งที่มีการรุกราน และเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการแพร่กระจายไปตามระบบท่อน้ำเหลือง โดยเทคนิค PCR โดยใช้ลำดับของดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล GenBank รหัส J00120 และ J00119 ในการ ออกแบบไพรเมอร์ โดยแถบดีเอ็นเอของการทำ PCR จะมีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งปริมาณดีเอ็นเอ ต้นแบบ และจำนวนรอบของการทำ PCR และ Borg และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการเกิดการ เพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งเต้านม โดยการใช้เทคนิค Southern blot พบว่าการเพิ่มขึ้นของ ยีน *c-myc* และมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่มีอายุมากขึ้น (40-50 ปี) รวมทั้ง Abba และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก โดยทำการเปรียบเทียบความผิดปกติที่ เกิดจากการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และที่เกิดจากการบูรุกของไวรัส HPV (Human Papillomavirus) โดยการใช้เทคนิค LS – PCR (Low Stringency - Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค RG –

PCR (Reference Gene Polymerase Chain Reaction) ในการตรวจสอบ พบว่าการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อชนิด epithelial จะมีเปอร์เซ็นต์สูงมาก และส่วนใหญ่จะมีการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ประมาณ 3-7 ชุดของยีน และพบการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในมะเร็งปากมดลูก ประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ (72/304) และพบการบุกรุกของไวรัสประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ (117/304)

สำหรับการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ Christoph และคณะ(1999) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้งหมด 40 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ในตำแหน่ง *c-myc* (sense 5'-GGA ACA AGA AGA TGAG-3' , antisense 5'-CCA AGA CGT TGT GTG-3') พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะมีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ 35% (14/40) โดยในจำนวนนี้จะมี 3 ตัวอย่างที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของยีน(strong increase amplification) มากกว่าตัวอย่างอื่น และจะพบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างนี้อยู่ในระยะ(stage) pT3 เกรด(grade) G3 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *c-myc* และ stage/grade

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- 3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin
  - 3.1.1.1 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
  - 3.1.1.2 Buffer T1
  - 3.1.1.3 สารละลาย Proteinase K
  - 3.1.1.4 Buffer B3
  - 3.1.1.5 Ethanol
  - 3.1.1.6 Nucleospin tissue column
  - 3.1.1.7 Buffer BW
  - 3.1.1.8 Buffer B5
  - 3.1.1.9 Buffer BE
  - 3.1.1.10 งานเพาะเชื้อ
  - 3.1.1.11 ไบมีดโกน
- 3.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
  - 3.1.2.1 Sterile Water
  - 3.1.2.2 10X PCR Buffer (Invitrogen)
  - 3.1.2.3 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
  - 3.1.2.4 20 µM Primer Forward (Invitrogen)
  - 3.1.2.5 20 µM Primer Reverse (Invitrogen)
  - 3.1.2.6 1.25 mM dNTP(Invitrogen)
  - 3.1.2.7 2 U/µl Tag DNA polymerase (Invitrogen)
  - 3.1.2.8 ดีเอ็นเอเป้าหมาย
  - 3.1.2.9 หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตรและ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
  - 3.1.3.1 สารละลาย TBE
  - 3.1.3.2 สีย้อม
  - 3.1.3.3 ethidium bromide
  - 3.1.3.4 agarose gel

### 3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 20 รายเป็นเพศชายทั้งหมด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลราชวิถี และตัวอย่างเซลล์กระพุ้งแก้มในเพศชายปกติจำนวน 1 ราย เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ภายหลังจากเก็บตัวอย่างทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

### 3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 25 มิลลิกรัม โดยใบมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. หั่นเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆมากที่สุด โดยมีการใส่สารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 50-70 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันเซลล์แข็งในขณะทำการหั่นเซลล์ แล้วนำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม Buffer T1 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำการผสมโดยใช้เครื่อง Vortex
4. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน
5. เมื่อครบเวลานำตัวอย่างมาทำการผสมโดยการ vortex พร้อมตรวจสอบการย่อยของตัวอย่าง แล้วนำเติม Buffer B3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
6. ทำการผสมโดยการ vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
8. ดูดส่วนใส (supernatant) ที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่
9. เติม ethanol ความเข้มข้นประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 210 ไมโครลิตร
10. ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ย้ายไปใส่ Nucleospin tissue column ที่มี collecting tube
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที พร้อมทั้งของเหลวใน collecting tube ที่
12. เติม Buffer BW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที พร้อมทั้งของเหลวใน collecting tube ที่
13. เติม Buffer B5 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที พร้อมทั้งของเหลวใน collecting tube ที่
14. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อให้แห้ง

