



การตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูแฮมสเตอร์  
ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วย

เมลาโทนินร่วมกับเจมไซตาบีน

Response of IL-5<sup>+</sup> and IL-13<sup>+</sup> cell numbers in cholangiocarcinoma-  
induced hamsters and treated with  
melatonin in combination with gemcitabine

ธีราภรณ์	จินยี่
ปิ่นณพร	น้ำทิพย์
วรรษยา	สิทธิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)  
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
ปีการศึกษา 2565

**หัวข้อวิทยานิพนธ์**

การตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูแฮมสเตอร์  
ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วยเมลาโทนินร่วมกับ  
เจมิไซตาบิน

**ชื่อนิสิต**

นางสาวธีรารัตน์ จินยี่  
นางสาวปณณพร น้ำทิพย์  
นางสาววรรษยา สิทธิ


**สาขาวิชา**

เทคนิคการแพทย์

**อาจารย์ที่ปรึกษา**

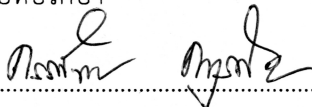
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชฉันทน์ วงศ์เสนา

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรีนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

  
.....

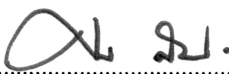
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชฉันทน์ วงศ์เสนา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

  
.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต คงรส)

หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์

  
.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภวิฑู สุขเพ็ง)

คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

**หัวข้อวิทยานิพนธ์**

การตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูแฮมสเตอร์  
ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วยเมลาโทนินร่วมกับ  
เจมไซตาบีน

**ชื่อนิสิต**

นางสาวธีราภรณ์ จินยี  
นางสาวปณิตพร น้าทิพย์  
นางสาววรรษยา สิทธิ


**สาขาวิชา**

เทคนิคการแพทย์

**อาจารย์ที่ปรึกษา**


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชนันท์ วงศ์เสนา

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ขอรับรองว่านิสิตผ่านการสอบ  
ปากเปล่าวิทยานิพนธ์ โดยได้มีการปรับปรุงแก้ไขรายงานตามข้อเสนอแนะจากคณะกรรมการแล้ว

.....  


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชนันท์ วงศ์เสนา)

ประธานกรรมการ

.....  


(ดร.กิตติศักดิ์ แก้วนาชม)

กรรมการ

.....  


(ดร.เชิดชาย แซ่ฮ่วน)

กรรมการ

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชรัตน์ วงศ์เสนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยช่วยเหลือ แนะนำ สั่งสอน แสดงข้อคิดเห็น และชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ ของวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอด

ดร.กิตติศักดิ์ แกวนาชม และ ดร.เชิดชาย แซ่ฮ้วน ที่สละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ปิ่นละออ สังกัดคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ขึ้นเนื้อฉบับหูแอมสเตอร์ที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้

ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ธีราภรณ์ จินยี

ปัทมพร น้ำทิพย์

วรรษยา สิทธิ

<b>หัวข้อวิทยานิพนธ์</b>	การตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5+ และ IL-13+ ในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วยเมลาโทนินร่วมกับเจมิไซตาบิน
<b>ชื่อนิสิต</b>	นางสาวธีราภรณ์ จินยี นางสาวปณณพร น้ำทิพย์ นางสาววรรษยา สิทธิ
<b>สาขาวิชา</b>	เทคนิคการแพทย์
<b>อาจารย์ที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชันทน์ วงศ์เสนา

### บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลการตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine ในชิ้นเนื้อตับ

**วิธีการศึกษา** ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> โดยดูการแสดงออกของ IL-5, IL-13 และ CD4 ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC) และดูการแสดงออกของ eosinophil, basophil และ neutrophil ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) กลุ่มตัวอย่างเป็นหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการให้ระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ (OV) ร่วมกับสารก่อมะเร็ง (NDMA) จากนั้นแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม (ON: OV+NDMA) 2) กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย melatonin (ONM: OV+NDMA+melatonin) 3) กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย gemcitabine (ONG: OV+NDMA+gemcitabine) 4) กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine (ONMG: ON+NDMA+melatonin+gemcytabine) จำนวนกลุ่มละ 5 ตัวเป็นเวลา 1 เดือน

**ผลการศึกษา** ผล IHC พบว่าชิ้นเนื้อตับแฮมสเตอร์ทั้ง 4 กลุ่มมีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ส่วนผล H&E พบว่าจำนวน eosinophil, basophil และ neutrophil มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) เช่นกัน โดยแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับ melatonin หรือ gemcitabine เมื่อใช้เพียงชนิดเดียวสามารถลดจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup> และ eosinophil ได้ และเมื่อใช้ melatonin ร่วมกับ gemcitabine สามารถลดจำนวนเซลล์ IL-13<sup>+</sup> และ eosinophil ได้มากขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณ basophil เมื่อเทียบกับการให้ gemcitabine เพียงอย่างเดียว

**สรุปผลการศึกษา** การใช้ melatonin ร่วมกับ gemcitabine ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในแฮมสเตอร์ สามารถลดจำนวนเซลล์ IL-13<sup>+</sup> และ eosinophil ได้ดีกว่าการใช้แบบเดี่ยวซึ่งอาจส่งผลในการลดการเจริญของมะเร็งและการเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ

Project Title	Response of IL-5+ and IL-13+ cell numbers in cholangiocarcinoma-induced hamsters and treated with melatonin in combination with gemcitabine
By	Teeraporn Jeenyee Pannapron Namthip Warachaya Sitthi
Program Title	Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Nasesuan University
Advisor	Assistant Professor Wachanan Wongsena, Ph.D.

---

## Abstract

**Objective:** To investigate the response of IL-5<sup>+</sup> and IL-13<sup>+</sup> cell numbers in cholangiocarcinoma-induced hamsters treated with melatonin in combination with gemcitabine.

**Method:** Immunohistochemistry (IHC) was used to determine the numbers of IL-5, IL-13 and CD4 expressing cells. In addition, Hematoxylin and Eosin staining (H&E) was used to determine eosinophil, basophil and neutrophil on the hamster liver tissues. Liver fluke metacercaria (OV) and NDMA were used to induce cholangiocarcinoma in hamsters. Hamsters were divided into 4 group: 1) control group (ON) 2) melatonin-treated group (ONM) 3) gemcitabine-treated group (ONG) 4) melatonin and gemcitabine-treated group (ONMG). Each group was treated for 1 month and contained 5 animals.

**Result:** For IHC, the numbers of IL-5<sup>+</sup> and IL-13<sup>+</sup> cells were statistically significant different amongst 4 groups ( $P < 0.001$ ). For H&E staining, the numbers of eosinophil, basophil and neutrophil were statistically significant different amongst 4 groups ( $P < 0.001$ ). Melatonin or gemcitabine alone could reduce the expressions of IL-5<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup> cells and eosinophils. In addition, melatonin combines with gemcitabine could significantly reduced the expression

of IL-13<sup>+</sup> cells and eosinophils, and also reduced the expression of basophil compared to gemcitabine alone.

**Conclusion:** The combination of melatonin and gemcitabine for the treatment of cholangiocarcinoma in hamsters could reduce the number of IL-13<sup>+</sup> and eosinophil cells better than the monotherapy. This may result in reduced cancer growth and tissue damage.



## สารบัญ

บทที่	หน้า
<b>1 บทนำ</b>	1
ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์	1
ขอบเขตการวิจัย	2
<b>2 ทบทวนวรรณกรรม</b>	3
มะเร็งท่อน้ำดี	3
พยาธิไปไม่ในตับ	5
Melatonin	7
Gemcitabine	10
N-nitrosodimethylamine (NDMA)	13
CD4 T cell	14
Innate lymphoid cells (ILC)	14
Neutrophil	21
Eosinophil	22
Basophil	23
Amphiregulin	23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
<b>3 วิธีดำเนินงานวิจัย</b>	26
3.1 รูปแบบการวิจัย	26

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	26
3.3 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง	26
3.4 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	26
3.5 วิธีดำเนินการทดลอง	28
3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล	30
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	30
<b>4 ผลการวิจัย</b>	<b>31</b>
4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunohistochemistry	31
4.2 ผลการวิเคราะห์จากสไลด์ที่ย้อม H&E	35
<b>5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	<b>41</b>
<b>6 สรุปผลการวิจัย</b>	<b>45</b>
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>46</b>
ภาคผนวก ก การเตรียมน้ำยาและสารเคมี	52
ภาคผนวก ข ข้อควรระวังในการย้อม IHC	53
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	<b>54</b>

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดงค่ากลางเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 โดยวิธี IHC	34
ตาราง 2 จำนวน Eosinophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	38
ตาราง 3 จำนวน Basophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	39
ตาราง 4 จำนวน Neutrophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	40

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 การจำแนกทางกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำดี บนพื้นฐานของแหล่งกำเนิด	3
ภาพ 2 การจำแนกทางจุลพยาธิวิทยาและเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดี	4
ภาพ 3 วงจรชีวิตและการติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ	6
ภาพ 4 การสังเคราะห์เมลาโทนิน	8
ภาพ 5 กลไกของ melatonin ในการต้านการเกิดมะเร็ง	10
ภาพ 6 ขั้นตอนแรกของการกระตุ้นของ Gemcitabine	11
ภาพ 7 ขั้นตอนที่สองของการกระตุ้นของ Gemcitabine	12
ภาพ 8 กลไกการตอบสนองต่อการติดปรสิตของ ILC2 (3)	16
ภาพ 9 กลไกของ IL-5 ต่อ eosinophil	17
ภาพ 10 แหล่งสร้างและ transcription factor ของ IL-9	18
ภาพ 11 เซลล์ที่สร้าง IL-9 และบทบาทในมะเร็ง	19
ภาพ 12 การทำงานของ IL-13 ในมะเร็ง	21
ภาพ 13 N1 และ N2 Tumor associated neutrophils (TANs)	22
ภาพ 14 การแสดงออกของ IL-5 ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยวิธี IHC	32
ภาพ 15 การแสดงออกของ IL-13 ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยวิธี IHC	33
ภาพ 16 กราฟแสดงจำนวนเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ในชิ้นเนื้อตับหนูด้วยวิธี IHC	34
ภาพ 17 (A) Eosinophil (B) Basophil และ (C) Neutrophil ในชิ้นเนื้อตับหนูในกลุ่ม ON ที่ย้อมด้วยสี H&E	36
ภาพ 18 เซลล์ Eosinophil, Basophil และ Neutrophil ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	37
ภาพ 19 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Eosinophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	38
ภาพ 20 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Basophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	39
ภาพ 21 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Neutrophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E	40

## สัญลักษณ์และคำย่อ

5-FU	5-Fluorouracil (5-FU)
AA-NAT	Arylakylamine N -acetyltransferase
AFMK	N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuranine
CCA	Cholangiocarcinoma
CDP	Citidinediphosphate
COX-2/iNOS	Cyclooxygenase-2/ inducible <i>nitric oxide</i> synthase
CSF-1	Colony-stimulating factor -1
CV	Coefficient of Variation
DAB	Diaminobenzidine
dCCA	Distal cholangiocarcinoma
dCDP	Deoxycytidine-diphosphate
EtoH	Ethyl alcohol
H&E	Hematoxylin & Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
hCNTs	Human concentrative nucleoside transporters
hENTs	Human equilibrative nuclear transporters
HOCl	Hypochlorous acid
HRP	Horseradish Peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
iCCA	Intrahepatic cholangiocarcinoma
IgE	immunoglobulin E
IHC	Immunohistochemistry
IL-5R alpha	Interleukin-5 receptor, subunit alpha
ILC	Innate lymphoid cells
ILC2	Innate lymphoid cell type 2
LMS	Leiomyosarcoma

NDMA	N-nitrosodimethylamine
NO	Nitric oxide
ON	<i>Opisthorchis viverrine</i> + N-nitrosodimethylamine
ONG	<i>Opisthorchis viverrine</i> + N-nitrosodimethylamine + Gemcytabine
ONMG	<i>Opisthorchis viverrine</i> + N-nitrosodimethylamine + Melatonin
Orf	open reading frame
OV	<i>Opisthorchis viverrine</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate-buffered saline with Tween 20
pCCA	Perihilar cholangiocarcinoma
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
ROR	Retinoid orphan receptor
ROS	Reactive oxygen species
RZR	Retinoid-Z-receptor
TAMS	Tumor associated macrophages
TME	Tumor microenvironment

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

Cholangiocarcinoma (CCA) เป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อผิวภายในท่อน้ำดีเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ ในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพบในผู้ชาย 135 คนและในผู้หญิง 48 คนต่อประชากรแสนคน ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ที่สูงที่สุดในโลก ในแต่ละปีมีผู้ป่วยชาวอีสานเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีประมาณ 14,000 คน พบว่ามีปัจจัยเสี่ยงหลักคือการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrine* (OV) จากการรับประทานอาหารปรุงไม่สุก เช่น ก้อยปลา ปลาดิบ ปลาร้าที่ไม่สุก เป็นต้น มะเร็งท่อน้ำดีมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี เนื่องจากผู้ป่วยในระยะแรกจะไม่มีอาการแสดงที่จำเพาะทำให้ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์เมื่อมีอาการระยะท้ายๆ โดยส่วนใหญ่จะมีอาการตัวเหลืองตาเหลือง และแน่นอน สำหรับการรักษาก็ขึ้นอยู่กับตำแหน่งและระยะของโรค ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการผ่าตัดร่วมกับการใช้เคมีบำบัดหลังการผ่าตัดเพื่อเพิ่มโอกาสการหายขาด (1)

Innate lymphoid cell type 2 (ILC2) เป็นเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ โดยส่วนใหญ่พบใน ปอด ลำไส้ ผิวหนัง และเนื้อเยื่อไขมัน มีหน้าที่ในการตอบสนองต่อปรสิต หนองพยาธิ และควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดที่ 2 ตลอดจรรยาฐานะสมดุลของเนื้อเยื่อต่างๆ โดย ILC2 จะสามารถหลั่ง cytokine ชนิดต่างๆ เช่น IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 และ Areg ซึ่งถูกกระตุ้นโดย IL-25 และ IL-33 ที่หลั่งจากเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บ พบว่า ILC2 และมะเร็งมีความสัมพันธ์กันคือผู้ป่วยมะเร็งจะมีปริมาณ ILC2 สูงกว่าในคนปกติ การนำ melatonin มาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง พบว่าเมลาโทนิสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งได้ (2-6) ด้วยเหตุผลข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการตอบสนองต่อจำนวนของ ILC2 ในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine ในชั้นเนื้อตับ

#### วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

เพื่อศึกษาผลการตอบสนองต่อจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine ในชั้นเนื้อตับ ในการรักษา มะเร็งท่อน้ำดีของหนูแฮมสเตอร์

### ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีของหนูแฮมสเตอร์โดยใช้ melatonin และ gemcitabine โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> โดยดูการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) โดยใช้ชิ้นเนื้อตับจากหนูแฮมสเตอร์ ทั้งหมด 4 กลุ่มๆละ 5 ตัว ได้แก่ 1) OV-induced CCA เป็นกลุ่มควบคุม (control) 2) OV-induced CCA ได้รับ melatonin 50 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ 3) OV-induced CCA ได้รับ gemcitabine 25 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ 4) OV-induced CCA ได้รับ melatonin 50 mg/kg และ gemcitabine 25 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ โดยเลี้ยงหนูแฮมสเตอร์ทั้ง 4 กลุ่มเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นทำการุณฆาตและเก็บชิ้นเนื้อตับรักษาสภาพในสารละลาย 10% formalin

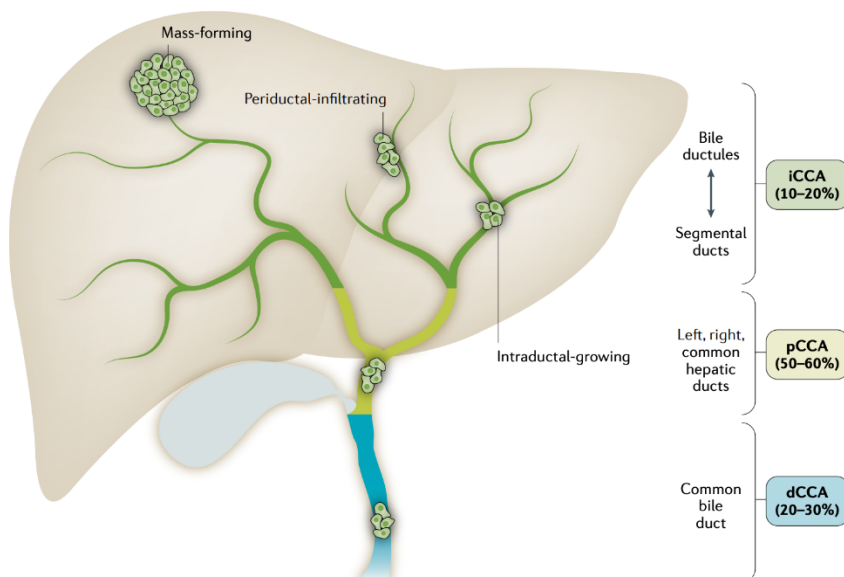


## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### มะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดีทางเดินน้ำดีภายในตับและภายนอกตับที่เจริญผิดปกติ เป็นมะเร็งที่มีการพยากรณ์โรคไม่ดีเนื่องจากผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์เมื่อมีอาการในระยะท้ายของโรค



