บทนำ

ในปี ค.ศ. 1896 Sir George Beatson รักษาคนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมโดยการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้งสองข้าง (bilateral oophorectomy) พบว่า คนไข้มีอาการดีขึ้น (Beatson, 1896) แต่รายงานนี้ไม่มีผู้สนใจมากนัก จนกระทั่ง Huggins และคณะ (1941) พบว่าการตัดอัณฑะของคนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งที่ต่อมลูกหมาก (prostate gland) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการทุเลาขึ้น จากผลงานของ Huggins และคณะนี้ทำให้เกิดแนวความคิดที่ว่า เนื้องอก มะเร็งในคนนั้นอาจจะต้องอาศัยฮอร์โมนในการเจริญเติบโต จากรายงานที่ศึกษาต่อ ๆ มา มีผู้พบว่าการตัดต่อมหมวกไตหรือการตัดต่อมใต้สมอง ทำให้คนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมมีอาการดีขึ้น (Huggins และ Bergenstal, 1952, Luft และ Olivecrona, 1955) จากรายงานเหล่านี้ทำให้เกิดแนวความคิดที่ว่าเนื้องอกต่าง ๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่มีปฏิกริยาตอบสนองต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนนั้น นอกจากจะเจริญเติบโตได้โดยอาศัยการกระตุ้นจากฮอร์โมนตัวใดตัวหนึ่งโดยเฉพาะแล้ว ในขณะเดียวกันก็อาจจะมีขนาดเล็กลงถ้าได้รับฮอร์โมนอื่น ๆ หรือสารที่เป็นอนุพันธ์ของฮอร์โมนต่าง ๆ

จากผลการทดลองของ Beatson หรือ Huggins รวมทั้ง Luft และ Olivecrona สรุปได้ว่า คนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านมที่มีการตอบสนองต่อการรักษาโดยการตัดอวัยวะที่เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนเพศมีอยู่ประมาณ 30% – 40% และมีผู้จัดประเภทของก้อนเนื้อมะเร็งที่ตอบสนองต่อการรักษาโดยวิธีที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนว่าเป็น "hormonal dependent breast cancer" และจัดก้อนเนื้อประเภทที่ไม่มีปฏิกริยาตอบสนองเป็น "hormonal independent breast cancer"

ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมา การศึกษาทางด้านชีวเคมีพบว่า อวัยวะเป้าหมาย (target organ) ของฮอร์โมนอีสโตรเจนอันได้แก่มดลูก ช่องคลอด ต่อมใต้สมองและต่อมน้ำนม เป็นต้น มีคุณลักษณะพิเศษในการจับกับฮอร์โมนอีสโตรเจน (Glascock และ Hockstra, 1959; Branuberg และคณะ, 1967)

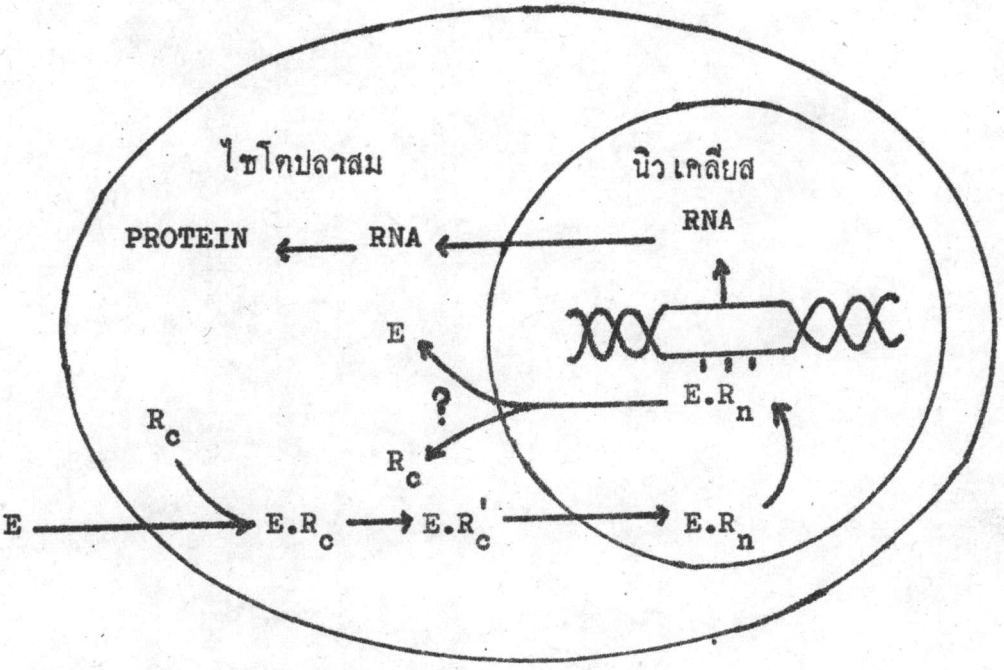
นอกจากนี้ Folca และคณะ (1961) พบปรากฏการณ์ที่คล้ายกัน จากการศึกษาโดยวิธีฉีด tritriated hexestrol เข้าไปในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม และพบว่ามีโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลมะเร็งมีคุณสมบัติในการจับสารที่ติดฉลากรังสี และเขาเรียกโปรตีนนี้ว่า "Specific estrogen receptors protein" ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบทั่วไปในมะเร็งเต้านมที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน (Korenman และ Dukes, 1970)