15. ย้าย Nucleospin tissue column ด้านบนที่มี membrane จับกับดีเอ็นเอไปวางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

16. เติม Buffer BE ที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

17. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

### 3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

#### 3.3.2.1 โดยการวัดค่าความดูดกลืนแสง

การวัดค่าความดูดกลืนแสงนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้และดูความบริสุทธิ์ ซึ่งในการวัดค่าความดูดกลืนแสงนั้น จะใช้ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรในการวัด โดยช่วงความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร นั้นจะใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอและช่วงความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร จะใช้ในการวัดการปนเปื้อนของโปรตีน ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)} = A \times 50 \text{ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} \times B$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง(เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร / ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.80-2.00 ในกรณีที่มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอและถ้าค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน

#### 3.3.2.2 โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดมาได้มีดีเอ็นเอตามที่เรากำลังต้องการหรือไม่ โดยเทียบจากแถบมาตรฐานที่ทราบขนาดของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกขนาดบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1-1.5 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย TBE buffer และนำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

### 3.3.3 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการศึกษาในครั้งนี้ใช้ลำดับเบสของยีน *c-myc* จากฐานข้อมูล GenBank และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้โดย โปรแกรม Clustal X และทำการสร้างสายนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์เพื่อเป็นตัวแทนของลำดับเบสเพื่อนำไปทำการ

ออกแบบไพรเมอร์ตามต้องการโดยใช้ โปรแกรม Primer 3 พร้อมกับการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของไพรเมอร์โดยใช้ โปรแกรม Olicocale และ Mfold โดยได้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบโดยใช้ฐานข้อมูลของยีน *c-myc* เป็นต้นแบบ

ชนิด	ตำแหน่ง เริ่มต้น	ความยาว (คู่เบส)	ค่า Tm	เปอร์เซ็นต์ GC	ลำดับเบส
Left primer	634	20	60	50.00	5'CTTGAACAGCTACGGAACTC3'
Right primer	835	20	56	40.00	5'TCCAATTTGAGGCAGTTTAC3'

### 3.3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส บริเวณตำแหน่งของยีน *c-myc* ขั้นตอนการทดลองทำโดย การเติมสารเคมีต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 2 ลงในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะดังนี้คือ Initial Denaturation อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที Annealing อุณหภูมิ 50, 52, 54 °C นาน 50 วินาที และ Extension อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที โดยใช้จำนวนรอบเป็น 27, 30, 35 รอบ และ Final Extension อุณหภูมิ 72 °C นาน 9 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 2 แสดงสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา

สารเคมี	ปริมาตร
DNA template (100,200,300 ng)	1 $\mu$ l
Left primer (20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Right primer (20 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
1.25 mM dNTP	4 $\mu$ l
10X PCR buffer	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,2,3 $\mu$ l
Tag DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
DDW	13.5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

3.3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่-โพลีเมอเรสโดยสภาวะที่สำคัญมีดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (Template concentration)

ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (Magnesium concentration)

อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Primer annealing)

จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Cycle number)

การทดลองนี้เริ่มหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเริ่มจาก

1. การหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 100 200 และ 300 นาโนกรัม ตามลำดับ
2. การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมเท่ากับ 2, 4 และ 6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
3. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่อุณหภูมิ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ
4. การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่จำนวน 27 30 และ 35 รอบตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์

ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ในสภาวะต่างๆ คือ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ระดับอุณหภูมิของการจับกันของไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอเป้าหมาย และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย

##### 4.1.1 ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 100 200 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบส มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ ต่างๆ กัน การทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 200 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบสที่ชัดเจนแล้ว