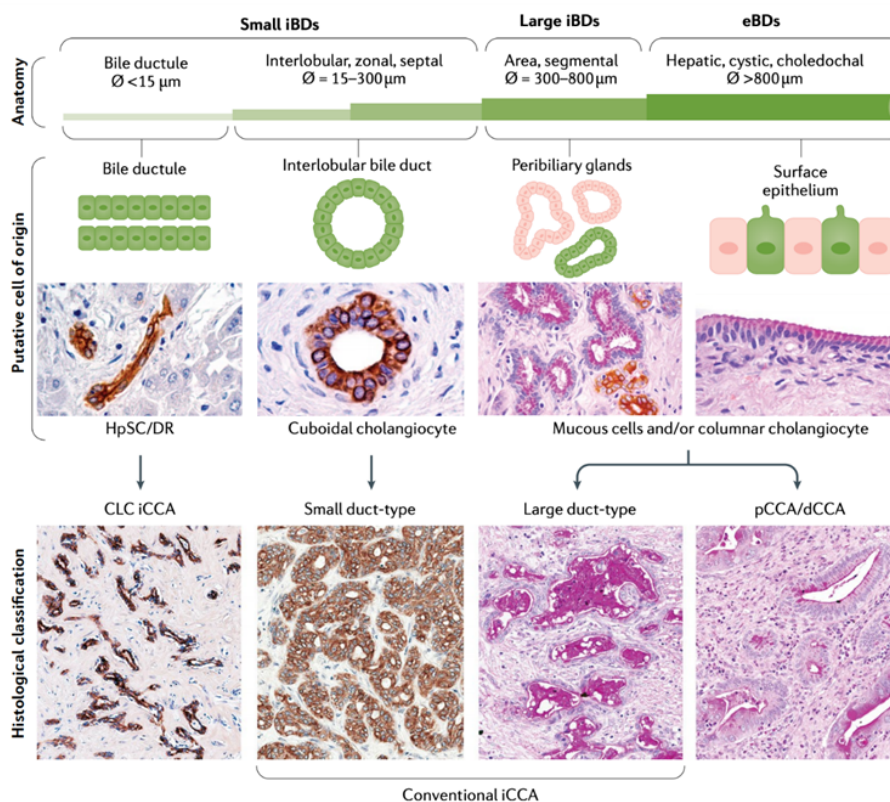
#### ภาพ 1 การจำแนกทางกายวิภาคของมะเร็งท่อน้ำดี บนพื้นฐานของแหล่งกำเนิด

มะเร็งท่อน้ำดี แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. Intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA) มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดภายในตับ เกิดขึ้นที่บริเวณแขนงท่อน้ำดีขนาดเล็กที่อยู่ภายในตับ ซึ่งบางครั้งทำให้เกิดความสับสนว่าเป็นมะเร็งตับ
2. Perihilar cholangiocarcinoma (pCCA) มะเร็งท่อน้ำดีบริเวณท่อน้ำดีที่ออกจากตับบริเวณที่ท่อน้ำดีติดด้านซ้ายและด้านขวามารวมกันที่ด้านนอกของตับ ซึ่งเป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิดที่พบมากที่สุด (50-60%) และทำให้มีการอุดตันของท่อน้ำดีหลักของตับทั้งกลีบซ้ายและขวา
3. Distal cholangiocarcinoma (dCCA) มะเร็งท่อน้ำดีบริเวณท่อน้ำดีส่วนปลาย เกิดขึ้นที่ท่อ

น้ำดีภายนอกตับบริเวณส่วนปลายของท่อน้ำดีที่เชื่อมต่อกับลำไส้เล็กตอนต้นในส่วน duodenum หรือบริเวณที่เรียกว่า common bile duct

การจำแนกทางจุลพยาธิวิทยาและเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดีขึ้นอยู่กับขนาดของท่อ โดยท่อน้ำดีภายในตับสามารถแบ่งย่อยได้อีกเป็น intrahepatic bile ducts (iBDs) หรือท่อน้ำดีภายในตับขนาดเล็กและขนาดใหญ่ iBD ขนาดเล็กเรียงไปด้วยเซลล์บุท่อทรงลูกบาศก์ขนาดเล็ก (cuboidal cholangiocytes) ในขณะที่ iBD ขนาดใหญ่ เซลล์บุท่อจะเป็นรูปร่างและสร้าง mucus ได้ (columnar and mucous cholangiocytes) โดยปกติ iBD ขนาดใหญ่จะมีต่อมน้ำเหลืองอยู่ภายในผนังดังแสดงในภาพจำลองเป็นสีเขียว และ mucus แสดงเป็นสีชมพูอ่อนในภาพ 2 (7)



ภาพ 2 การจำแนกทางจุลพยาธิวิทยาและเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งท่อน้ำดี

### อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี

โรคมะเร็งท่อน้ำดีจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งเมื่อแบ่งแยกตามภาค โดยในปี พ.ศ. 2554-2557 มีอัตราการตาย 34.9, 34.9, 35.5 และ 35 ต่อประชากรแสนคน รองลงมาคือภาคเหนือ อัตราตาย 22.4, 22.9, 25.7 และ 25.2 ต่อประชากรแสนคน ตามลำดับ จังหวัดอุบลราชธานีก็มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่เพิ่มขึ้นโดยในปี พ.ศ. 2556 และ 2557 มีอัตราการตาย 32.99 และ 42.6 ต่อประชากรแสนคน สะท้อนให้เห็นถึงความรุนแรงจากโรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสุขภาพที่พบได้มากในภาคอีสาน

อุบัติการณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศแถบตะวันตก มีเพียง 0.5-2 ต่อประชากรแสนคน แต่มีอุบัติการณ์สูงในภูมิภาคเอเชีย และพบความชุกของมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย มีอัตราป่วยสูงถึง 14.6 ต่อประชากรแสนคน เป็นที่น่าสังเกตว่า มะเร็งตับและท่อน้ำดีในประเทศไทยเมื่อแยกตามพยาธิวิทยา พบว่าอัตราส่วนของมะเร็งตับและท่อน้ำดีในจังหวัดภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีอัตราส่วนของมะเร็งท่อน้ำดีมากกว่ามะเร็งเซลล์ตับทั้งในเพศชายและเพศหญิง (1)

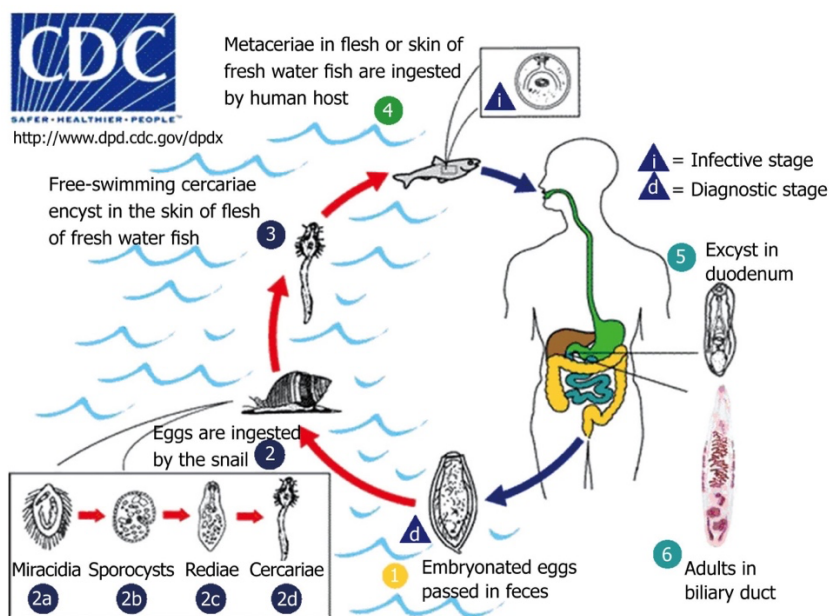
### พยาธิใบไม้ในตับ

พยาธิใบไม้ตับที่พบในมนุษย์มี 5 ชนิด ซึ่งทั้ง 5 ชนิดมีวงจรชีวิตและสามารถก่อโรคได้คล้ายคลึงกัน โดยในประเทศไทยพบเฉพาะ *Opisthorchis viverrini* ซึ่งเป็นโรคประจำถิ่นในไทย ลาว กัมพูชา และเวียดนาม ส่วน *Fasciola hepatica* และ *Fasciola gigantica* เป็นโรคประจำถิ่นในทวีปอเมริกา ยุโรป เอเชีย แถบตะวันตกของแปซิฟิกและแอฟริกาเหนือ *Opisthorchis felinus* เป็นโรคประจำถิ่นในรัสเซีย ไชปีเรีย ยูเครน และคาซัคสถาน และ *Clonorchis sinensis* เป็นโรคประจำถิ่นในจีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน และบางส่วนของรัสเซีย (8)

### วงจรชีวิตและการติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ

พยาธิตัวเต็มวัยจะอาศัยในท่อน้ำดีของคน แมวและสุนัขซึ่งเป็นโฮสต์เฉพาะ พยาธิอาจจะอาศัยในถุงน้ำดีหรือท่อของตับอ่อน ไชจะปนออกมากับน้ำดีเข้าสู่ลำไส้เล็กและออกมาพร้อมกับอุจจาระ ดังภาพ 3 (หมายเลข 1) ถ้าถ่ายอุจจาระลงในน้ำพวกหอยซึ่งเป็นโฮสต์กลางที่หนึ่ง (หมายเลข 2) จะกินไชพยาธิภายในตัวหอย ไชจะฟักตัวเป็นตัวอ่อน miracidia (2a) ซึ่งจะเจริญไปเป็น sporocysts (2b) rediae (2c) และ cercariae (2d) ตามลำดับ cercariae จะออกจากหอย (หมายเลข 3) และเข้าสู่ปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาแม่สะแด้ง ปลาตะเพียนขาว ปลาสวายนกเขา ปลาสูตร และปลากะมัง ซึ่งเป็นโฮสต์ตัวกลางที่สอง

และเจริญเป็น metacercaria ในเนื้อปลา (หมายเลข 4) ซึ่งเป็นระยะติดต่อเมื่อคนหรือสัตว์ที่เป็นโฮสต์ เฉพาะรับประทานปลาดิบๆสุกๆ เช่น ก๋วยปลา metacercaria จะออกจาก cyst เข้าสู่ลำไส้เล็ก (หมายเลข 5) และเคลื่อนที่เข้า ampulla of Vater สู่ท่อน้ำดี และเจริญเป็นตัวแก่และออกไข่ใน 3-4 สัปดาห์ (หมายเลข 6) (9)



ภาพ 3 วงจรชีวิตและการติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ

### การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีกับ *O. viverrini*

ในขั้นต้น การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับทำให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันของท่อน้ำดีตีบขนาดใหญ่ และ portal connective tissue อย่างไรก็ตามการติดเชื้อเรื้อรังและการอักเสบแสดงให้เห็นว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงสำหรับการพัฒนาของการเกิดมะเร็งหลายระยะ แม้จะรักษาได้ง่ายด้วยยาต้านหนอนพยาธิ praziquantel แต่การติดเชื้อซ้ำและการติดเชื้อเรื้อรังสามารถพบได้เป็นปกติ

ในการติดเชื้อเรื้อรัง สามารถพบการเกิด hyperplasia ได้ทั้งแบบ adenomatous และ granulomatous การอักเสบของเยื่อหุ้มท่อน้ำดีซึ่งเกิดจากผลผลิตทางเมตาบอลิซึมของพยาธิใบไม้และการบาดเจ็บที่เกิดจาก oral และ ventral suckers ในกระบวนการย่อยอาหารของพยาธิใบไม้ และการเคลื่อนที่ของพยาธิทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อซึ่งนำไปสู่การเกิดแผลของเนื้อเยื่อรอบนอก วิธีนี้ทำให้ไข่พยาธิสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบๆ ผลผลิตทางเมตาบอลิซึมของพยาธิใบไม้ อาจเป็นพิษหรือสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และสามารถส่งผลกระทบต่อเยื่อ

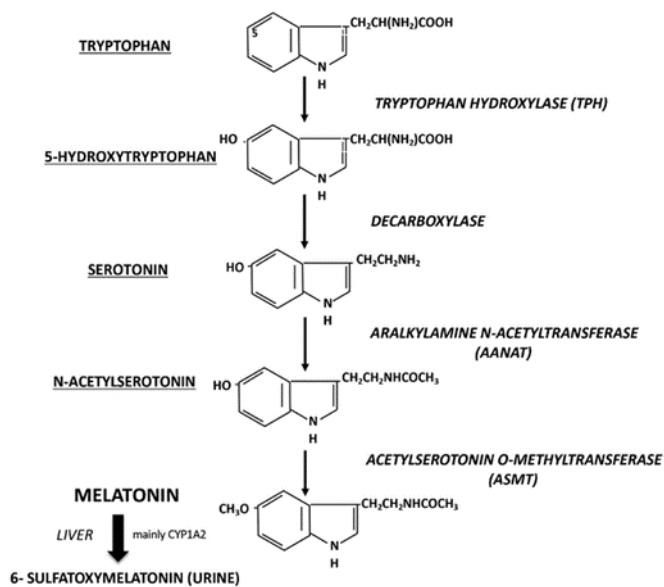
บุผิวท่อน้ำดีเพื่อกระตุ้นให้เกิด hyperplasia ได้เกิด Infiltration ของเซลล์อักเสบมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *O. viverrini* ซึ่งการติดเชื้อซ้ำหลายครั้งเป็นปัจจัยในการเกิด CCA โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิต nitric oxide (NO) เพิ่มขึ้น เกิดการยับยั้งการซ่อมแซม DNA และการยับยั้งการ apoptosis ของเซลล์ ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ N-nitrosamines เช่น N-dimethylnitrosamine (NDMA) (10)

## Melatonin

melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) เป็นสาร Indoleamine ที่ผลิตจากต่อมไพเนียลเพื่อตอบสนองต่อความมืด มีหน้าที่หลายอย่างรวมถึงการควบคุมจังหวะการเต้นของหัวใจ นอกจากนี้การสังเคราะห์ melatonin ยังพบได้ในอวัยวะอื่นๆ อีกหลายแห่ง เช่น เรตินา ระบบทางเดินอาหาร ผิวหนัง ไชกระดูก และ lymphocyte หลายการศึกษาได้รายงานว่า melatonin สามารถต้านมะเร็งหลายชนิดได้ โดยอาศัยการรบกวนลักษณะเด่นต่างๆของมะเร็ง (11)

### การสังเคราะห์ melatonin

melatonin สังเคราะห์ขึ้นภายใต้การควบคุมของระบบประสาท sympathetic โดยต่อมไพเนียลจะกระตุ้น pineocytes cell ให้เปลี่ยน tryptophan ไปเป็น 5-hydroxytryptophan โดยเอนไซม์ Tryptophan hydroxylase และไปเป็น serotonin โดย decarboxylase จากนั้น serotonin จะถูก acetylated เพื่อสร้าง N-acetylserotonin โดย arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) ซึ่ง N-acetylserotonin จะถูกเปลี่ยนเป็น melatonin โดย Acetylserotonin O-methyltransferase ตามลำดับ ดังภาพ 4 โดยมีความมืดเป็นตัวกระตุ้นและแสงสว่างเป็นตัวยับยั้ง (12)



ภาพ 4 การสังเคราะห์เมลาโทนิน

### กลไกการออกฤทธิ์ของ melatonin

melatonin ที่ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดและส่งผลต่อไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยมีกลไกในการออกฤทธิ์ 4 ลักษณะ คือ

1. จับกับ melatonin receptor ที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจำแนกชนิดตัวรับออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ 1) MT1 พบที่สมองและส่วนน้อยที่อวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ หลอดเลือด ต่อมลูกหมาก ต่อมน้ำนม ถุงน้ำดี ผิวหนัง และเซลล์เม็ดเลือดขาว มีผลยับยั้งอัตราการเกิดกระแสประสาทที่ suprachiasmatic nucleus และการสร้างฮอร์โมน prolactin จาก pars tuberalis ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด 2) MT2 พบที่ cerebellum หัวใจ หลอดเลือด และบริเวณจอตา มีหน้าที่ในการยับยั้งการปล่อย dopamine ที่จอตา ชักนำการเพิ่มของเซลล์ม้าม ยับยั้งการ leukocyte rolling ในหลอดเลือดแดง และเพิ่มการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิด vasodilation และ 3) MT3 พบที่ สมอง ไตและปอด มีผลกระตุ้นการทำงานของ phosphoinositol เพิ่มแคลเซียมในกระแสเลือดและป้องกันกระบวนการเกิดพิษ
2. จับกับ nuclear receptor โดย melatonin สามารถซึมผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจับกับ นิวเคลียส ซึ่งประกอบด้วย retinoid-Z-receptor (RZR) และ retinoid orphan receptor (ROR) มีบทบาทเกี่ยวกับการปรับจังหวะในรอบวันและระบบภูมิคุ้มกัน
3. จับกับโปรตีนภายในเซลล์โดย melatonin สามารถซึมผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์ไปจับกับโปรตีน

ภายในเซลล์ เช่น calmodulin ส่งผลยับยั้งเอนไซม์ calmodulin kinase II ทำให้จับกับ calcium ได้น้อยลง ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันและรักษามะเร็งเต้านม

4. จับกับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ระดับ mitochondria โดย melatonin สามารถซึมผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปรวมกับอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น hydroxyl, hydrogen peroxide, superoxide, nitric oxide, hypochlorous acid (HOCl) เป็นต้น จึงทำให้ melatonin มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพตัวหนึ่ง (13)

### Melatonin กับการรักษามะเร็ง

จากผลการวิจัยต่างๆ พบว่า melatonin มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง อย่างไรก็ตาม การศึกษาพบว่า melatonin สามารถลดความมีชีวิตของเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด B16F10 โดยการปรับวิถี P13 K/Akt/TOR ในมะเร็งผิวหนังซึ่งเป็นมะเร็งที่เกิดจากความเสียหายของ DNA เนื่องจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตมากเกินไป melatonin มีผลช่วยเพิ่มการต้านมะเร็งของ fisetin โดยการยับยั้งการส่งสัญญาณ NF-kB/p300 และ COX-2/iNOS และกระตุ้น cytochrome c-dependent apoptosis pathway ในการศึกษาอื่นพบว่า melatonin ยังแสดงผลต้านมะเร็งต่อมะเร็งที่หลัง prolactin จากต่อมใต้สมอง melatonin กระตุ้นการ Apoptosis โดยการกระตุ้น mitochondria และการเพิ่มการผลิต ATP

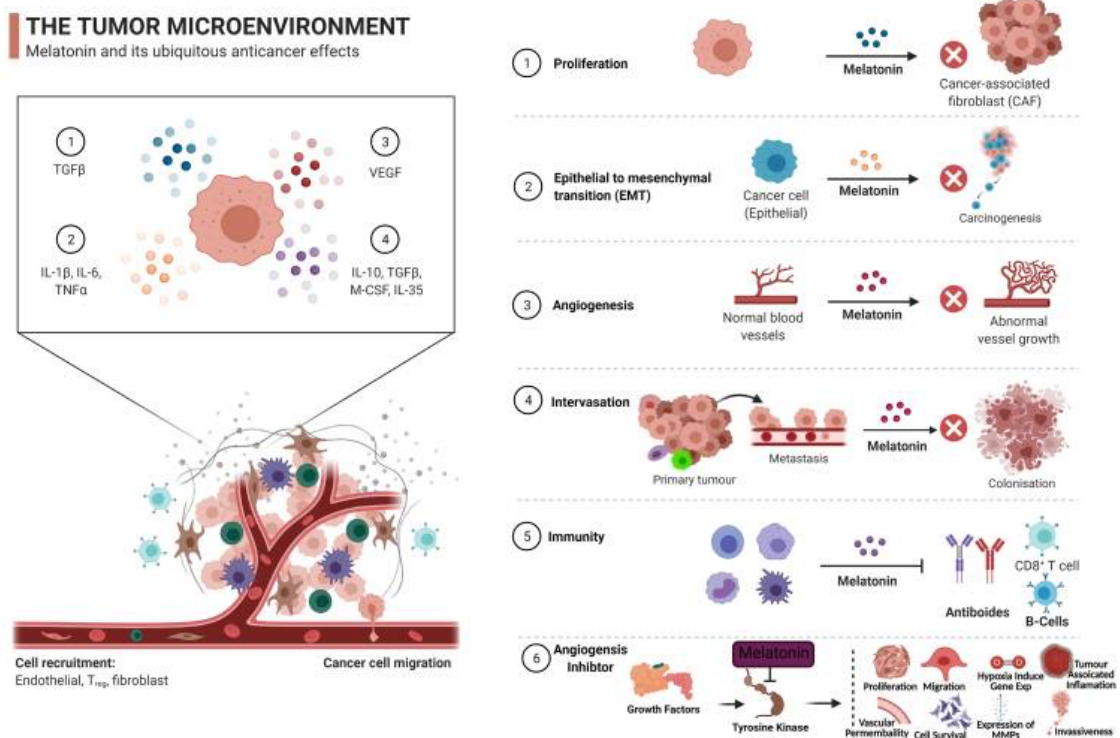
ในมนุษย์ melatonin ยังสามารถยับยั้ง leiomyosarcoma (LMS) ได้โดยการยับยั้งผลของการดูดซึม linoleic acid และ aerobic glycolysis และ melatonin สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณที่ให้และเวลาการให้ใน alveolar rhabdomyosarcoma

นอกจากนี้ melatonin ยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีต่อ pulmonary adenocarcinoma A549 cell, glioblastoma A172 cells, chondrosarcoma sw-1353 cells, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid HL-60 โดยการปรับลดฟังก์ชันและการแสดงออกของ adenosine triphosphate-binding cassette transporter ABCG2/BCRP

melatonin และเคมีบำบัดบางชนิดสามารถแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันได้ โดย melatonin ยังมีฤทธิ์ต้าน N-MC human Ewing sarcoma cancer cells เมื่อให้ยา vincristine และ ifosfamide อีกทั้ง melatonin ยังต้านการสร้างหลอดเลือด โดยการอาศัยกลไกต่างๆ ซึ่งรวมถึงกลไกที่ขึ้นกับตัวรับเมมเบรนและไม่ขึ้นกับตัวรับ ซึ่งการสร้างเส้นเลือดใหม่มีความสำคัญในการพัฒนาของมะเร็ง โดยทั่วไป

เซลล์มะเร็งจะกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยกระตุ้นปัจจัยสร้างหลอดเลือดและยับยั้งปัจจัยการกำเนิดหลอดเลือด

โดยรวมแล้ว melatonin มีกลไกการต้านมะเร็งที่หลากหลาย แสดงดังภาพ 5 และยังมีบทบาทสำคัญเมื่อให้ร่วมกับยาเคมีบำบัด (14)



ภาพ 5 กลไกของ melatonin ในการต้านการเกิดมะเร็ง

### Gemcitabine

gemcitabine ซึ่งเป็นยาที่มีความคล้าย nucleoside ของ deoxycytidine ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาในปี พ.ศ. 2539 และปัจจุบันมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษามะเร็งที่เป็นก้อน เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งปอด และ pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) การทำงานของ gemcitabine เป็นพิษต่อเซลล์ (2',2'-difluoro 2'-deoxycytidine, dFdC) ซึ่งส่งผลกระทบหลายประการในการสังเคราะห์ DNA เนื่องจากการแทนที่ของ fluorine ที่ตำแหน่ง 2' ของ furanose ring (15)



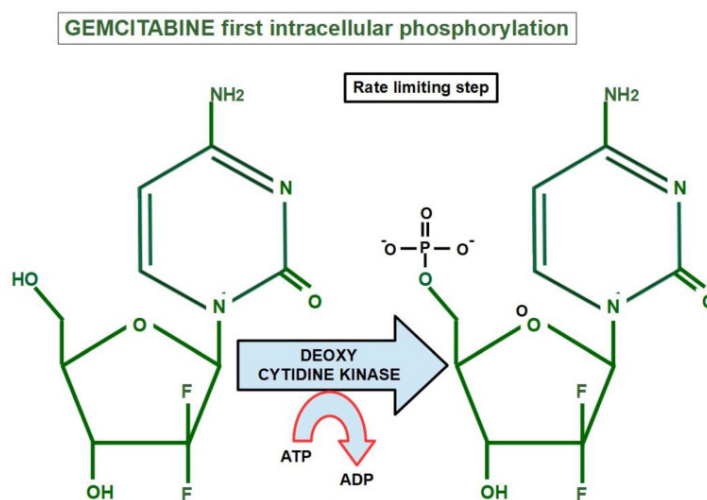
กลไกการออกฤทธิ์ ประกอบด้วย 4 รูปแบบ

**1. Drug access to the cell** หลังจากทีระบบไหลเวียนโลหิตส่งยาไปยังมะเร็งแล้วส่งผลให้ปริมาณหลอดเลือดในมะเร็งลดลง และ stroma หนาแน่นซึ่งล้อมรอบเซลล์มะเร็ง

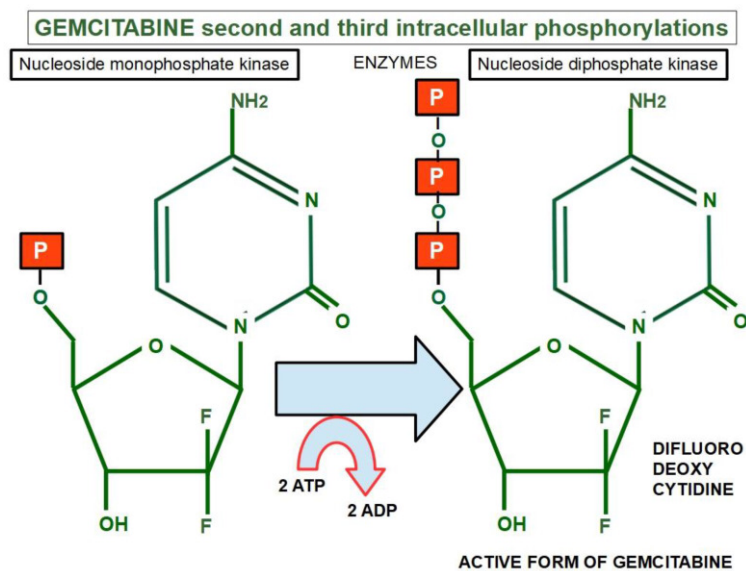
gemcitabine เป็นสารที่ชอบน้ำ ดังนั้นการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำจะช้า จึงต้องการตัวช่วยในการขนส่งเข้าสู่เซลล์มี 2 กลุ่มคือ 1) Human equilibrative nuclear transporters (hENTs) จะขับเคลื่อน gemcitabine ไปในทิศทางของการไล่ระดับความเข้มข้น 2) Human concentrative nucleoside transporters (hCNTs) เป็นสารต้านการขับออกของโซเดียมในขณะนำนิวคลีโอไซด์พลังงานที่ได้จากการ  $\text{Na}^+$  extrusion จะเป็นตัวช่วยในการขนส่งสามารถรวม Gemcitabine ทำให้เข้มข้น

Greenhalf และคณะ ศึกษาความแตกต่างในการรอดชีวิตโดยรวมในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด โดยจะมีการแสดงออกของ hENT1 สูงและต่ำ โดยบทบาทของการแสดงออกของ hENT1 ต่อประสิทธิภาพของการรักษาด้วย gemcitabine และ 5-FU/กรดโพลีนิค-กรดเสริมต่อการรอดชีวิตโดยรวมในผู้ป่วย PDAC

**2. Intracellular inactivation** ขั้นตอนแรกของการกระตุ้นประกอบด้วย phosphorylation โดย deoxycytidine kinase การได้รับ deoxycytidine kinase ที่ลดลงขัดขวางขั้นตอนแรกของการกระตุ้นของ gemcitabine ซึ่งส่งผลให้เกิดการต่อต้านการส่งออกที่ต่ำของ deoxycytidine kinase ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและการรอดชีวิตที่สั้นลงในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนที่ตัดออกได้ซึ่งได้รับเคมีบำบัด แสดงดังภาพ 6 จากนั้นเป็นขั้นตอนที่สองคือ การเพิ่มฟอสเฟตอีกสองตัวโดยเอ็นไซม์อีกสองตัว ได้แก่ nucleoside monophosphate kinase และ nucleoside diphosphate kinase ภาพ 7



ภาพ 6 ขั้นตอนแรกของการกระตุ้นของ Gemcitabine



ภาพ 7 ขั้นตอนที่สองของการกระตุ้นของ Gemcitabine

**3. Effects on DNA synthesis** Difluorodeoxycytidine triphosphate ร่วมกับ DNA ใหม่ ทำให้ขัดขวางการสร้าง DNA ต่อไป ส่งผลให้เซลล์ตายโดย gemcitabine ทำงานเป็น antimetabolite

การแสดงออกที่ต่ำหรือการหยุดทำงานของ deoxycytidine kinase หรือการทำงานของ gemcitabine ที่ลดลงนี้ พบว่าเป็นกลไกการดื้อ gemcitabine ที่พบบ่อย และ gemcitabine ยังยับยั้งเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งเปลี่ยน citidinediphosphate (CDP) เป็น deoxycytidine-diphosphate (dCDP) อย่างไรก็ตามการยับยั้ง ribonucleotide reductase เป็นการทำงานของ difluorodeoxycytidine diphosphate

gemcitabine สามารถส่งผลกระทบต่อ 4 ประการต่อ synthetic phase ของ cell cycle คือ

1. ยับยั้ง ribonucleotide reductase ซึ่งเปลี่ยน ribose nucleotides เป็น deoxyribose nucleotides และเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ deoxycytidine monophosphate ซึ่งหลังจาก phosphorylation จะถูกรวมเข้ากับ DNA
2. เป็น antimetabolite ยา gemcitabine ในรูปแบบออกฤทธิ์ (gemcitabine triphosphate) คือ รวมเข้ากับสาย DNA ขัดขวางกระบวนการ replication
3. gemcitabine ไม่ไวต่อการ excision-repair จึงทำให้เกิดการตายของเซลล์โดยทางอ้อม
4. นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ thymidylate

**4 Intracellular inactivation** gemcitabine ถูก catabolized ในเนื้อเยื่อผ่าน cytidine deaminase เอนไซม์นี้แปลง gemcitabine เป็น 2', 2'- difluorodeoxyuridine ซึ่งไปแข่งขันกับการดูดซึม gemcitabine เนื่องจากถูกขนส่งโดย hENT และ hCNT แสดงให้เห็นว่า cytidine deaminase มีบทบาทสองประการในการดื้อยา gemcitabine โดยทำให้ยาหมดฤทธิ์และโดยทางอ้อมจากการลดการส่งเข้าไปในเซลล์

สิ่งที่น่าสนใจคือ หากการบีบอัด difluorouridine ถูกปิดกั้นจะส่งผลยับยั้งต่อ cytidine delaminate โดย tumor associated macrophages (TAMS) กระตุ้นการแสดงออกของ cytidine deaminase ดังนั้นจึงทำให้ยาหยุดทำงานและมีส่วนร่วมกับเคมีบำบัด โดยทั่วไปเคมีบำบัดจะเพิ่ม colony-stimulating factor - 1 (CSF-1) ซึ่งเพิ่มการแทรกซึม ของ TAMS (16)

#### **N-nitrosodimethylamine (NDMA)**

เป็นสารเคมีที่เป็นพิษต่อทางพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย พบได้ในสิ่งแวดล้อม อาหาร เครื่องดื่ม บางชนิดและควันบุหรี่ มีรายงานว่าพบ NDMA ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ไต ปอด และตับ สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ (17)

อันตรายจาก NDMA แสดงให้เห็นว่าทำให้ตับถูกทำลายและการเกิดพังผืดของเนื้อเยื่อ โดยในสัตว์ทดลองพบว่าการสัมผัสกับ NDMA ทำให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมาก (cell hyperplasia) การสะสมไขมันในตับภายหลังการสัมผัส 7 วัน และการแทรกซึมของ neutrophil ที่รุนแรงในหลายๆ ตำแหน่งของเนื้อเยื่อตับ

NDMA เป็น nitrosamine ที่เป็นของเหลวที่ระเหยได้ ติดไฟได้ มีสีเหลืองและเป็นน้ำมัน โดยมีกลิ่นเฉพาะตัวเล็กน้อยเมื่อสลายตัวจากการสัมผัสกับแสง และปล่อยควันพิษของไนโตรเจนออกไซด์เมื่อถูกความร้อนจนสลายตัว NDMA ถูกใช้เป็นหลักในการวิจัยเพื่อกระตุ้นการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง สารนี้อาจก่อตัวขึ้นในระหว่างการปรุงอาหาร โดยเฉพาะเนื้อสัตว์และปลาที่ผ่านการเติมโซเดียมไนไตรท์เป็นสารกันบูด และยังพบได้ในผัก ซีส เครื่องดื่มแอลกอฮอล์และผลไม้หลายชนิด อีกทั้งเป็นสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยาง การสัมผัสกับ NDMA ส่งผลให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตา และมีฤทธิ์ทำลายตับ (18)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาและหลักฐานการทดลองกับสัตว์ หน่วยงานระหว่างประเทศเพื่อวิจัยโรคมะเร็ง (IARC) ได้ให้การยอมรับว่า NDMA และ N-nitrosodiethylamine (NDEA) อาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ N-nitrosamines อื่นๆ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อสัตว์ผลิตภัณฑ์ เช่น N-

nitrosodibutylamine (NDBA), N-nitrosopiperidine (NPIP) และ N-nitrosopyrrolidine (NPYR) จัดอยู่ในประเภทที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ เช่น มะเร็งลำไส้ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งหลอดอาหาร อ้างอิงจาก WHO ชีตจำกัดของ total nitrosamine ต่อวันคือ 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักร่างกายหน่วยกิโลกรัม เพื่อความปลอดภัยของอาหาร ระดับของอันตรายสารประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารต้องได้รับการตรวจสอบด้วยวิธีการที่เหมาะสมและเทคนิคต่างๆ (19)

#### CD4 T cell

CD4 T cell มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและกระตุ้น B cell และ CD8 T cell ถ้าเป็นเปปไทด์จะนำเสนอโดยโมเลกุล HLA-II และมีความสำคัญในการควบคุมและกำจัดการติดเชื้อโดยการผลิต cytokines ซึ่งสามารถดึงเซลล์อื่นๆของระบบภูมิคุ้มกันไปยังบริเวณที่ติดเชื้อเพื่อช่วยจัดการกับเชื้อโรคที่บุกรุก โดยจำนวน CD4 T cell จะลดลงอย่างมากหลังจากเริ่มมีการติดเชื้อ ซึ่งหลังการติดเชื้อความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ CD4 T cell จะลดลงและจะผลิต effector cytokines ที่ลดลง จะทำให้เกิดการบกพร่องในการทำงานของ T cell และ CD4 T cell ของโฮสต์ที่มีการติดเชื้อจะมีการแสดงออกของ inhibition receptor ซึ่งรวมถึง PD-1, 2B4, BTLA และ TRAIL โดยจะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการตอบสนองต่อการติดเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การแสดงออกของ inhibition receptor ยังมีศักยภาพที่จะส่งผลกระทบต่อความช่วยเหลือที่ได้รับจาก CD4 ต่อเซลล์อื่นๆ ซึ่งรวมถึง B cell และ T cell และให้ DC กระตุ้น naïve CD8 T cell นอกจากนี้ CD4 T cell ยังช่วย B cell ในการสร้างแอนติบอดี และช่วยส่งเสริม somatic hypermutation ทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีของ isotype ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการติดเชื้อ และยังสามารถแสดงความสามารถในการเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งมีบทบาทโดยตรงในการขจัดเชื้อโรคมมากขึ้น (20)

#### Innate lymphoid cells (ILC)

Innate lymphoid cells เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันในเนื้อเยื่อที่ได้มาจากต้นกำเนิดของต่อมน้ำเหลือง โดยเซลล์กลุ่มนี้จะขาด receptor เพื่อจดจำแอนติเจนที่จำเพาะ ดังนั้นการกระตุ้นจึงขึ้นอยู่กับ cytokines ที่มีอยู่ใน microenvironment โดย ILC มีความหลากหลายคล้ายกับ T lymphocytes ซึ่งสามารถแบ่งตามหน้าที่ที่คล้ายคลึงกันออกเป็น cytotoxic NK cells และ 3 กลุ่มย่อยของ ILC ได้แก่ ILC1, ILC2 และ ILC3 (5)

ILC1 ตอบสนองต่อเชื้อโรคในเซลล์เป็นแบบภูมิคุ้มกันชนิดที่ 1 มีการผลิต IFN- $\gamma$  และ TNF อย่างไรก็ตาม ILC1 ขาด perforin-dependent cytotoxicity แต่สามารถฆ่าเซลล์เป้าหมายผ่าน alternative pathway เช่น การเหนี่ยวนำ apoptosis โดยอาศัยตัวรับ TNF

ILC2 เป็นเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ซึ่งส่วนใหญ่พบในปอด ลำไส้ ผิวหนัง และ เนื้อเยื่อไขมัน มีหน้าที่ในการตอบสนองต่อปรสิต หนองพยาธิ และควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ตลอดจนรักษาสภาวะสมดุลของเนื้อเยื่อต่างๆ โดยการทำงานขึ้นอยู่กับการแสดงออกของ GATA-3 transcription factor และสามารถถูกกระตุ้นได้โดย cytokines ที่หลั่งออกมาจากเยื่อบุผิวหรือเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บ เช่น IL-25, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) และ IL-33 โดย ILC2 สามารถหลั่ง IL-4, IL-5, IL-9 และ IL-13 รวมทั้ง amphiregulin (AREG) เพื่อมาต่อสู้กับหนองพยาธิ (21)