##### 4.1.2 ความเข้มข้นของแมกนีเซียม

ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแมกนีเซียม ในการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ ในระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ 2, 4 และ 6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าแถบของดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบส ที่ระดับความเข้มข้นที่ 4 มิลลิโมลาร์มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจง และความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด

##### 4.1.3 อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ในขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาว 202 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียสมีผลิตภัณฑ์และมีความจำเพาะมากที่สุด

##### 4.1.4 จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ 27 30 และ 35 รอบ พบว่าที่จำนวน 30 รอบให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ชัดเจนและมีความจำเพาะมากที่สุด

##### 4.1.5 สามารถหาสภาวะที่เหมาะสม

สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอร์ได้ดังนี้

จากรูปที่ 3 แสดงตัวอย่างการเกิดขนาดของชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาด 202 คู่เบส และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยมีตัวควบคุมที่เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อน (contaminate control) และตัวควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติ โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาดระยะห่างเท่ากับ 100 คู่เบสเป็น marker จากผลที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 202 คู่เบส และมีแถบที่มีความเข้มข้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือกลุ่มที่ไม่มี amplification คือ lane 3 (ตัวอย่างที่ 004), lane 5 (ตัวอย่างที่ 007), lane 6 (ตัวอย่างที่ 008), lane 7 (ตัวอย่างที่ 010), lane 13 (ตัวอย่างที่ 020) และ lane 14 (ตัวอย่างที่ 021) กลุ่มที่ 2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 202 คู่เบส และมีแถบที่มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือกลุ่มที่มี amplification คือ lane 4 (ตัวอย่างที่ 005), lane 10 (ตัวอย่างที่ 013), lane 11 (ตัวอย่างที่ 014), lane 15 (ตัวอย่างที่ 023) และ lane 16 (ตัวอย่างที่ 024) และ กลุ่มที่ 3 ไม่มีแถบเกิดขึ้น คือ lane 8 (ตัวอย่างที่ 012), lane 9 (ตัวอย่างที่ 013) และ lane 12 (ตัวอย่างที่ 019) ดังรายละเอียดของตัวอย่างทั้งหมดในตารางที่ 3

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนซ้ำของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากผู้ป่วยจำนวน 20 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อของคนปกติ 1 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่มีแถบที่มีความเข้มข้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติ หรือ ไม่มี amplification จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 35 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด มีแถบที่มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือมี amplification จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด และไม่มีแถบเกิดขึ้นจำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดซึ่ง ผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตัวอย่างทั้ง 20 ราย แสดงในตารางที่ 4

ในกรณีแบ่งตามระยะของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วยจำนวน 20 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อในระยะ noninvasive จำนวน 5 ราย และระยะ invasive จำนวน 15 ราย พบว่าในระยะ noninvasive มีแถบที่มีความเข้มข้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือไม่มี amplification จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ noninvasive มีแถบที่มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือมี amplification จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ noninvasive และไม่มีแถบเกิดขึ้นจำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 20 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ noninvasive สำหรับผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ invasive พบว่ามีแถบที่มีความเข้มข้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือไม่มี amplification จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ invasive มีแถบที่มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติหรือมี amplification จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ invasive และไม่มีแถบเกิดขึ้นจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 26.66 ของจำนวนผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ invasive ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของผู้ป่วยโรคมะเร็ง  
กระเพาะปัสสาวะจำนวน 20 ราย

ระยะ	ตัวอย่างที่	ลักษณะการเกิดความผิดปกติ
Noninvasive	004	+
	006	+
	013	-
	017	++
	024	++
Invasive	005	++
	007	+
	008	+
	009	++
	010	+
	011	-
	012	-
	014	++
	015	++
	016	-
	018	++
	019	-
	020	+
	021	+
	023	++

หมายเหตุ

- คือ ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (No banding)
- + คือ มีแถบที่มีความเข้มข้นเท่ากับกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติ (Normal)
- ++ คือ มีแถบที่มีความเข้มข้นมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติ (Amplification)

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดความผิดปกติของยีน *c-myc* กับระยะของโรค