ILC3s ประกอบด้วย retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) ที่แตกต่างกัน ทำหน้าที่หลั่ง IL-22 เพื่อเสริมเกราะกันเยื่อบุผิว สิ่งเหล่านี้รวมถึงเซลล์ตัวเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในครรภ์ ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง secondary lymphoid tissues ในระหว่างการพัฒนาของหนูที่โตเต็มวัยและผลิต IL-17 ซึ่งทำหน้าที่คล้าย Th17 คือตอบสนองต่อ Extracellular bacteria โดยมีตัวกระตุ้นคือ IL-1 และ IL-23 ที่หลั่งมาจาก macrophage (21)

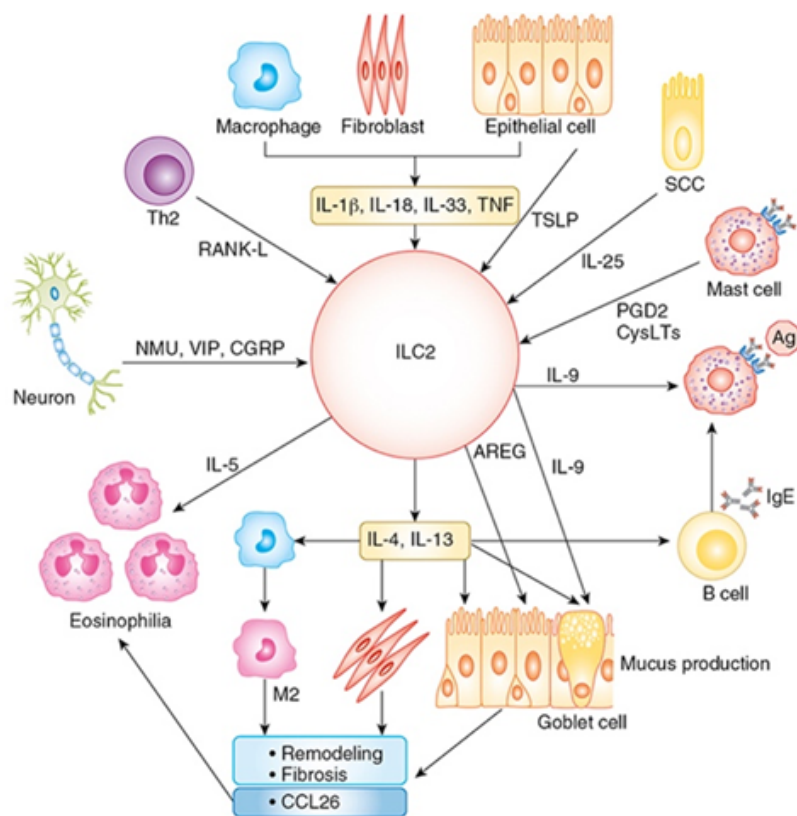
### Immune Response Against Helminths

**ILC2 ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อต้านปรสิตและหนองพยาธิผ่านการหลั่งของ type 2 immune response cytokines ได้แก่ IL-5, IL-9 และ IL-13 เมื่อถูกกระตุ้นโดย IL-33 หรือ IL-25 ดัง**

#### ภาพ 8

โดย IL-5 เป็นตัวหลักในการชักนำให้เกิด eosinophilia ซึ่งมีส่วนช่วยในการกำจัดปรสิต IL-4 และ IL-13 เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการตอบสนองของ IgE ใน B cells การผลิต mucus การสร้างเซลล์เยื่อบุผิว การกระตุ้น macrophage และการเปลี่ยนแปลงของ Th2 lymphocyte ในทางกลับกัน IL-13 ยังทำหน้าที่กระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบและการปรับเปลี่ยนเยื่อบุผิวเพื่อขับหนองพยาธิ IL-9 ที่ได้มาจาก ILC2 แสดงให้เห็นว่าจำเป็นสำหรับการกำจัดหนองพยาธิ กระตุ้นให้กล้ามเนื้อหดตัว goblet cell hyperplasia และ mast cell hyperproliferation ซึ่ง ILC2s ไม่เพียงแต่ผลิต type 2 cytokine เท่านั้นแต่ยังผลิต amphiregulin (AREG) ซึ่งควบคุมการเกิด fibrosis การซ่อมแซมการสร้าง

เนื้อเยื่อใหม่ ดังนั้นการสะสมและการกระตุ้นของ ILC2 จึงถือว่ามีสำคัญในการเกิด type 2 inflammatory disease (5, 21)



ภาพ 8 กลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อของ ILC2 (3)

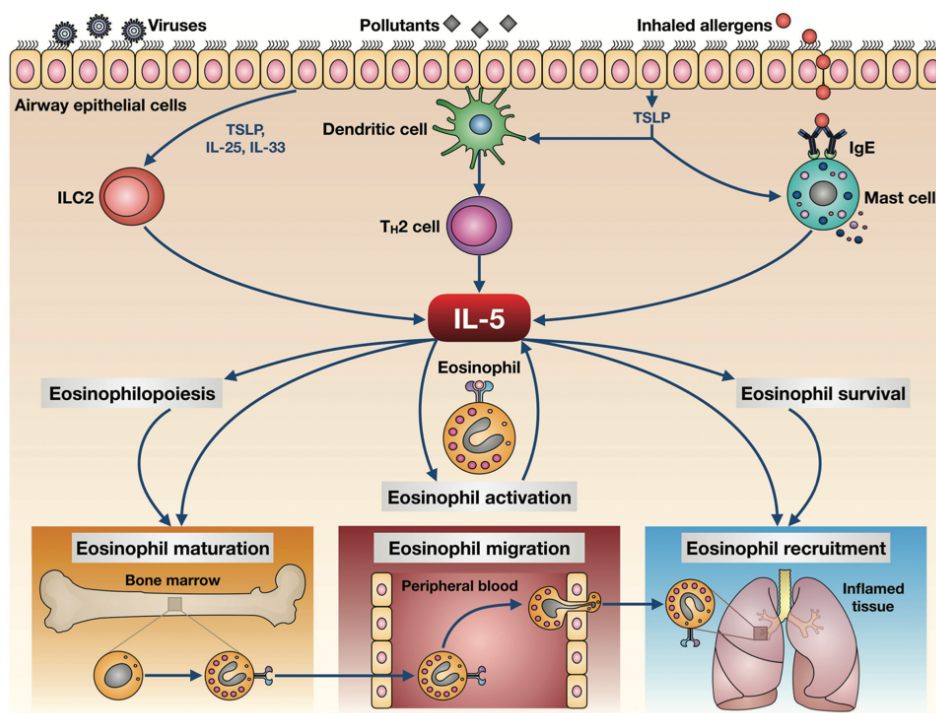
#### Interleukin-4 (IL-4)

IL4 หลั่งมาจากเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายตัว เช่น Th2 lymphocytes, basophil และ eosinophil ทำหน้าที่ต้านการอักเสบและกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาพบว่า IL-4 อาจยับยั้งการ फैาระวังของระบบภูมิคุ้มกันจากเซลล์มะเร็งและเพิ่มการแพร่กระจายของมะเร็ง โดย IL-4 สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งโดยตรงและเพิ่มการต่อต้าน apoptosis เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเร็ง (22)

### Interleukin-5 (IL-5)

สร้างมากที่สุดโดย Th2 cells เพื่อตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคหรือ microenvironment โดยในสภาวะเหล่านี้ IL-5 มักแสดงออกพร้อมกับ cytokines อื่นๆ เช่น IL-4 และ IL-13 ส่งผลให้มีการซึมผ่านหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น เพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ รวมถึงการผลิต IgE แหล่งสร้างรองลงมาคือ transformed epithelial cells เช่น มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้ใหญ่หรือมะเร็ง อีกทั้งยังสามารถสร้างได้จาก type 2 innate lymphoid cells โดยถูกกระตุ้นการสร้างจาก IL-25, IL-33 และ TSLP ซึ่งส่งผลทำให้เกิด eosinophilic inflammation ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเร็ง

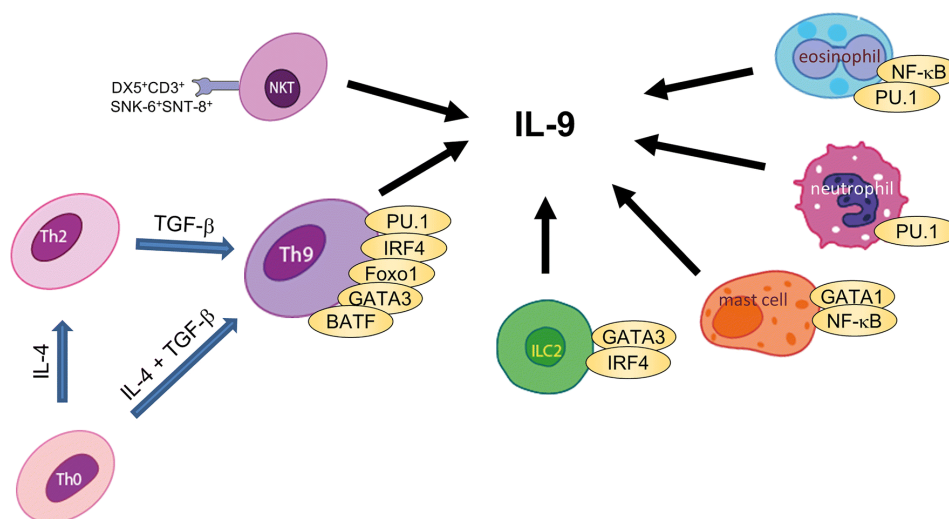
IL-5 ส่งผลหลายอย่างต่อ eosinophil ได้แก่ 1) ช่วยในการเจริญเติบโตโดยกระตุ้น hematopoietic stem cell ให้แบ่งตัวเป็น eosinophil 2) กระตุ้นการรอดชีวิต 3) การเคลื่อนที่ออกจากกระแสเลือดและการเคลื่อนที่ไปยังระบบทางเดินหายใจ จึงถือได้ว่า IL-5 เป็นศูนย์กลางการควบคุม cytokine สำหรับการผลิต eosinophil ดังภาพ 9 (23, 24)



ภาพ 9 กลไกของ IL-5 ต่อ eosinophil

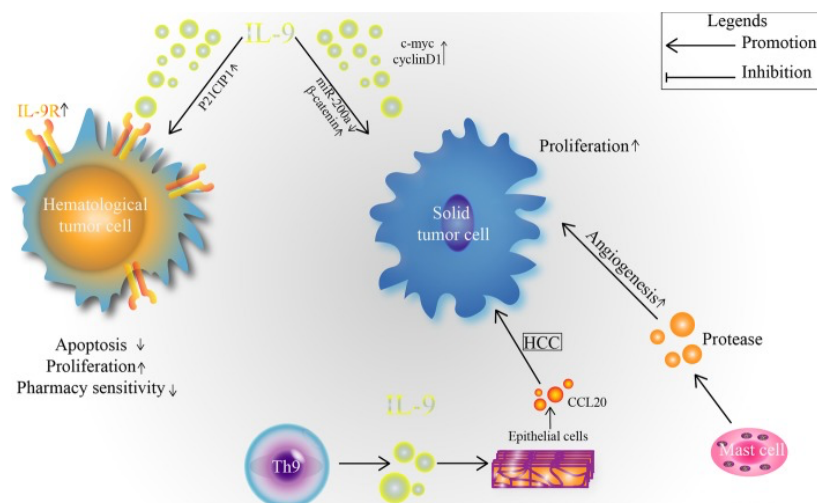
## Interleukin-9 (IL-9)

IL-9 ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งมาจาก Th9 cells, Th2 cells, Th17 cells และ regulatory T cells นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งได้จากระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด IL-9 โดยก่อนหน้านี้ถูกเรียกว่า growth factor P40 ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายกับ TCGFII (T cell growth factor III) หรือ MEA (mast cell growth enhancing activity) factor จากนั้นถูกเปลี่ยนมาเป็น IL-9 ยังพบอีกว่า mastocytosis mucosal mast cells สามารถสร้าง cytokine นี้ได้ และ IL-9 สามารถหลั่งได้จาก eosinophils, neutrophils, และ innate lymphoid cells เช่นเดียวกับ natural killer T cells (NKT) ที่สร้าง IL-9 ผ่านการกระตุ้นของ IL-2 อย่างไรก็ตาม IL-9 ที่หลั่งจากเซลล์ที่ต่างกันเซลล์เป้าหมายจะต่างกันด้วย ก่อนหน้านี้ถูกอธิบายว่าเป็น growth factor cytokine IL-9 สามารถกระตุ้นเซลล์ได้หลายชนิด รวมถึง mast cells, T cell clones และ B lymphocytes ดังแสดงในภาพ 10 (25) IL-9 ส่วนใหญ่ผลิตจาก ILC2 ในลักษณะของ autocrine หรือ paracrine ซึ่งมีผลกลับมากระตุ้น ILC2 แสดงให้เห็นว่า IL-9 มีความสำคัญต่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังการอักเสบของปอดหรือข้ออักเสบ (21) IL-9 มีบทบาทในการต้านมะเร็งและส่งเสริมมะเร็ง ดังภาพ 11



ภาพ 10 แหล่งสร้างและ transcription factor ของ IL-9





ภาพ 11 เซลล์ที่สร้าง IL-9 และบทบาทในมะเร็ง

### Antitumorigenic role of IL-9

IL-9 สามารถควบคุมภูมิคุ้มกันต้านมะเร็งโดยกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ adaptive หรือ innate immune ใน nude mouse และยังสามารถยับยั้งการเติบโตของมะเร็งกระเพาะอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญ พบว่าระดับของ IL-4, IL-10, VEGF และ TGF- $\beta$  ลดลงใน nude mouse ที่ได้รับการรักษาด้วย IL-9 นอกจากนี้ IL-9 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร SGC-7901 ในหลอดทดลอง และยังตอบสนองต่อการต้านมะเร็งที่รุนแรงในมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของ IL-9 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระยะ TNM การแพร่กระจายของต่อมน้ำเหลือง และมีการพยากรณ์โรคที่ดี นอกจากนี้การแสดงออกของ IL-9 มากสามารถยับยั้งการเติบโตของมะเร็งและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูที่มีมะเร็งได้ผิวหนัง ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ IL-9 อาจเกิดจากการควบคุมการทำงานของ T cell (26)

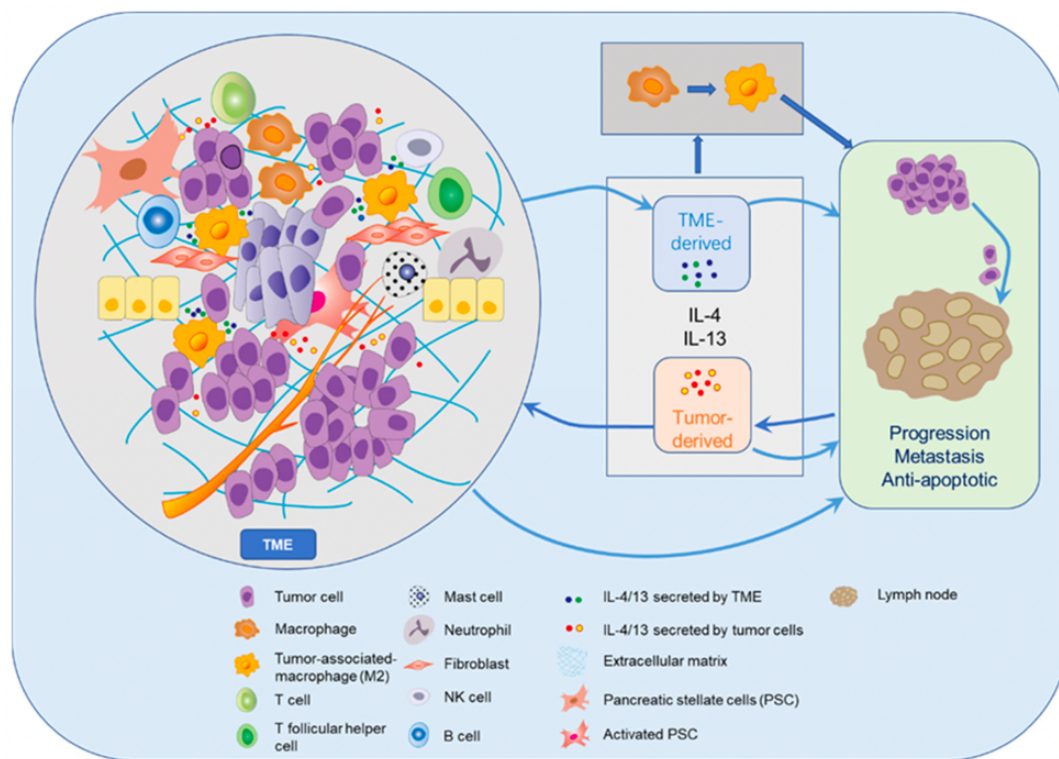
### Tumorigenic role of IL-9 in solid tumor

IL-9 มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยมีงานวิจัยพบว่าในมะเร็งตับอ่อน มีการกระตุ้นผ่าน miR-200a/ $\beta$ -catenin axis โดย  $\beta$ -catenin เป็นยีนส์เป้าหมายของ miR-200a และการแสดงออกที่มากเกินไปของ miR-200a ในมะเร็งตับอ่อนจะลดการแสดงออกของ  $\beta$ -catenin ซึ่ง IL-9 สามารถลดการเกิดนี้ได้ โดยการลดการแสดงออกของ miR-200a ทำให้ช่วยในการพัฒนาของมะเร็งตับอ่อน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นพบว่าการแสดงออกของ IL-9 ใน colitis-associated cancer (CAC) tissue มีค่าสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ เช่นเดียวกับในมะเร็งเต้านม ซึ่งจะช่วย

ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่บ่งชี้ว่า IL-9 สามารถส่งเสริมการทำงานของภูมิคุ้มกันของเซลล์ Treg cells และป้องกันเซลล์มะเร็งจากการโดนทำลายโดยเซลล์ภูมิคุ้มกัน (26)

### Interleukin-13 (IL-13)

IL-13 และ IL-4 เป็น cytokine ที่มีตัวรับที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกหลั่งมาจาก Th2 cell และถูกจัดว่าเป็น Th2 cytokine ที่มีหน้าที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ IL-13 ยังสามารถหลั่งได้จากเซลล์หลายชนิด เช่น epithelial cells, lymphocytes, eosinophils, basophils และ mast cells ทำหน้าที่ในการควบคุมภูมิคุ้มกัน ควบคุมการทำงานของ B-cell ในมนุษย์และ monocyte (macrophage) ในหนู IL-13 สามารถกระตุ้นเซลล์สาย monocyte และยับยั้งการผลิต cytokine ที่มีการอักเสบ (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, G-CSF และ IFN- $\alpha$ ) IL-13 ทำให้เกิดการเปลี่ยน isotype ของ IgG ใน B lymphocyte เป็น IgE ดังนั้นจึงมีบทบาทเกี่ยวกับภูมิแพ้และป้องกันจากการติดเชื้อหนองพยาธิ อีกทั้งการแสดงออกที่มากเกินไปของ IL-13 ยังช่วยในการเปลี่ยนแปลงของ macrophage จาก M1 ไปเป็น M2 ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการเติบโตของมะเร็ง ดังภาพ 12 (27, 28)



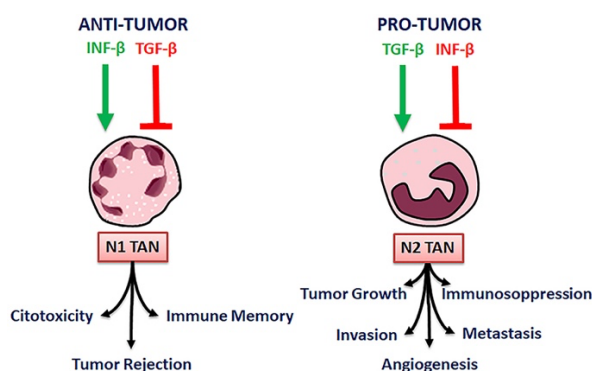
## ภาพ 12 การทำงานของ IL-13 ในมะเร็ง

### Neutrophil

neutrophil เป็น granulocyte ที่มีอายุสั้น ทำหน้าที่ป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่าน phagocytosis, degranulation, ผลิต reactive oxygen species (ROS), chemokines และ cytokines เพื่อเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน อีกทั้ง neutrophils ยังช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการต้านจุลชีพโดยการหลั่ง neutrophil extracellular traps (NETs) ซึ่งประกอบด้วย extracellular chromatin decorated with histones และ granular proteins จำนวนมาก และถูกระบุว่าเป็นส่วนหนึ่งของ innate immune response

การสร้าง NET เริ่มต้นด้วยการกระตุ้นนิวโทรฟิลผ่านการจดจำสิ่งเร้าและการกระตุ้น NADPH oxidase (NOX) ผ่านโปรตีน kinase C (PKC)-Raf/MERK/ERK ซึ่งจะกระตุ้น myeloperoxidase (MPO) neutrophil elastase (NE) และ protein-arginine deiminase type 4 (PAD4) หน้าที่ของ PAD4 คือเร่งปฏิกิริยา citrullinated histones และส่งเสริมการควบแน่นของโครมาติน ในขณะที่ ROS specie ส่งเสริม NETosis โดยทำให้เกิดการแยกตัวที่ละน้อยและการสูญเสียเยื่อหุ้มนิวเคลียสด้วยการปล่อยโครมาตินออกนอกเซลล์ผ่านรูพรุนของเมมเบรน การสลายตัวของเซลล์จะมีการปลดปล่อย DNA, citrullinated histones (citH3) และ granule อื่นๆภายในเซลล์ NETosis เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่ส่งเสริมการทำลายเชื้อโรคโดยการดักจับ (trapping) และการฆ่าโดยอาศัยความเป็นพิษของจุลินทรีย์หรือทำให้จุลินทรีย์เคลื่อนที่ไม่ได้ ซึ่งจะเพิ่มการทำลายโดย neutrophils และ phagocyte อื่นๆ (29) มีรายงานว่า NET สามารถสนับสนุนการพัฒนาของโรคระยะแพร่กระจาย และการป้องกันเซลล์มะเร็งจากเซลล์ภูมิคุ้มกันของโฮสต์

Tumor associated neutrophils (TANs) เกี่ยวข้องกับ tumor microenvironment by cytokines และ chemokines สามารถแบ่งตามการกระตุ้นและ cytokine status และผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้เป็น N1 และ N2 TAN ดังภาพ 13 โดย N1 TAN จะมีการหลั่ง TNF $\alpha$ , CCL3, ICAM-1 ที่สูงและมีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดย cytotoxicity แต่ N2 TAN จะมีลักษณะจำเพาะคือ chemokines ที่สูง (CCL2, CCL3, CCL4, CCL8, CCL12, and CCL17, and CXCL1, CXCL2, IL-8/ CXCL8 and CXCL16) โดยจะกระตุ้นการกดภูมิคุ้มกัน การเติบโตของมะเร็ง การสร้างเส้นเลือดใหม่ และ metastasis โดย DNA ที่ไม่เสถียร หรือโดยการปล่อย cytokines และ chemokines ในผู้ป่วยมะเร็ง TAN และอัตราส่วน neutrophil ต่อ lymphocyte (NLR) ที่สูงจะมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (30)



ภาพ 13 N1 และ N2 Tumor associated neutrophils (TANs)

## Eosinophil

eosinophil เป็นเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte ที่ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการต่อสู้กับปรสิตและก่อให้เกิดการแพ้ eosinophil ที่โตเต็มที่ที่จะแสดงตัวรับพื้นผิวที่หลากหลายซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ การยึดเกาะ การกระตุ้น การเคลื่อนที่ และการจัดจํารูปแบบ นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของ IL-5 receptor alpha subunit, CC-chemokine receptor (CCR3) หรือ CD125 และ eotaxin receptor โดย eosinophil สามารถแสดงลักษณะเฉพาะภายในเซลล์โดย granule จำเพาะที่มี Major basic protein (MBP), Eosinophil peroxidase, Eosinophil cationic protein (ECP) และ Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) โดย IL-5 ที่ผลิตจาก Th2 cell และ type 2 innate lymphoid cell จะมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวน การกระตุ้น และการอยู่รอดของ eosinophil โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-5 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ILC2 จะสามารถทำหน้าที่โดยตรงกับ eosinophil และพบว่าการเคลื่อนย้ายของ eosinophil จะได้รับการส่งเสริมจาก eotaxins ซึ่งเป็นกลุ่มของ chemokine ที่สามารถรับ eosinophil ร่วมกับ IL-5 โดยผลของ eotaxins จะขึ้นอยู่กับ การจับกับ CCR3 ที่แสดงออกบน eosinophil นอกจากนี้ eosinophil ยังสามารถนำเสนอแอนติเจนส่งผลให้เกิดการกระตุ้น T-cell โดยผ่าน MHC class II

eosinophilia เป็นหนึ่งในลักษณะเด่นของการติดเชื้อพยาธิ ในช่วงเริ่มต้นของการติดเชื้อและมีการบุกรุกหรือมีความเสียหายของเนื้อเยื่อ โดยปรสิตที่แพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อจนเกิดความเสียหายทางกายภาพที่นำไปสู่การปล่อย host-derived alarmins รวมถึง IL-33, IL-25 และ TSLP ซึ่งมีแนวโน้มว่ามีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นการตอบสนองต่อการอักเสบเมื่อเกิดการติดเชื้อแล้ว eosinophil มักจะสะสมใกล้กับปรสิตและพยาธิหรือบริเวณที่เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อที่เกิดจากปรสิต ในขณะที่ CCL11 (eotaxin-1) และ receptor (CCR3) จะมีความสำคัญในกระบวนการนี้

เมื่อมีการกระตุ้น eosinophil จะมีการหลั่งโปรตีน granule จำเพาะ, cytokine, chemokine, leukotrienes, Charcot Leyden crystals และ reactive oxygen ซึ่งจะนำไปสู่การฆ่าปรสิตและการปรับตัวทางภูมิคุ้มกัน (31, 32)

### Basophil

basophil มีความสัมพันธ์กับขนาดและขอบเขตของมะเร็งรวมถึงจำนวนต่อมน้ำเหลืองที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งและหลอดเลือดดำ การพร่องของ T cell มีความสัมพันธ์กับการแทรกซึมของ basophil ควบคู่ไปกับ CD8<sup>+</sup> T cell ในรอยโรคของมะเร็ง และ basophil ที่หลั่ง CCL3 และ CCL4 เพื่อเรียก CD8<sup>+</sup> T cell ใน TME สารเชิงซ้อนของแอนติบอดี IL-3 และ anti-IL-3 กระตุ้น basophilia และการแทรกซึมของ T cell ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ Tumor rejection และยังพบว่า basophils ใน TME อาจส่งสัญญาณ pro-tumorigenic ที่แตกต่างกัน ผ่านการปลดปล่อย Th2 immune mediators เช่น CD40L, IL-4, IL-6, IL-13, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A/B, B cell activating factor (BAFF) และ histamine อย่างไรก็ตาม basophils อาจมีคุณสมบัติต่อต้านมะเร็งผ่านการปล่อย proinflammatory mediators, TNF- $\alpha$  และ tryptase

basophils ที่แสดง Fc $\epsilon$ RI มีส่วนเกี่ยวข้องในการ infiltrate และการสะสมของ IgE ในผิวหนัง ทำให้เกิดความเสียหายของ DNA และเยื่อบุผิว มีรายงานว่า basophil infiltration ควบคู่ไปกับ class switching และการผลิต IgE ภายในร่างกาย สามารถป้องกันจากการเกิดมะเร็งเยื่อบุผิวได้

basophils ที่ถูกกระตุ้นโดย IgE โดยเซลล์มะเร็งที่แสดงแอนติเจนของมะเร็ง สามารถผลิต IL-4 และปรับเปลี่ยน CD40L สิ่งเหล่านี้ถือเป็นสัญญาณพื้นฐานที่มีอิทธิพลต่อการส่งสัญญาณและการกระตุ้นเซลล์ B และเพื่อส่งเสริม class switching และการสร้าง IgE ของ B cell (33)

### Amphiregulin

amphiregulin (AREG) เป็น transmembrane protein ซึ่งช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง การยับยั้ง ADAM17 ด้วยสารยับยั้ง protease สามารถป้องกันการหลั่ง AREG และรบกวนการกระตุ้น EGFR ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณ Tyrosine kinase ที่เกิดการ mutation หรือเกิดความผิดปกติที่พบได้ในมะเร็งหลายชนิด

AREG ถูกควบคุมการ transcription โดย estrogen ในระหว่างการพัฒนาของต่อมน้ำนมปกติ และในมะเร็งเต้านม ระดับการแสดงออกของ AREG สูงมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ estrogen

receptor-alpha ในมะเร็งเต้านม และเมื่อมีการแสดงออกที่มากเกินไป จะส่งเสริมการส่งสัญญาณ EGF (34)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ยังพบว่า AREG ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ T cell ไปเป็น Treg ภายใน tumor microenvironment แสดงให้เห็นว่า AREG ใน microenvironment ส่งผลกระทบต่อมะเร็ง และสามารถยับยั้งการแพร่กระจายและการกดภูมิของมะเร็งได้ (35)

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

melatonin เป็นสารที่พบได้ปกติในร่างกาย สร้างได้จาก 2 แหล่ง คือ pineal gland และ enterochromaffin cell (EC cell) ในลำไส้ ซึ่งเป็นสารอนุผลิตอิสระที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ การสร้างหลอดเลือดใหม่ การพัฒนาและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยกระตุ้นการ apoptosis พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งปากจะมีปริมาณของ melatonin ที่สูงกว่าคนปกติ ส่วนในโรคลำไส้อักเสบจะมีปริมาณต่ำ ได้มีการนำ melatonin มาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดต่างๆ เช่น ใช้ในการรักษาโรคลำไส้อักเสบจาก Oxazolone พบว่าเมลาโทนิสามารถยับยั้งการอักเสบของลำไส้ได้โดยการยับยั้งการหลั่ง type II cytokine ของ ILC2 และ Th2 cell ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบ (2, 36-39)

ในผู้ป่วยมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมะเร็งตับจะมีการพบ ILC2 ที่มากกว่าปกติ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ ILC2 จะช่วยในการพัฒนาและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (2, 40, 41)

จากการศึกษา ILC2 ที่อยู่ในภาวะที่ขาดออกซิเจนเช่นในมะเร็งตับอ่อน พบว่าจะมีการเปลี่ยนเป็น IL10<sup>+</sup> regulatory phenotype (ILCregs) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งตับอ่อน และการใช้ยาเคมีบำบัดสามารถลดการแพร่กระจายของมะเร็งได้ (42)

จากการศึกษา ILCs ด้วยวิธีการทำ RNA sequencing แต่ละเซลล์ พบว่าสามารถแบ่งตามคุณสมบัติที่คล้ายกันได้เป็น 7 กลุ่มย่อย ได้แก่ ILC1a, ILC1b, ILC1c, ILC1d, ILC2a, ILC2b และ ILC3 พบว่าเซลล์ ICOS<sup>+</sup>ILC2a มีสัดส่วนที่สูงในมะเร็งตับซึ่งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ทางด้านกลไก พบว่า B cell โดยเฉพาะ naïve B cell มีความเกี่ยวข้องกับการ differentiation ของเซลล์ ILC2 ซึ่งการส่งสัญญาณของ B cell ผ่าน ICOSL ทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงขึ้นโดยมีการแสดงออกของ IL13 ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ ICOS<sup>+</sup>ILC2a นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70), Heat Shock Protein Family A Member 1A (HSPA1A) และ Heat Shock Protein Family A Member 1B (HSPA1B) มีการแสดงออกใน ILC2s สูงขึ้นในระยะท้ายของมะเร็งตับ และการรักษาที่มุ่งเป้าที่ ICOS และ

HSP70 ใน ILC2s สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งและปรับสภาพแวดล้อมของมะเร็งที่กดภูมิคุ้มกันได้ (43)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

วิจัยประเภทการวิจัยพื้นฐานเชิงทดลอง

#### 3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. สมชาย ปิ่นละออ สังกัด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

#### 3.3 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

เลือกหนูสายพันธุ์ Syrian golden hamster เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 150 กรัม จำนวน 80 ตัว ทำให้ติดพยาธิ *Opisthorchis viverrini* โดยการให้ตัวอ่อนระยะ metacercaria จำนวนตัวละ 50 เม็ด ทำการเลี้ยงหนูแฮมสเตอร์เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นให้สารก่อมะเร็ง NDMA ความเข้มข้น 12.5 ppm โดยให้หนูกินแทนน้ำปกติ เป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว คือ 1) OV-induced CCA เป็นกลุ่มควบคุม (control) 2) OV-induced CCA ได้รับ melatonin 50 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ 3) OV-induced CCA ได้รับ gemcitabine 25 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ 4) OV-induced CCA ได้รับ melatonin 50 mg/kg และ gemcitabine 25 mg/kg 3 ครั้งต่อสัปดาห์ โดยเลี้ยงหนูแฮมสเตอร์ทั้ง 4 กลุ่มเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นทำการการุณฆาตและเก็บชิ้นเนื้อตับแช่ใน 10% formalin เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างในการทำ Immunohistochemistry จะเลือกชิ้นเนื้อตับหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกรักษาสภาพด้วย formalin และถูกฝังใน paraffin จำนวน 5 ตัวอย่างต่อกลุ่ม โดยพิจารณาจากพยาธิสภาพบนสไลด์ H&E staining เลือกตัวอย่างที่มีภาพพยาธิร่วมกับมี lymphocyte infiltrate และ fibrosis ที่ชัดเจน

#### 3.4 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.4.1 Immunohistochemistry

##### 3.4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Glass bottle
2. Beaker
3. Staining rack
4. Staining jar



5. Moist chamber
6. Forceps
7. Auto pipette
8. Pipette tip
9. Aluminum foil
10. Coverslip
11. Fume hood
12. Autoclave
13. Rotator
14. Vortex
15. Microcentrifuge tube
16. Light microscope

#### 3.4.1.2 สารเคมี

1. Xylene
2. Absolute alcohol
3. 95% alcohol
4. 70% alcohol
5. Phosphate buffer saline (PBS)
6. Phosphate buffer saline – Tween 20 (PBST)
7. Citrate buffer solution
8. Tween 20
9. Fetal bovine serum
10. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
11. mouse anti-CD4
12. rabbit anti-IL5
13. rabbit anti-IL13
14. Anti-mouse IgG -HRP
15. Anti-rabbit IgG-HRP

16. 3, 3'-diaminobenzidine (DAB)

17. Hematoxylin

18. Permount™

### 3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

3.5.1 ศักยภาพการเปลี่ยนแปลงของจำนวน IL-5, IL-13 และ CD4 โดยวิธี Immunohistochemistry มีขั้นตอนดังนี้

#### 3.5.1.1 ขั้นตอนการนำ paraffin ออกจากชิ้นเนื้อ

นำชิ้นเนื้อดับของหนูทดลองที่ถูกตรึงสภาพด้วย formalin ซึ่ง embed ใน paraffin มาทำการกำจัด paraffin ออกก่อนด้วยการแช่สไลด์ใน Xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

#### 3.5.1.2 ขั้นตอนการ rehydration

ใช้ absolute ethanol (EtOH) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที, 95% EtOH 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตามด้วย 70% EtOH 1 ครั้ง 5 นาที และแช่ใน PBS 1 ครั้ง 5 นาที

#### 3.5.1.3 ขั้นตอนการซ่อมแซมแอนติเจน

ทำการซ่อมแซมแอนติเจนที่เสียไป (retrieve antigen) เพื่อให้แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนบนชิ้นเนื้อได้ดีขึ้น โดยทำการนึ่งแบบ steaming 30 นาที ใน citrate buffer จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ล้างชิ้นเนื้อที่ตั้งทิ้งไว้ด้วย PBST 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที

#### 3.5.1.4 ขั้นตอนการ block endogenous peroxidase

Endogenous peroxidase enzyme เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง และเซลล์ตับ ทำให้เกิดการติดสีแบบไม่จำเพาะ ซึ่งสามารถทำให้เกิดผลบวกผิดพลาดหรือ background staining ได้ กำจัดได้โดยใช้ 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วย PBST 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

#### 3.5.1.5 ขั้นตอนการ block nonspecific binding

การจับกันอย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยา hydrophobic bonding ระหว่าง Immunoglobulin กับ tissue proteins ทำให้ primary antibody และบางส่วนของ secondary antibody จับกับเนื้อเยื่อโดยตรงซึ่งไม่ใช่แอนติเจนเป้าหมาย แก้ไขด้วยการเติม 5% fetal bovine serum ใน PBS เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