ระยะของโรค	Normal	Amplification	No Banding
Noninvasive	40% (2/5)	40% (2/5)	20% (1/5)
Invasive	33.33% (5/15)	40% (6/15)	26.66% (4/15)
รวม	35% (7/20)	40% (8/20)	25% (5/20)

จากรายงานการศึกษามาก่อนด้วยเทคนิค CGH ในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งเทคนิค CGH เป็นการตรวจสอบความผิดปกติทั้งจีโนมเพื่อนำไปสู่การศึกษาในระดับลึกในตำแหน่งที่เกิดความผิดปกติ โดยตำแหน่ง 8q (8q21-qter) เป็นตำแหน่งที่เกิดความผิดปกติชนิด amplification ได้บ่อย (Kallionimie และคณะ, 1995; Voorter และคณะ, 1995; Richter และคณะ, 1997; Knuutila และคณะ, 1998) โดยเป็นที่ยืนยันถึงตำแหน่งของยีนต่างๆบนแท่งโครโมโซมเรียบร้อยแล้ว และจากการศึกษาของสุพัตรา และคณะ (2546) ที่ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค CGH พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่พบบ่อยคือการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมตำแหน่งที่ 1q, 8p, 9q และ 22q โดยการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม 8 พบความผิดปกติ 38.46% ที่สอดคล้องกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อของมะเร็งเต้านม มะเร็งที่รังไข่ และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น (Knuutila และคณะ, 1998) รวมทั้งเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ดังเช่น การศึกษาของ Bruch และคณะ (1998) ที่พบ amplification ตำแหน่ง 8q22.2-q22.3 ในเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะชนิด Transitional cell carcinoma รวมทั้งการศึกษาโดยเทคนิค FISH กับเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ พบการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 7 และ 8 (Aurelia และคณะ, 1995) จึงเชื่อว่าตำแหน่ง 8q น่าจะมียีนชนิด oncogene ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรค และจาก Genome database พบตำแหน่ง 8q24 มียีน *c-myc* ซึ่งเป็นยีนชนิด oncogene (Sauter และคณะ, 1995; Bruch และคณะ, 1998) โดยตำแหน่งที่มี amplification ของโครโมโซมน่าจะเป็นตำแหน่งของยีนชนิด oncogene ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดและพัฒนาระยะของโรค (Knowles, 2001) เช่นเดียวกับ amplification ของยีน *HER2/NEU* ที่เป็นความผิดปกติที่พบบ่อย จึงได้ถูกนำมาใช้พยากรณ์โรค และติดตามผลการรักษาในมะเร็งเต้านม (Konigshoff และคณะ, 2003; Cho และคณะ, 2003)

ซึ่งโดยทั่วไปในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เทคนิค FISH นิยมศึกษาบนโครโมโซม 3, 7, 9, 17, X และ Y เนื่องจากมีตัวติดตามสำเร็จรูป ซึ่งไม่ว่าจะเทคนิค CGH และ FISH จะมีข้อจำกัด เช่น ความยากในการเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้องใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งปริมาณมาก ในเทคนิค FISH สามารถศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมได้ที่ละ 1-5 ตำแหน่ง

แม้ว่าเทคนิค CGH สามารถศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมได้ทั้งจีโนมแต่ความละเอียดสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในคลินิกได้ยาก รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาถึงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอและจำนวนชุดของการเกิด amplification โดยเป็นเทคนิคที่ใช้เพียงดีเอ็นเอของสิ่งส่งตรวจนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ใช้เวลาสั้นในการตรวจ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาประยุกต์และพัฒนาการตรวจสู่ระดับคลินิกได้ง่าย อันนำไปสู่การวินิจฉัยโรค การพยากรณ์โรค และดูแลการตอบสนองต่อการรักษา และจากการศึกษาโดยเทคนิค CGH พบความผิดปกติของโครโมโซม 8 ได้บ่อยจึงเป็นตำแหน่งที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษาดำเนินการวินิจฉัยโรคมะเร็งระยะเริ่มแรกต่อไป

จากการทดลองพบว่าการเกิดการเพิ่มขึ้นแบบเป็นชุดของยีน *c-myc* ในโรคมะเร็งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองของ Christoph และคณะ(1999) ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกและการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* ด้วยเทคนิค PCR ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะมีการเพิ่มจำนวนชุดของยีนมากกว่าเนื้อเยื่อที่ปกติ 35% ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ตัวอย่างที่มีการเกิด amplification ของยีน *c-myc* มี 40% และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทย โดยเทคนิค CGH พบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 8 เท่ากับ 38.46% และเช่นเดียวกับ Chrzan และคณะ (2001) ที่ศึกษาการเกิดความผิดปกติในการเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* และการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* ในมะเร็งเต้านมและ adjacent non-neoplastic tissue โดยแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนการเพิ่มขึ้นของยีน *c-myc* กับระดับการแสดงออกของโปรตีน *c-myc* อย่างมีนัยสำคัญกับเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม แต่ไม่สอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *c-myc* กับระยะการดำเนินโรค เนื่องจากในการทดลองนี้การเกิด amplification ระหว่างตัวอย่างเนื้อเยื่อระยะ Noninvasive กับระยะ Invasive ให้ค่าไม่แตกต่างกันคือ 40%

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาคั้งนี้ทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ในตำแหน่งของยีน *c-myc* โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 202 คู่เบส เพื่อตรวจสอบการมี amplification ของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากผู้ป่วยจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดและความเข้มข้นของกลุ่มควบคุมที่มาจากดีเอ็นเอของคนปกติ พบว่า ไม่มี amplification หรือ normal คิดเป็นร้อยละ 35 มี amplification คิดเป็นร้อยละ 40 และไม่มีชิ้นดีเอ็นเอเกิดขึ้น คิดเป็นร้อยละ 25 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด และเมื่อแบ่งตามระยะของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าผู้ป่วยในระยะ noninvasive จำนวน 5 ตัวอย่าง ไม่มี amplification คิดเป็นร้อยละ 40 มี amplification คิดเป็นร้อยละ 40 และไม่มีชิ้นดีเอ็นเอเกิดขึ้น คิดเป็นร้อยละ 20 สำหรับผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ invasive จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าไม่มี amplification คิดเป็นร้อยละ 33.33 มี amplification คิดเป็นร้อยละ 40 และไม่มีชิ้นดีเอ็นเอเกิดขึ้นคิดเป็นร้อยละ 26.66

จากการศึกษาพบว่าการเกิด amplification ในส่วนของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะให้ผลไม่แตกต่างกับการไม่เกิด amplification ทั้งผลโดยรวมและแบ่งตามระยะของโรค จึงอาจกล่าวว่าการศึกษาด้วยเทคนิคนี้ยังไม่สามารถแยกข้อแตกต่างในการเกิด amplification ในส่วนของยีน *c-myc* ในเนื้อเยื่อมะเร็งได้ รวมทั้งไม่สามารถแยกข้อแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อในระยะ noninvasive กับระยะ invasive ได้เนื่องจากให้ค่าไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาควรศึกษาในหลายๆตำแหน่งของยีนนี้ และในหลายๆยีน เนื่องจากการเกิดมะเร็งเป็นการกลายที่มีหลายขั้นตอน (multistep) รวมทั้งเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด เช่น ไม่สามารถหาความผิดปกติของการมีการขาดหายไปและการเกินขึ้นมาของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสใดเบสหนึ่งได้ จึงควรทำการศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น FISH, RFLP เพื่อศึกษาการกลายในระดับเบส และการแสดงออกของยีน (cDNA expression) รวมทั้งศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นเพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลมากขึ้นด้วย

## ขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และหน่วยคัดกรองระบบทางเดินปัสสาวะ ภาควิชา ศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อ