### 3.5.1.6 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

วางสไลด์ใน moist chamber เติม primary antibody ที่เจือจางดังนี้ rabbit anti-IL5 และ rabbit anti-IL13 1:200 และ mouse anti-CD4 1:50 ลงบนชิ้นเนื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างด้วย PBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติม secondary antibody ได้แก่ Anti-mouse IgG-HRP ที่เจือจาง 1:25 ซึ่งใช้กับการศึกษาเซลล์ CD4+ และ Anti-rabbit IgG-HRP ที่เจือจาง 1:2000 ซึ่งใช้กับการศึกษาเซลล์ IL-5 และ IL-13 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วย PBST 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที และ PBS 1 ครั้ง 5 นาที

### 3.5.1.7 ขั้นตอนการ Visualization

เป็นการทำให้มองเห็นบริเวณเซลล์ที่สนใจศึกษา โดยการเติม DAB เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอยู่ในรูปละลายน้ำได้ เป็น substrate ให้เอนไซม์ HRP ที่ติดอยู่บน secondary antibody ทำการย่อยและเปลี่ยนไปอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำทำให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปไหลผ่านน้ำประปา 3 นาที

### 3.5.1.8 ขั้นตอนการ Counterstain

เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสีจากปฏิกิริยาการย้อม เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี counterstain ทำให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อชัดเจน เพื่อให้เกิดความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์โดยจุ่มสไลด์ลงใน Hematoxylin เวลา 20 วินาที จากนั้นนำไปไหลผ่านน้ำประปา 1 นาที

### 3.5.1.9 ขั้นตอนการ Dehydrate

แช่สไลด์ใน 70% EtOH 1 ครั้ง 5 นาที, 95% EtOH 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที, absolute EtOH 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที, และ xylene 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นทำการ mounting slide ด้วยน้ำยา Permount™ และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์โดยดูบริเวณที่มีการอักเสบรอบท่อน้ำดีที่มีตัวพยาธิปรากฏ และขึ้นเนื้อตับ หากสามารถนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกได้ จะทำการนับจากเม็ดเลือดขาวจำนวน 500 เซลล์ที่กำลังขยาย 400 เท่าโดยจะให้หีสิตนับทั้ง 3 คน

### 3.5.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ Eosinophil, Basophil และ Neutrophil จากการนับแยกชนิดเซลล์จากชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อมสี H&E มีขั้นตอนดังนี้

นับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil, basophil และ eosinophil บริเวณรอบท่อน้ำดีที่มีการอักเสบและพบพยาธิ โดยนับแยกชนิดจากเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 500 เซลล์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่าโดยนับสไลด์ทั้ง 3 คน

### 3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

#### การเก็บรวบรวมข้อมูลของวิธี Immunohistochemistry

เก็บข้อมูลจากการนับจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ IL-5, IL-13 และ CD4 ในเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 500 เซลล์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสไลด์ทั้ง 3 คน

ค่าที่นับได้จะถูกนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (CV) ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 10% จากนั้นนำค่าที่นับสไลด์ทั้ง 3 คนนับได้มาเฉลี่ยแล้วทำการคำนวณทางสถิติต่อไป

#### การเก็บรวบรวมข้อมูลของวิธี H&E staining

เก็บข้อมูลจากการนับจำนวนเซลล์ Neutrophil, Eosinophil, Basophil ในเม็ดเลือดขาว นวน 500 เซลล์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยนับสไลด์ทั้ง 3 คน

ค่าที่นับได้จะถูกนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (CV) ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 10% จากนั้นนำค่าที่นับสไลด์ทั้ง 3 คนนับได้มาเฉลี่ยแล้วทำการคำนวณทางสถิติต่อไป

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แล้วนำเสนอผลด้วยกราฟที่สร้างจากโปรแกรม Graphpad Prism

วิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของ marker ที่สนใจศึกษาโดยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลว่ามีการกระจายปกติหรือไม่โดยสถิติ Shapiro-Wilk test หากมีการกระจายปกติจะรายงานค่ากลางเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างโดยสถิติ one-way ANOVA หากพบว่ามีความแตกต่างกันจึงทำการทดสอบความแตกต่างเป็นรายคู่โดยใช้สถิติ Post hoc analysis แต่หากข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติจะรายงานค่ากลางเป็นค่ามัธยฐานและค่าพิสัย และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างโดยสถิติ Kruskal Wallis Test หากพบว่ามีความแตกต่างกันจะไม่สามารถหาความแตกต่างรายคู่ได้

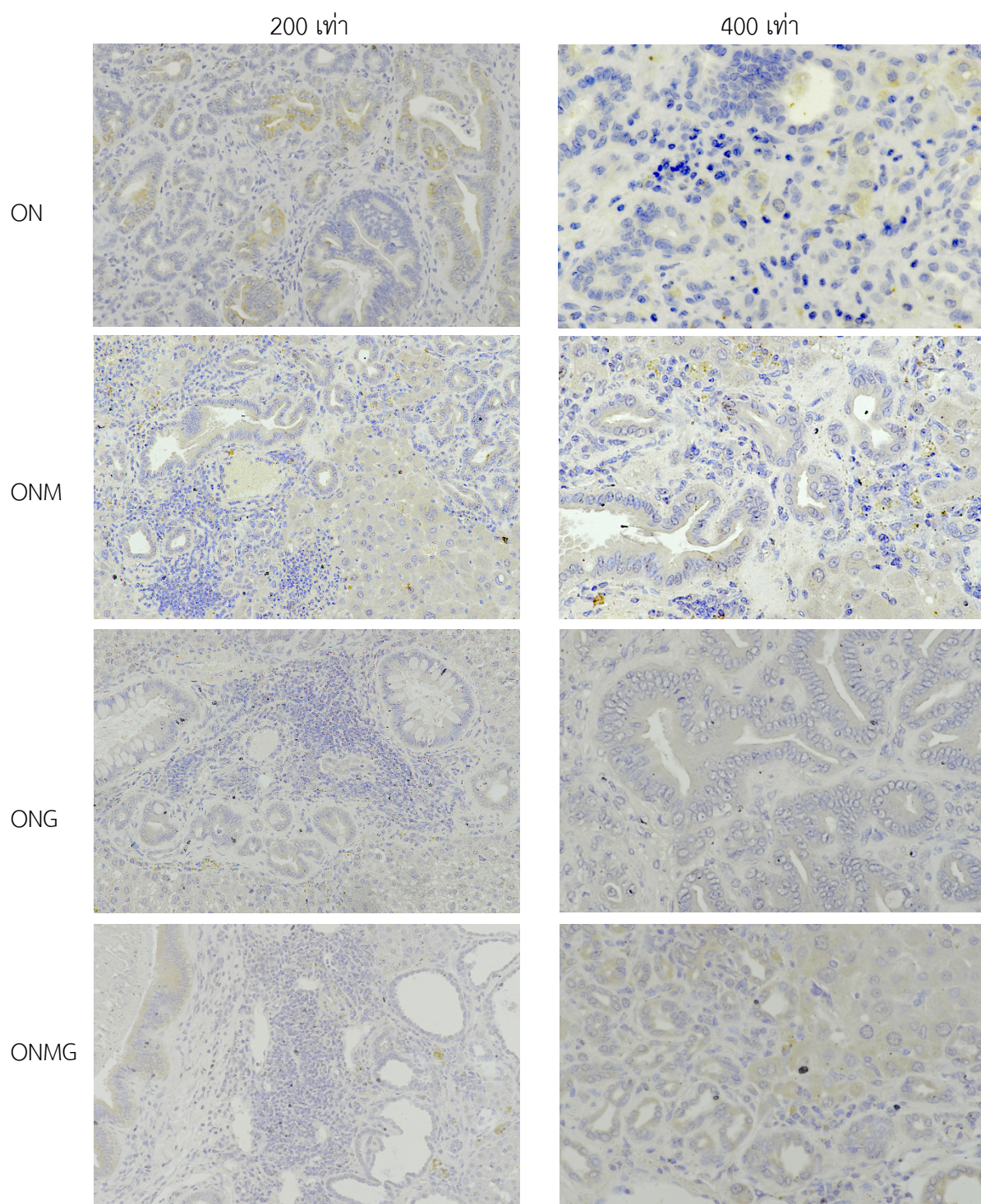
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

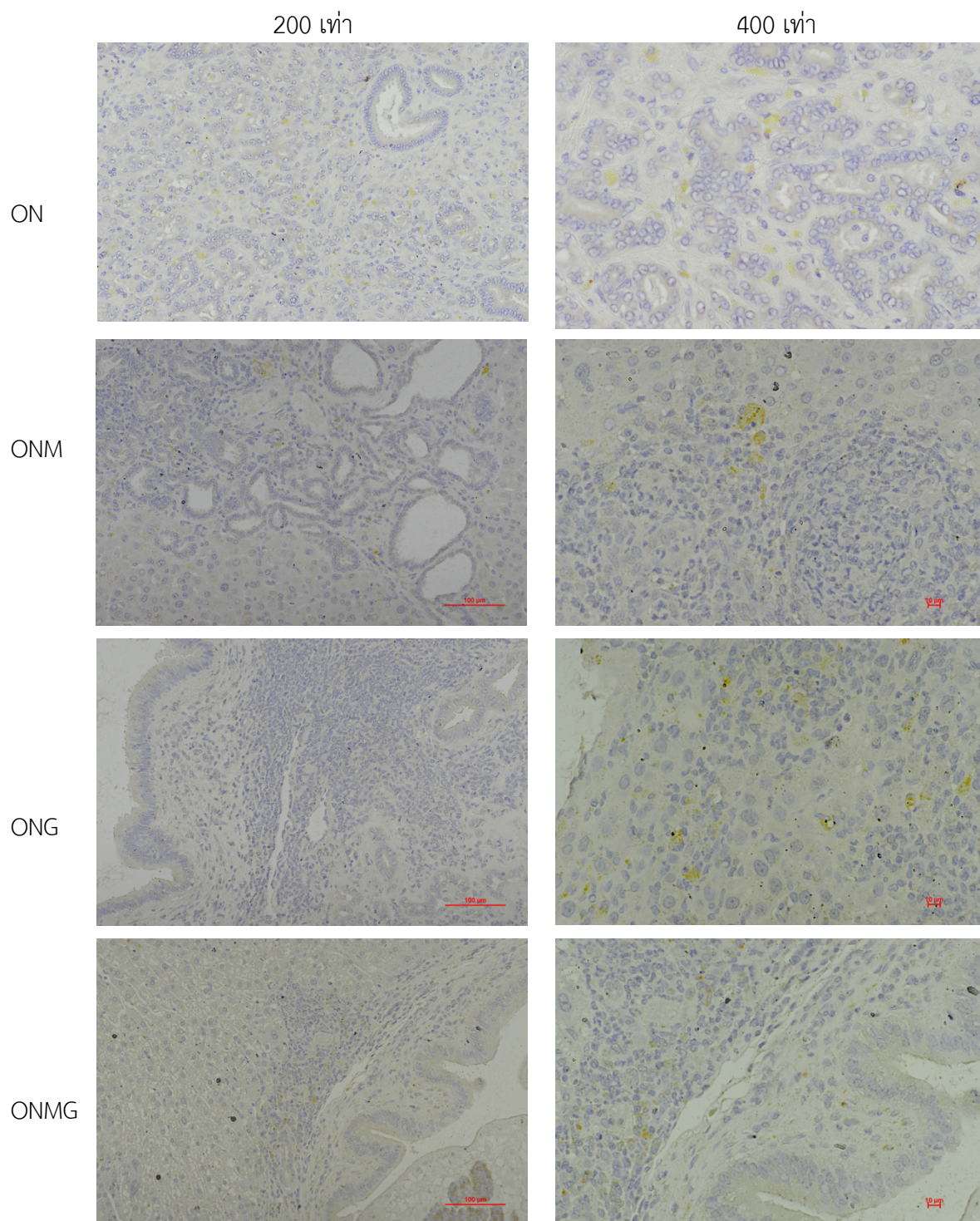
#### 4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunohistochemistry

การศึกษาจำนวน ILC2 โดยดูจำนวนเซลล์ IL-5<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup> และ CD4<sup>+</sup> ในชิ้นเนื้อตับของหนูกลุ่ม ON, ONM, ONG, และ ONMG ที่ได้จากวิธี IHC โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ marker ดังกล่าวจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลดังภาพ 14 และ 15 คณะผู้วิจัยได้ทำการนับจำนวนเซลล์แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยแสดงดังตาราง 1 และภาพ 16 จากนั้นนำค่ากลางของจำนวนเซลล์มาเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่ม พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) แต่ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบรายกลุ่มได้เนื่องจากพบค่าการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติ

สำหรับ CD4 นั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการหา condition ที่เหมาะสม โดยทำการเลือกทำที่ anti-CD4 เจือจาง 1:50 และ 1:100 ส่วน secondary antibody เจือจาง 1:25 และ 1:50 มาทำการย้อมในชิ้นเนื้อตับและใช้เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC เพื่อเป็น positive control พบว่าไม่มีการติดสี DAB อาจเกิดจากยังไม่ได้สภาวะที่เหมาะสม หรืออาจต้องการวิธีการซ่อมแซมแอนติเจนที่แตกต่างออกไป เช่นการใช้ enzyme (Proteinase K, Trypsin และ Pepsin) หรือการใช้ความร้อน (Citrate buffer, EDTA buffer และ Tris-EDTA buffer) จึงไม่ได้ทำการย้อมในตัวอย่างทั้งหมด



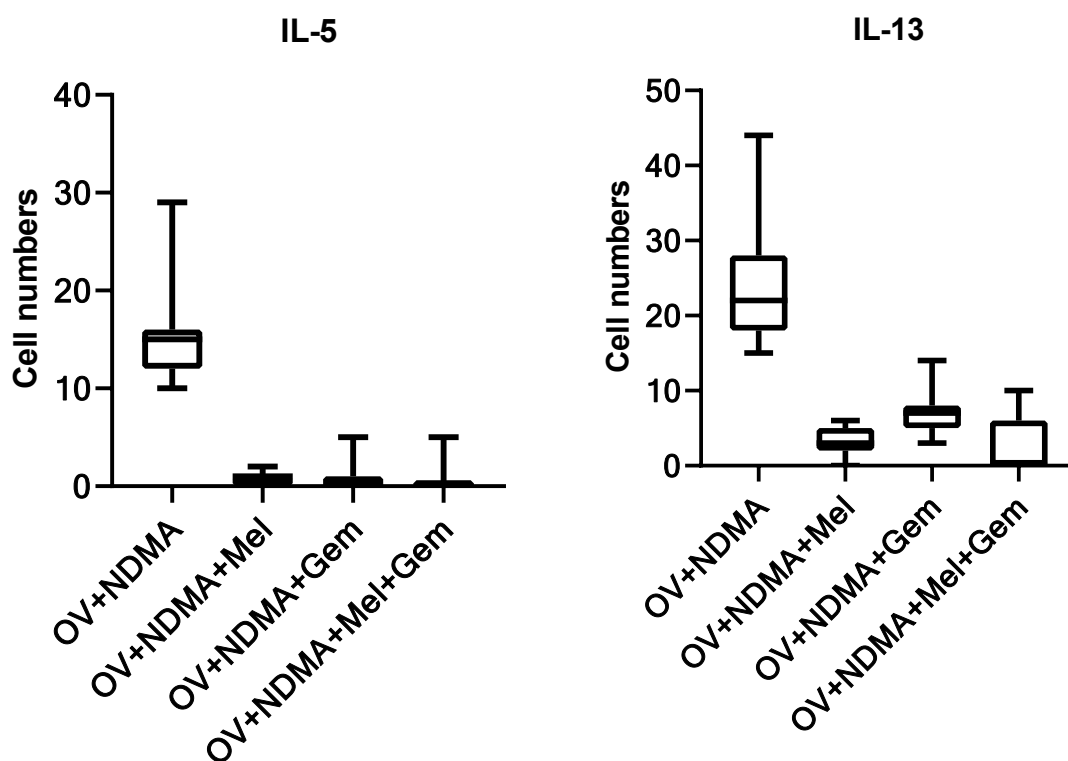
ภาพ 14 การแสดงออกของ IL-5 ในชั้นเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยวิธี IHC



ภาพ 15 การแสดงออกของ IL-13 ในชั้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยวิธี IHC

ตาราง 1 แสดงค่ากลางของจำนวนเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 โดยวิธี IHC

Group	Median ในเม็ดเลือดขาว 500 เซลล์ (range)	
	IL-5 <sup>+</sup> cell	IL-13 <sup>+</sup> cell
ON	15.00 (10-29)	22.00 (15-43)
ONM	1.00 (0-2)	3.00 (2-6)
ONG	0.00 (0-5)	7.00 (3-14)
ONMG	0.00 (0-5)	0.00 (0-10)

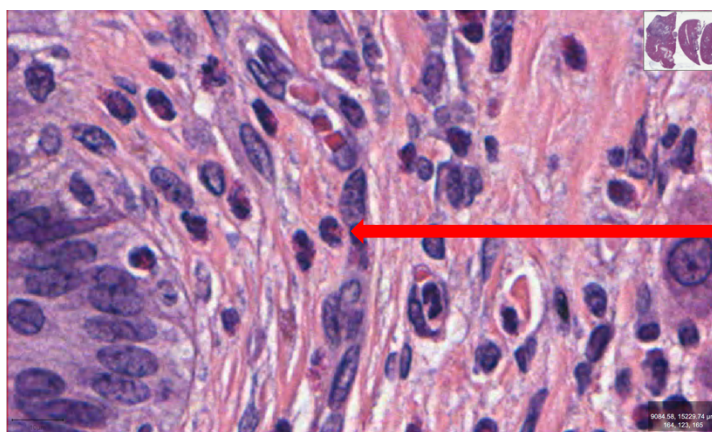


ภาพ 16 กราฟแสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ในชิ้นเนื้อตับหนู ด้วยวิธี IHC