## เอกสารอ้างอิง

- ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. อนุชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2536. สถิติโรคมะเร็งที่พบในประเทศไทยประจำปี พ.ศ. 2536. กรุงเทพฯ. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, วรพจน์ ชุมทล้าย, บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค และ อมรา คัมภีรานนท์. 2546. การศึกษาความไม่สมดุลของดีเอ็นเอบนโครโมโซมในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้เทคนิคคอมพาราทีฟจีโนมิกไฮบริไดเซชัน. วารสารยูโร. 23: 8-16.
- Abba M.C., Laguens R.M., Dulout F.N. and Golijow C.D. 2004. The *c-myc* activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutation Res.* 557: 151–158.
- Aurelia M.M., Andrea M.P., Kristine L.K. and Avery A.S. 1995. FISH Studies of Urinary Cells of Patients with Bladder Cancer. *Urol Oncol.* 1: 234-239.
- Babu V.R., Lutz M.D., Miles B.J., Farah R.N., Weiss L. and Van Dyke D.L. 1987. Tumor behavior in transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chromosomal markers and histopathology. *Cancer Res.* 47 : 6800 - 6805.
- Berger C.S., Sandberg A.A., Todd I.A.D., Pennigton R.D., Haddad F.S., Hecht B.K. and Hecht F. 1986. Chromosome in Kindney, ureter, and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 23 : 1 - 24.
- Borg A., Baldetorp B., Fern M., Olsson H. and Sigurdsson H. 1992. *c-myc* amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Inter J. Cancer.* 51: 687-691.
- Bruch J., Wöhr G., Hautmann R., Mattfeldt T., Bruderlein S., Moller P., Sauter S., Hameister H., Vogel W. and Paiss T. 1998. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. *Gene Chromo Cancer.* 23 : 167-174.
- Chrzan P., Skokowski J., Karmolinski A., Pawelczyk T. 2001. Amplification of *c-myc* gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. *Clin.*

Biochem. 34: 557-562.

- Campo, E.; Miquel, R.; Jares, P.; Bosch, F.; Juan, M.; Leone, A.; Vives, J.; Cardesa, A. and Yague, J. 1994. Pronostic significance of Loss of heterozygosity of *Nm23-H1* and *p53* gene in human colorectal cacinoma. *Cancer*. 73: 2913-2921.
- Christoph F., Schmidt B., Schmidtz-Dräger B.J. and Schulz W.A. 1999. Over-expression and amplification of the *c-myc* gene in human urothelial carcinoma. *Inter J. Cancer*. 84: 169–173.
- Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley AM., Gabelli S.B., Denney D.W. and Leahy D. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 421 : 756-760.
- Deerasamee S., Martin N., Sontipong S., Sriamporn S., Sriplung H, Srivatanakul P., Vatanasapt V., Parkin D. and Ferlay J. 1999. Cancer in Thailand. International Agency for Research on Cancer. Technical Report Technical Report 34 : 23-25.
- Gibes Z., Prout G.R., Connolly J.G., Pontes J.E. and Sandberg A.A. 1984. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*. 44 : 1257 - 1264.
- Hiroaki S., Mikio I., Kazushi S., Masaharu T., Masao D., Masaki Y. and Leopoldo R., Christophere J. K. and Rajvir D. 2002.  $\beta$ -Catenin Mutations Correlate with Over Expression of *C-myc* and *Cyclin D1* Genes in Bladder Cancer. *J. Urology*, 168, 2220-2226.
- Hussein M.K., Magdy S.A. and Nadia M. 2004. Chromosomal aberrations in Cis and Ta bilharzial bladder cancer: a theory of pathogenesis. *Uro Oncol*. 22: 443–447.
- Iacopetta B., Di Grandi S., Dix B., Haig C., Soong R. and House A. 1994. Loss of heterozygosity of tumour suppressor gene loci in human colorectal carcinoma. *Euro J. Cancer*. 30A: 664-670.
- Ishiwata S., Takahashi S., Homma Y., Tanaka Y., Kameyama Y., Hosaka Y. and Kitamura T. 2001. Noninvasive Detection and Prediction of Bladder Cancer by Fluorescence in situ Hybridization Analyssis of Exfoliated Urothelial Cell in Voided Urine. *Uro*. 57: 811–815.
- Jaime B., Aurelia M.M., and Avery A.S. 1996. FISH Studies on the Y Chromosome Urinary Cells in Male. *Cancer Genet Cytogenet*. 88: 155-157.
- Kallionimie A., Kallionimie O.P., Citro G., Sauter G., DeVries S., Kerschmann R., Caroll P. and