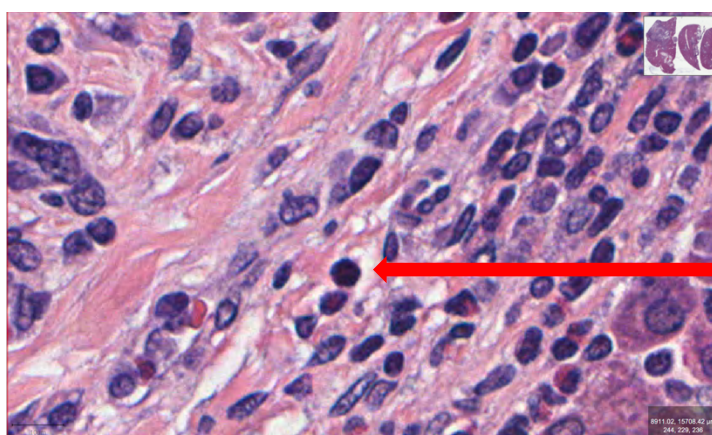
#### 4.2 ผลการวิเคราะห์จากสไลด์ที่ย้อม H&E

การศึกษาจำนวนเซลล์ eosinophil, basophil และ neutrophil ในชั้นเนื้อตับของหนูในกลุ่ม ON, ONM, ONG, และ ONMG ที่ได้จากสไลด์ที่ย้อม H&E โดยในเซลล์ eosinophil จะมีแกรนูโลสีแดงขนาดเล็ก basophil จะมีแกรนูโลน้ำเงินขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วเซลล์ ส่วน neutrophil จะมีแกรนูโลสีชมพูขนาดเล็ก ดังภาพ 17 โดยในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการนับจำนวนของ eosinophil, basophil และ neutrophil ในเม็ดเลือดขาว 500 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำจำนวนเซลล์เฉลี่ยมาเปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่ม



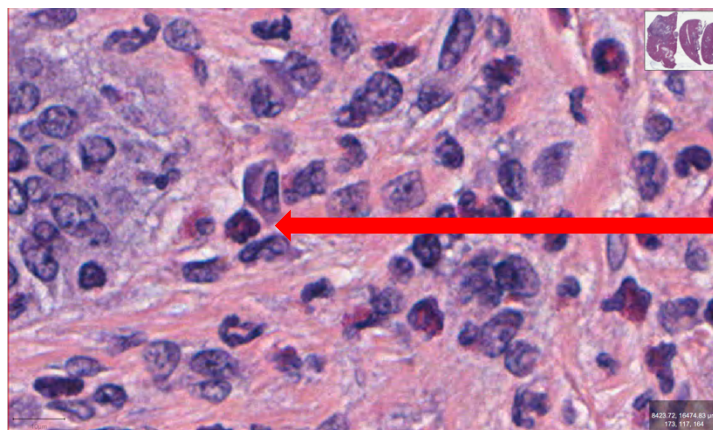
(A)

Eosinophil



(B)

Basophil



Neutrophil

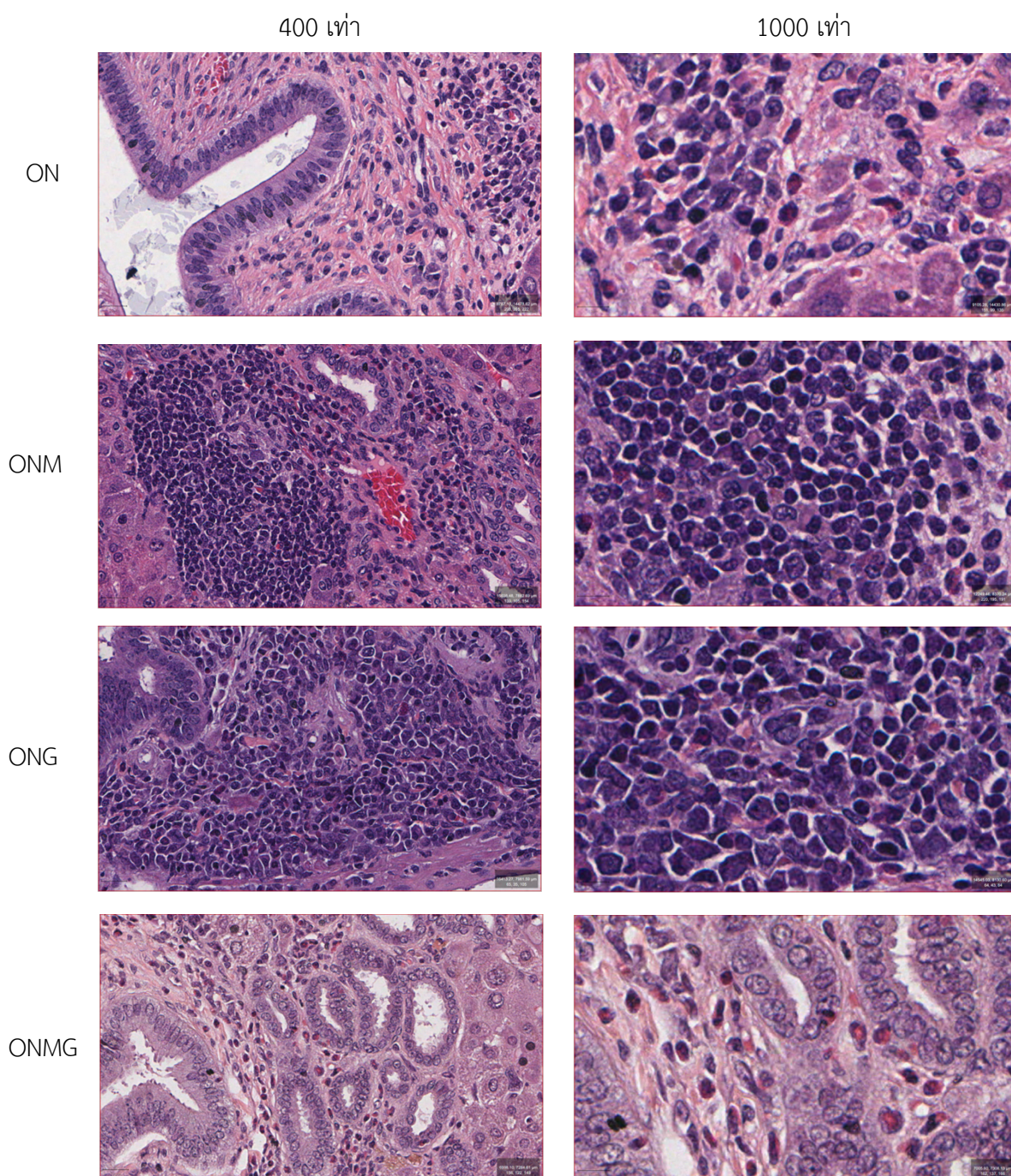
(C)

ภาพ 17 (A) Eosinophil (B) Basophil และ (C) Neutrophil ในชั้นเนื้อตับหนูในกลุ่ม ON ที่ย้อมด้วยสี H&E

พบว่าจำนวน eosinophil มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) โดยพบว่ากลุ่ม ON มีจำนวนมากกว่าอีก 3 กลุ่ม และพบจำนวน eosinophil ในกลุ่ม ONM มากกว่า ONMG แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ONM กับ ONG, และ ONG กับ ONMG ด้วยค่า p value ดังแสดงในตาราง 2 และภาพ 18-19

จำนวน basophil มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) โดยพบจำนวนสูงสุดในกลุ่ม ONG ซึ่งมีจำนวนมากกว่ากลุ่ม ON, ONM และ ONMG อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยค่า p value ดังแสดงในตาราง 3 และภาพ 20

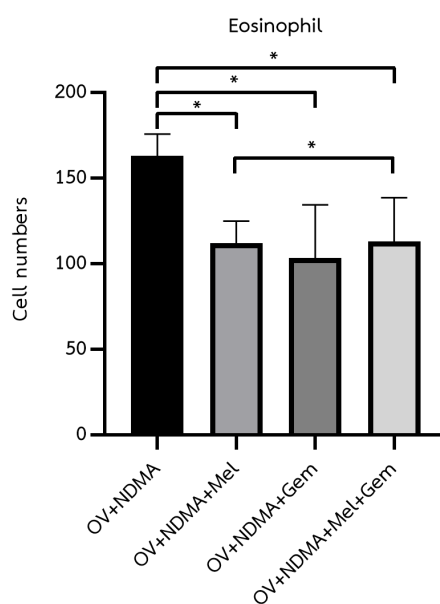
จำนวน neutrophil มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) โดยพบจำนวนสูงสุดในกลุ่ม ONG ซึ่งมีจำนวนมากกว่ากลุ่ม ON, และ ONM อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยค่า p value ดังแสดงในตาราง 4 และภาพ 21



ภาพ 18 เซลล์ Eosinophil, Basophil และ Neutrophil ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E

ตาราง 2 จำนวน Eosinophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E

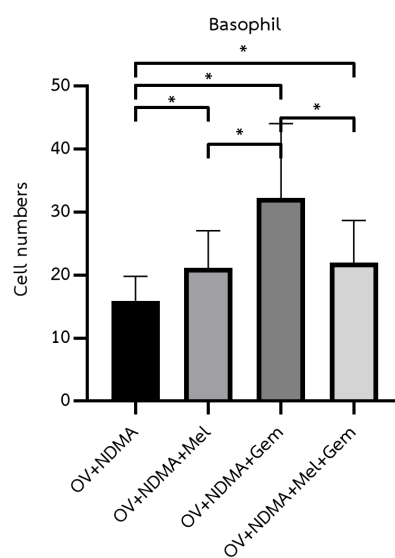
Sample group	Eosinophil	
	จำนวนเซลล์เฉลี่ยใน 500 เซลล์	ร้อยละ
ON	163.07	32.61
ONM	113.60	22.72
ONG	103.67	20.73
ONMG	100.47	20.09
P value		
Amongst 4 group	<0.001	
ON vs ONM	<0.001	
ON vs ONG	<0.001	
ON vs ONMG	<0.001	
ONM vs ONG	0.732	
ONM vs ONMG	0.026	
ONG vs ONMG	0.999	



ภาพ 19 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Eosinophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อตับที่ย้อมด้วยสี H&E

ตาราง 3 จำนวน Basophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี H&E

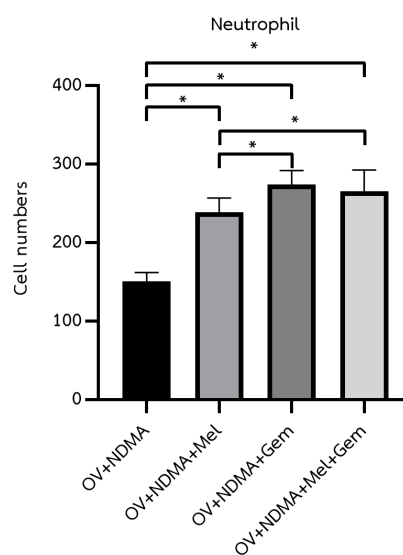
Sample group	Basophil	
	จำนวนเซลล์เฉลี่ยใน 500 เซลล์	ร้อยละ
ON	15.93	3.186
ONM	21.20	4.24
ONG	32.27	6.45
ONMG	22.00	4.4
P value		
Amongst 4 group	<0.001	
ON vs ONM	0.046	
ON vs ONG	0.001	
ON vs ONMG	0.035	
ONM vs ONG	0.023	
ONM vs ONMG	1.000	
ONG vs ONMG	0.045	



ภาพ 20 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Basophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี H&E

ตาราง 4 จำนวน Neutrophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี H&E

Sample group	Neutrophil	
	จำนวนเซลล์เฉลี่ยใน 500 เซลล์	ร้อยละ
ON	150.93	30.19
ONM	238.73	47.75
ONG	274.00	54.80
ONMG	265.73	53.15
P value		
Amongst 4 group	<0.001	
ON vs ONM	<0.001	
ON vs ONG	<0.001	
ON vs ONMG	<0.001	
ONM vs ONG	<0.001	
ONM vs ONMG	0.023	
ONG vs ONMG	0.914	



ภาพ 21 กราฟเปรียบเทียบจำนวน Neutrophil ในหนูแต่ละกลุ่ม ในชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี H&E

## บทที่ 5

### อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาจำนวนเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL-5, IL-13 รวมถึงจำนวนเซลล์ eosinophil, basophil และ neutrophil ในชั้นเนื้อตัวของหนูแฮมสเตอร์กลุ่ม ON, ONM, ONG, และ ONMG แต่เนื่องจากผู้วิจัยยังไม่พบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการย้อม CD4 marker ทำให้ไม่สามารถแยกว่าเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL5, และ IL13 เป็น Th2 cell (CD4<sup>+</sup>) หรือ ILC2 cell (CD4<sup>-</sup>) ดังนั้นจึงรายงานผลเป็น IL5<sup>+</sup> cell และ IL13<sup>+</sup> cell

IL-5 มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคหรือ microenvironment โดยมักแสดงออกพร้อมกับ cytokines อื่นๆ ส่งผลในการเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ไปยังหลอดเลือด เพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ รวมถึงการผลิต IgE อีกทั้งยังสามารถสร้างจาก transformed epithelial cells ได้ (23, 24) การศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ทั้ง 4 กลุ่ม มีปริมาณของ IL-5 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงคาดว่า การเพิ่มขึ้นของ IL-5 ในหนูกลุ่มที่ได้รับระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับ และสารก่อมะเร็ง NDMA อาจเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็ง NDMA และการติดสื่อน้ำตาลบริเวณรอบท่อน้ำดีที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ metaplasia แสดงถึงการอักเสบที่อาจพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า การอักเสบแบบเรื้อรังจะส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของมะเร็งตับอ่อน และเซลล์ภูมิคุ้มกัน เช่น eosinophil และ IL-5 โดย IL-5 ในตับอ่อนจะกระตุ้น IL-5R $\alpha$  เพื่อเพิ่มการลุกลามของมะเร็ง

IL-13 ทำหน้าที่ในการควบคุมภูมิคุ้มกัน สามารถกระตุ้นเซลล์สาย monocyte และยับยั้งการผลิต cytokine ที่เกี่ยวกับการอักเสบ อีกทั้งยังทำให้เกิดการเปลี่ยน isotype ของ IgG ใน B lymphocyte เป็น IgE ดังนั้นจึงมีบทบาทเกี่ยวกับภูมิแพ้และป้องกันจากการติดเชื้อหนอนพยาธิ และการแสดงออกที่มากเกินไปของ IL-13 ยังช่วยในการเปลี่ยนแปลงของ macrophage จาก M1 ไปเป็น M2 ซึ่งจะส่งเสริมการเติบโตของมะเร็ง การศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ทั้ง 4 กลุ่ม มีปริมาณของ IL-13 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงความสามารถในการเกิด Class switching จาก B cell ไปเป็น IgE ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อพยาธิ ทำให้เกิดการอักเสบที่นำไปสู่การพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าหนูที่มีการแสดงออกของ IL-13 จะมีระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้นซึ่งชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อยีน และยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของ IL-13 ยังสัมพันธ์กับ IgE ที่เป็นตัวกลางสำคัญของโรคหอบหืดจากภูมิแพ้และทำให้เกิดการอักเสบในหนูที่เป็นโรคมะเร็ง (44)

eosinophil เป็นเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte ที่ส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการต้านปรสิต และก่อให้เกิดการแพ้ โดยภาวะ eosinophilia เป็นหนึ่งในลักษณะเด่นของการติดเชื้อหนอนพยาธิ ซึ่งมีแนวโน้มว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ เมื่อเกิดการติดเชื้อแล้ว eosinophil จะสะสมใกล้กับบริเวณที่เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อจากปรสิตและหนอนพยาธิ เกิดการหลั่ง cytokine นำไปสู่การฆ่าปรสิตและการปรับตัวทางภูมิคุ้มกัน (31, 32) การศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการรับระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็ง NDMA มีจำนวน eosinophil สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ melatonin กลุ่มที่ได้รับ gemcitabine และกลุ่มที่ได้รับ melatonin ร่วมกับ gemcitabine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาดังนี้

1) eosinophil มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในระยะต้นของมะเร็งเต้านมของหนูเม้าส์ เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาการอักเสบระยะเริ่มต้น (45)

2) อาการทางคลินิกที่สำคัญของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิ ได้แก่ ไข้ ปวดท้อง eosinophilia และ Hepatosplenomegaly (46)

ดังนั้นการพบจำนวน eosinophil สูงในหนูกลุ่มนี้แสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพยาธิ และอาจพัฒนาไปสู่การเป็นมะเร็งท่อน้ำดีได้

basophil และ mast cells เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดที่เกี่ยวข้องกับการต่อสู้กับปรสิตและเป็นตัวประสานสำคัญของโรคภูมิแพ้ (47) โดยความสามารถของ Basophil ในการหลั่ง IL-4 และ type 2 cytokines ได้สนับสนุนแนวคิดที่ว่า basophil มีส่วนทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านพยาธิในการส่งเสริมการตอบสนองของเซลล์ T helper 2 (Th2) (48) การศึกษานี้พบว่าเมื่อหนูแฮมสเตอร์ได้รับ melatonin, gemcitabine หรือได้รับ melatonin ร่วมกับ gemcitabine จะมีจำนวน basophil เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาดังนี้

1) basophil ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิในครั้งแรก (49)

2) ในหนูพร่อง regulatory T cell มีความเกี่ยวข้องกับการ infiltration ของ basophil และ CD8 T cell มายังบริเวณมะเร็ง ซึ่ง Basophil สนับสนุน recruitment ของ CD8<sup>+</sup> T cells ใน TME ที่เกี่ยวข้องกับการต้านมะเร็ง (33)

3) basophils เป็นตัวหลักในการตอบสนองต่อการมีอยู่ของ IL-4 ในผู้ป่วย PDAC

neutrophils เป็น granulocyte ที่มีอายุสั้น มีบทบาทที่หลากหลายในโรคต่างๆ รวมถึงโรคติดเชื้อ โรคเมตาบอลิซึม โรคภูมิคุ้มกันตนเอง และโรคที่เกี่ยวข้องกับอายุ อีกทั้ง neutrophils ยังทำหน้าที่ในการป้องกันโฮสต์ รวมทั้งด้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดเศษเซลล์ผ่าน



การ apoptosis ซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อและเส้นเลือดใหม่หลังจากเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ การศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีด้วยการรับระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ ตับและสารก่อมะเร็ง NDMA มีจำนวน neutrophil ต่ำที่สุด และจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับ melatonin, melatonin ร่วมกับ gemcitabine และ gemcitabine ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา ดังนี้

1. ในมะเร็งลำไส้ระยะที่ 3 ที่ได้รับเคมีบำบัดที่ 5-fluorouracil จะมีจำนวนของ neutrophil ในมะเร็งที่สูงขึ้น ซึ่งจะสัมพันธ์กับโอกาสในการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดแบบ 5-FU ที่สูงขึ้น ดังนั้นการที่มีจำนวนของ neutrophil ในมะเร็งที่สูงขึ้น อาจช่วยให้ผู้ป่วยมีแนวโน้มที่จะตอบสนองต่อเคมีบำบัดมากขึ้น (50)
2. การเพิ่มขึ้นของ neutrophil สัมพันธ์กับความสามารถในการรักษาด้วย Orf virus เพื่อเพิ่มระยะเวลาการอยู่รอดและลดมะเร็ง (51)

melatonin เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ การสร้างหลอดเลือดใหม่ การพัฒนาและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง โดยกระตุ้นการ apoptosis ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับ melatonin มีจำนวนของ eosinophil ที่ลดลงจากกลุ่มที่ไม่ได้รับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการลดลงนี้บ่งบอกถึงความสามารถของ melatonin ในการลดการอักเสบซึ่งมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า melatonin ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็ง (carcinogenesis) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็ง พบว่าการมี melatonin ลดลง จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และทำให้เซลล์มะเร็งต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (13, 52)

นอกจากนี้ได้มีการนำ melatonin มาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดต่างๆ เช่น ใช้ในการรักษาโรคลำไส้ อักเสบจาก Oxazolone พบว่า melatonin สามารถยับยั้งการอักเสบของลำไส้ได้โดยการยับยั้งการหลั่ง type 2 cytokine ของ ILC2 และ Th2 cell ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบ (2, 36-39) โดยในการศึกษานี้พบว่าหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine มีจำนวนของ eosinophil ที่ลดลง basophil และ neutrophil ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาดังนี้

1. melatonin และสารเมตาบอไลต์ N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (afmk) AFMK สามารถเพิ่มความไวต่อการต้านมะเร็งของ Gemcitabine ในเซลล์ PANC-1 ได้ โดยผ่านการ Apoptosis ของเซลล์

2. พบว่า melatonin ไม่เพียงแต่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการบุกรุกของเซลล์ PDCA ในลักษณะที่ไม่ขึ้นกับตัวรับ แต่ยังเพิ่ม cytotoxicity ของ gemcitabine (53)
3. การใช้ melatonin สามารถเพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิต และลดอาการไม่พึงประสงค์ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้ (54)

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ IL-5<sup>+</sup> และ IL-13<sup>+</sup> ในหนูที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี และได้รับการรักษาด้วย melatonin ร่วมกับ gemcitabine พบว่ามีความแตกต่างของจำนวนเซลล์อักเสบที่มีการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ในหนูทั้ง 4 กลุ่ม โดยพบปริมาณเซลล์สูงในกลุ่มควบคุม (ON) แต่ลดลงในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย melatonin, gemcitabine หรือได้รับยาทั้งสองตัวร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ IL-5 และ IL-13 ในเซลล์บุรอบท่อทางเดินน้ำดีที่มีการอักเสบหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแบบ metaplasia เช่นเดียวกับจำนวนเซลล์ eosinophil แต่สำหรับ basophil และ neutrophil พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับ gemcitabine มากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย melatonin จึงสามารถสรุปได้ว่า melatonin สามารถลดการแสดงออกของ IL-5, IL-13, และ eosinophil และเมื่อใช้ melatonin ร่วมกับ gemcitabine สามารถลดปริมาณเซลล์ที่มีการแสดงออกของ IL-13 และ eosinophil ได้มากขึ้น และยังช่วยลดปริมาณ basophil เมื่อเทียบกับการให้ gemcitabine เพียงอย่างเดียว(13, 16)

### เอกสารอ้างอิง

1. Ratchadaphon Saengphak M.N.S. The Development of Cholangiocarcinoma Screening Model in High Risk Population at Mueang District, Yasothon Province. 2020.
2. Zhao ZX, Yuan X, Cui YY, Liu J, Shen J, Jin BY, et al. Melatonin Mitigates Oxazolone-Induced Colitis in Microbiota-Dependent Manner. *Front Immunol.* 2021;12:783806.
3. Kato A. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. *Chest.* 2019;156(1):141-9.
4. Loser S, Smith KA, Maizels RM. Innate Lymphoid Cells in Helminth Infections- Obligatory or Accessory? *Front Immunol.* 2019;10:620.
5. Olguin-Martinez E, Ruiz-Medina BE, Licona-Limon P. Tissue-Specific Molecular Markers and Heterogeneity in Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol.* 2021;12:757967.
6. Yu X, Vargas J, Green PHR, Bhagat G. Innate Lymphoid Cells and Celiac Disease: Current Perspective. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;11(3):803-14.
7. Banales JM, Marin JJG, Lamacra A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(9):557-88.
8. Buisson Y. [Control of *Opisthorchis viverrini* infection for cholangiocarcinoma prevention]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2017;110(1):61-7.
9. Kaewpitoon N, Kaewpitoon S-J, Pengsaa P, Sripa B. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol.* 2008;14(5):666-74.
10. Hughes T, O'Connor T, Techasen A, Namwat N, Loilome W, Andrews RH, et al. Opisthorchiasis and cholangiocarcinoma in Southeast Asia: an unresolved problem. *Int J Gen Med.* 2017;10:227-37.
11. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget.* 2017;8(24):39896-921.
12. Amaral F, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism.* 2018;62:472-9.

13. Kornnika Yangan, Araya Ongiem, Phongthara Vichitvejpaisal. Melatonin: Is It Suitable for Use in Anesthesia. *Thai J Anesthesiol.* 2019:73.
14. Gurunathan S, Qasim M, Kang M-H, Kim J-H. Role and Therapeutic Potential of Melatonin in Various Type of Cancers. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2019-52.
15. Yang J, Xu J, Zhang B, Tan Z, Meng Q, Hua J, et al. Ferroptosis: At the Crossroad of Gemcitabine Resistance and Tumorigenesis in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):10944.
16. Koltai T, Reshkin SJ, Carvalho TMA, Di Molfetta D, Greco MR, Alfarouk KO, et al. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers (Basel).* 2022;14(10):10.
17. Somade OT, Adeyi OE, Ajayi BO, Asunde OO, Iloh PD, Adesanya AA, et al. Syringic and ascorbic acids prevent NDMA-induced pulmonary fibrogenesis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress through the regulation of PI3K-Akt/PKB-mTOR-PTEN signaling pathway. *Metabol Open.* 2022;14:100179.
18. White CM. Understanding and Preventing (N-Nitrosodimethylamine) NDMA Contamination of Medications. *Ann Pharmacother.* 2020;54(6):611-4.
19. Abdullah ATM, Khan TA, Sharif M, Mazumdar RM, Rahman MM. Determination of dietary exposure and extraction efficiency of nitrosamine from cooked meat. *Curr Res Food Sci.* 2022;5:491-7.
20. Martin MD, Badovinac VP, Griffith TS. CD4 T Cell Responses and the Sepsis-Induced Immunoparalysis State. *Front Immunol.* 2020;11:1364.
21. Klose CSN, Artis D. Innate lymphoid cells control signaling circuits to regulate tissue-specific immunity. *Cell Res.* 2020;30(6):475-91.
22. Wang J, Chen T, Tang W, Kang M, Chen S. Associations of interleukin-4 and interleukin-4 receptor loci with esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. *Int Immunopharmacol.* 2021;97:107659.

23. Takeuchi E, Takahashi N, Morizumi S, Tamiya H, Matsuoka H, Kuroda N, et al. Interleukin-5-producing malignant pleural mesothelioma with eosinophilic pleural effusion. *Thorac Cancer*. 2020;11(10):3043-6.
24. Ghassemian A, Park JJ, Tsoulis MW, Kim H. Targeting the IL-5 pathway in eosinophilic asthma: a comparison of mepolizumab to benralizumab in the reduction of peripheral eosinophil counts. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2021;17(1).
25. Gerlach K, Weigmann B. The dichotomous function of interleukin-9 in cancer diseases. *Journal of Molecular Medicine*. 2019;97(10):1377-83.
26. Wan J, Wu Y, Ji X, Huang L, Cai W, Su Z, et al. IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1.
27. Tak W. Mak, Mary E. Saunders. Interleukin 13.
28. Shi J, Song X, Traub B, Luxenhofer M, Kornmann M. Involvement of IL-4, IL-13 and Their Receptors in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):6.
29. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;61(2):194-211.
30. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
31. Mitre E, Klion AD. Eosinophils and helminth infection: protective or pathogenic? *Seminars in Immunopathology*. 2021;43(3):363-81.
32. Simon SCS, Utikal J, Umansky V. Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(5):823-33.
33. Chauhan J, Stavrika C, Grandits M, Palhares L, Josephs DH, Lacy KE, et al. Clinical and Translational Significance of Basophils in Patients with Cancer. *Cells*. 2022;11(3).
34. Lofgren KA, Sreekumar S, Jenkins EC, Jr., Ernzen KJ, Kenny PA. Anti-tumor efficacy of an MMAE-conjugated antibody targeting cell surface TACE/ADAM17-cleaved Amphiregulin in breast cancer. *Antib Ther*. 2021;4(4):252-61.
35. Coniglio SJ, Segall JE. Microglial-stimulation of glioma invasion involves the EGFR ligand amphiregulin. *PLoS One*. 2021;16(11):e0260252.

36. Leja-Szpak A, Nawrot-Porąbka K, Góralska M, Jastrzębska M, Link-Lenczowski P, Bonior J, et al. Melatonin and its metabolite N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (afmk) enhance chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *Pharmacological Reports*. 2018;70(6):1079-88.
37. Salaric I, Karmelic I, Lovric J, Bazdaric K, Rozman M, Cvrljevic I, et al. Salivary melatonin in oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):13201.
38. Ming-Ju Hsieh, Chiao-Wen Lin, Shih-Chi Su, Russel J. Reiter, Andy Wei-Ge Chen, Mu-Kuan Chen, et al. Effects of miR-34b/miR-892a Upregulation and Inhibition of ABCB1/ABCB4 on Melatonin-Induced Apoptosis in VCR-Resistant Oral Cancer Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:877-89.
39. Kunlun Chen<sup>1</sup>, Pengfei Zhu<sup>1</sup>, Wenhui Chen<sup>1</sup>, Kai Luo<sup>1</sup>, Xiao-Jing Shi<sup>2</sup>, Wenlong Zhai<sup>1</sup>. Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells. *AGING*. 2021;13.
40. Xiong X, Cheng Z, Wu F, Hu M, Liu Z, Dong R, et al. Berberine in the treatment of ulcerative colitis: A possible pathway through Tuft cells. *Biomed Pharmacother*. 2021;134:111129.
41. van der Ploeg EK, Hermans MAW, van der Velden VHJ, Dik WA, van Daele PLA, Stadhouders R. Increased group 2 innate lymphoid cells in peripheral blood of adults with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1490-6.e2.
42. Ye L, Jin K, Liao Z, Xiao Z, Xu H, Lin X, et al. Hypoxia-reprogrammed regulatory group 2 innate lymphoid cells promote immunosuppression in pancreatic cancer. *EBioMedicine*. 2022;79:104016.
43. He Y, Luo J, Zhang G, Jin Y, Wang N, Lu J, et al. Single-cell profiling of human CD127(+) innate lymphoid cells reveals diverse immune phenotypes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2022.
44. Chapman AM, Malkin DJ, Camacho J, Schiestl RH. IL-13 overexpression in mouse lungs triggers systemic genotoxicity in peripheral blood. *Mutat Res*. 2014;769:100-7.

45. Jeong J, Kim Y-J, Yang KH, Yoon SY, Sohn K-Y, Kim H-J, et al. Gemcitabine-generated ROS promotes neutrophil chemotactic activity through CXCL8 production via PKC $\delta$ /ERK pathway in a murine 4T1 breast cancer model. *The Journal of Immunology*. 2017;198(1 Supplement):204.11-11.
46. Fernandes Serodio J, Lopes M, Ribeiro R, Trindade M, Favas C, Delgado Alves J. Hepatic fascioliasis as an important differential diagnosis to cholangiocarcinoma. *Journal of Travel Medicine*. 2021;28(6).
47. Caslin HL, Taruselli MT, Paranjape A, Kiwanuka K, Haque T, Chumanevich AP, et al. The Use of Human and Mouse Mast Cell and Basophil Cultures to Assess Type 2 Inflammation. In: Reinhardt RL, editor. *Type 2 Immunity: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 81-92.
48. Peng J, Siracusa MC. Basophils in antihelminth immunity. *Seminars in Immunology*. 2021;53:101529.
49. Yasuda K, Nakanishi K. Host responses to intestinal nematodes. *International Immunology*. 2018;30(3):93-102.
50. Galdiero MR, Bianchi P, Grizzi F, Di Caro G, Basso G, Ponzetta A, et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2016;139(2):446-56.
51. Minott JA, van Vloten JP, Chan L, Mehrani Y, Bridle BW, Karimi K. The Role of Neutrophils in Oncolytic Orf Virus-Mediated Cancer Immunotherapy. *Cells*. 2022;11(18).
52. Xin Z, Jiang S, Jiang P, Yan X, Fan C, Di S, et al. Melatonin as a treatment for gastrointestinal cancer: a review. *Journal of Pineal Research*. 2015;58(4):375-87.
53. Ju HQ, Li H, Tian T, Lu YX, Bai L, Chen LZ, et al. Melatonin overcomes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by abrogating nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J Pineal Res*. 2016;60(1):27-38.
54. Woraya Manprasert, Nutjaree Pratheepawanit Johns, Auemkhae Sukprasert, Jaturat Kantapittaya, Thiti Weerapreeyakul, Parichat Pongthai, et al. Effects of Melatonin on Quality of Life of Non-resectable Cholangiocarcinoma Patients. *Srinagarind Med J*. 2010.



ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก การเตรียมน้ำยาและสารเคมี

#### 1. การเตรียม 10X PBS (pH7.4)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.9	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.2	g
NaCl	90	g
Deionized water	1000	ml

#### 2. การเตรียม 1X PBS

10X PBS	100	ml
Deionized water	900	ml

#### 3. การเตรียม 0.05% PBST

1X PBS	1000	ml
Tween 20	500	ul

#### 4. การเตรียม 5x Citrate buffer (pH 6.0)

Tri-sodium citrate (dihydrate)	14.7	g
Tween 20	500	ul
Distilled water	1000	ml

#### 5. การเตรียม 1X Citrate buffer

5X Citrate buffer	200	ml
Distilled water	800	ml

#### 6. การเตรียม working DAB

Stock DAB (1 mg/ml)	25	ul
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	ul
PBS	500	ul

### ภาคผนวก ข ข้อควรระวังในการย้อม IHC

1. ทุกขั้นตอนในการทดลอง ห้ามให้สไลด์แห้งโดยเด็ดขาด เพราะอาจทำให้ชิ้นเนื้อดับลอกออก หรืออาจทำให้สีติดเข้มมากบริเวณที่ชิ้นเนื้อแห้ง
2. ขั้นตอนการกำจัด paraffin ควรมีการเขย่า staining rack ด้วยเพื่อช่วยในการเอา paraffin ออกจากชิ้นเนื้อให้หมด
3. ควรเปลี่ยน staining rack ระหว่าง xylene กับ alcohol เพื่อช่วยเพิ่มอายุการใช้งานของสารทั้งสองชนิด
4. ขั้นตอนหลังจากการย้อม primary antibody ไม่ควรเขย่าแรงเกินไป เพราะอาจทำให้ primary antibody หลุดออกได้
5. ทุกขั้นตอนในการทดลองควรสวมอุปกรณ์ป้องกันตนเอง เช่น เสื้อกาวน์ ถุงมือ เป็นต้น โดยเฉพาะขั้นตอนการทดลองที่ใช้ DAB ควรสวมถุงมือทุกครั้ง เนื่องจากมีคุณสมบัติ carcinogen

## ประวัติผู้วิจัย

<b>ชื่อสกุล</b>	นางสาวธีราภรณ์ จินยี
<b>รหัส</b>	62661087
<b>สาขาวิชา</b>	เทคนิคการแพทย์
<b>วัน เดือน ปีเกิด</b>	21 สิงหาคม 2543
<b>สถานที่เกิด</b>	โรงพยาบาลเพชรบูรณ์
<b>ประวัติการศึกษา</b>	ประกาศนียบัตรชั้นประถมศึกษา โรงเรียนบ้านบ่อไทย ต.บ่อไทย อ.หนองไผ่ จ.เพชรบูรณ์ ประกาศนียบัตรชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและปลาย โรงเรียนหนองไผ่ ต.หนองไผ่ อ.หนองไผ่ จ.เพชรบูรณ์ กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก
<b>สถานที่ติดต่อ</b>	169 หมู่4 ตำบลบ่อไทย อำเภอหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ 67140
<b>E-mail address</b>	teerapornj62@nu.ac.th

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวปิ่นนพร น้ำทิพย์
รหัส	62661421
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
วัน เดือน ปีเกิด	23 พฤษภาคม 2544
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลพิจิตร
ประวัติการศึกษา	ประกาศนียบัตรชั้นประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลพิจิตร อ.เมือง จ.พิจิตร ประกาศนียบัตรชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและปลาย โรงเรียนพิจิตรพิทยาคม อ.เมือง จ.พิจิตร กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก
สถานที่ติดต่อ	88 หมู่ 8 ต.ปากทาง อ.เมือง จ.พิจิตร 66000
E-mail address	Pannapronn62@nu.ac.th

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวรัชยา สิทธิ
รหัส	62661957
สาขาวิชา	เทคนิคการแพทย์
วัน เดือน ปีเกิด	2 ธันวาคม 2543
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลน่าน
ประวัติการศึกษา	ประกาศนียบัตรชั้นประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลลาดยาว อ.ลาดยาว จ.นครสวรรค์ ประกาศนียบัตรชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนลาซาลโชติรวินนครสวรรค์ อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ประกาศนียบัตรชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนศรีสวัสดิ์วิทยาคารจังหวัด น่าน อ.เมือง จ.น่าน กำลังศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก
สถานที่ติดต่อ	18 ม.4 ต.ม่วงตึ๊ด อ.ภูเพียง จ.น่าน 55000
E-mail address	waratchayas62@nu.ac