- Waldman F. 1995. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Gene Chrom Cancer* 12 : 213 - 219.
- Karasawa M., Okamoto K., Maehara T., Tsukamoto N., Morita K., Naruse T. and Omine E. 1996. Detection of c-myc oncogene amplification in a CML blastic phase patient with double minute chromosome. *Leukemia Res.* 20:85-91.
- Knowles M.A. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. 2001. *Clin Pathol : Mol Pathol* 54 : 215-221.
- Knuutila S., Bjorkqvist A.M., Autio K., Tarkkanen M, Wolf M., Monni O., Szymanska J., Larramendy M.L., Tapper J., Pere H., El-Rifai W., Hemmer S., Wasenius V.M., Vidgren V. and Zhy Y. 1998. DNA copy number Amplification in human neoplasms. *Am J. Pathol.* 152 : 1107-1123.
- Konigshoff M., Wilhelm J., Bohle R.M., Pingoud A. and Hahn M. 2003. HER-2/neu gene copy number quantified by real-time PCR: comparison of gene amplification, heterozygosity, and immunohistochemical status in breast cancer tissue. *Clin. Chem.* 49 : 219-229.
- Lisa S., Mariann C., Hans M., Thomas H., Niels M., Claus K. and Torben O. 2000. Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genet and Cytogenet.* 123:109-113.
- Michael N., Urs W., Ulrico S., Daniel A., Tobias Z., Robert M., Goran A., Hartmut K., Marcus R. and Holger M. 1999. Polysomies but not Y chromosome losses have Prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Human Patho.* 30: 81-86.
- Miyamoto, H.; Shuin, T.; Ikeda, I.; Hosaka, M. and Kubota, Y. 1996. Loss of heterozygosity at the *p53*, *RB*, *DCC* and *APC* tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J. Uro.* 155: 1444-1447.
- Richter J., Jiang F., Gorog J.P., Sartorius G., Egenter C., Gasser T.C., Moch H., Mihatsch M.J. and Sauter G. 1997. Marked genetic differences between stage pTa and pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 23 : 167-174.
- Richter J., Beffa L., Wangner U., Schraml P., Gasser T.C., Moch H., Mihatsch M.J. and Sauter G. 1998. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J. Pathol.* 153 : 1615-1621.
- Sauter G., Carrol P., Moch H., Kallioniemi A., Kerschmann R., Narayan P., Mihatsch M.J. and

- Waldman F.M. 1995. C-myc copy number gain in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J. Pathol.* 146 : 1131-1139.
- Slovak M.L., Tcheurekdjian L., Zhang F.F. and Murata-collins J.L. 2001. Simultaneous Detection of Multiple Genetic Aberrations in Single Cells by Spectral Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Cancer Res.* 61: 831-836.
- Smeets W., Pauwels R., Laarakkers L., Debruyne F. and Geraedts J.1987. Chromosomal analysis of bladder cancer. III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet cytogenet* 29 :29-41.
- Stamouliia M.I., Panania A.D., Fertib A.D, Petrakia C., Oliver R.T.D., Raptisa S.A. and Young B.D. 2004. Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet and Cytogenet.* 149: 107-113.
- Stefan D.,Kristin M., Ruth K., Peter J.W., Maximilian B., Arndt H. and Robert S. 2006. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses. *Human Patho.* 37: 143– 151.
- Vanni R., Scarpa R.M., Nieddu M. and Usai E. 1988. Cytogenetic investigation on 30 bladder carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 30 : 35 - 42.
- Vooter C., Joos S., Bringuies P.P., Vallinga M., Poddighe P., Schalken J., Manior S., Ramaekers F., Lichter P. and Hopman A. 1995. Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am. J. Patho.* 146 : 1341 - 1354.
- Watson P.H., Safneck J.R., Le K., Dubik D. and Shiu R.P.C. 1993. Relationship of *c-myc* amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor, and lymph node metastasis. *J. national cancer institute.* 85: 902–907.
- Zauber, N.P.; Sabbath-Solitare, M.; Marotta, S.P. and Bishop, D.T. 1999. *K-ras* mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with in *situ* carcinoma. *Cancer.* 86: 31-36.
- [http://www.chulacancer.net/p0000027\\_3.htm](http://www.chulacancer.net/p0000027_3.htm)
- <http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm>
- <http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor>
- <http://www.plwc.org/plwc/MainConstructor>
- <http://www.webpathology.com/image.cfm?n=22&Case=56>