ในทศวรรษที่ผ่านมามีรายงานพบว่าคนไข้ที่เป็นมะเร็งเต้านมและตรวจพบว่ามีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน มักจะตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีให้ฮอร์โมนได้ดีกว่าในรายที่ไม่พบว่ามีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนเลย (Hamilton, 1968; Hall 1968; Dao, 1972; Jensen และคณะ, 1972)

<u>การเกิดปฏิกริยาของฮอร์โมนอีสโตรเจนกับอวัยวะเป้าหมาย</u>

ความเข้าใจในเรื่องพฤติการณ์ของฮอร์โมนอีสโตรเจนที่มีต่อเซลมะเร็งเต้านมนั้น มาจากการศึกษาผลของฮอร์โมนอีสโตรเจนที่มีต่อเซลธรรมดา (Hamilton, 1968; Gorski และคณะ 1968) หลังจากที่ฮอร์โมนอีสโตรเจนจับกับรีเซพเตอร์โปรตีนในเซลเป้าหมายแล้วจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้าน transcription (การถอดระหัสทางพันธุกรรม) และ translation (การแปลระหัสทางพันธุกรรม) ในเซลเป้าหมายนั้น จากการทดลองในปี ค.ศ. 1972 Jensen และ DeSombre พบว่าฮอร์โมนอีสโตรเจนจับกับรีเซพเตอร์โปรตีนแล้ว เกิดขบวนการดังรูปที่ 1

ในขั้นแรกฮอร์โมนอีสโตรเจน (E) จะเข้าไปในเซลเป้าหมายโดยขบวนการ passive diffusion แล้วจับกับรีเซพเตอร์โปรตีน (R_c) ในไซโตปลาสม เกิดเป็น complex ของ E และ R_c (E. R_c) ในต่อมน้ำนมปกติ E. R_c จะมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน (sedimentation coefficient) เท่ากับ 8 – 9S ใน sucrose gradient ที่มีความเข้มข้นของเกลือระดับต่ำ คือ 0.02 M KCl แต่จะมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอนเท่ากับ 4 – 5 S เมื่อความเข้มข้นของเกลือ KCl เป็น 0.4 M (Gardner และ Wittliff, 1973) ถึงแม้จะมีข้อ



รูปที่ 1 ปฏิกริยาของฮอร์โมนอีสโตรเจนที่มีต่อเซลเป้าหมาย (target cell)
Wittliff, (1974)

มูลที่ชี้ว่า R_c อยู่ในไซโตปลาสมของเซล แต่ขนาดที่แท้จริงและตำแหน่งที่อยู่ของ R_c ในเซลไม่ทราบว่าอยู่ในลักษณะอิสระหรือจับกับ organelle ใด

Jensen และ DeSombre (1972) รายงานว่าหลังจากฮอร์โมนรวมกับรีเซพเตอร์แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น complex E. R_c ที่มีสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอนเป็น 5S การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ขึ้นกับอุณหภูมิ จากนั้น complex ดังกล่าวจะเคลื่อนเข้าไปในนิวเคลียส (E. R_n) แล้วไปจับกับ acceptor sites ของโครมาติน กระตุ้น activity ของ RNA polymerase ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดไรโบนิวคลีอิค (Mohla และคณะ, 1972) ซึ่งบางครั้งฮอร์โมนก็ไปกระตุ้นการเพิ่ม template activity ของโครมาติน ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Hamilton, 1968) แต่การกระตุ้นจะมากน้อยขึ้นกับปริมาณของฮอร์โมน เพราะถ้าไม่มีฮอร์โมนอีสโตรเจนจะไม่พบ E. R_n ในนิวเคลียสเลย (Korenman และ Dukes, 1970) หลังจาก E. R_n กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนแล้ว ขบวนการที่ E. R_n จะสลายไปนั้นปัจจุบันยังไม่เป็นที่เข้าใจ

นอกจากฮอร์โมนอีสโตรเจนแล้ว ฮอร์โมนสเตอรอยด์ตัวอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น โปรเจสตาเจน, กลูโคคอร์ติคอยด์ ก็มีปฏิกริยากับต่อมน้ำนมเช่นกัน ทั้งฮอร์โมนอีสโตรเจนและโปรเจสตาเจนกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลเยื่อบุ (epithelial cell) ของเต้านม ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนม (Shyamala และ Nandi, 1972) ส่วนฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์มีส่วนสำคัญเกี่ยวกับการรวมตัวของ rough endoplasmic reticulum ซึ่งเป็นแหล่งการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนม (Oka และ Topper, 1972)

ส่วนฮอร์โมนเพศชายพวกแอนโดรเจน (androgen) นั้นปรากฏว่ามีการรวมตัวแบบจำเพาะ (specific binding) ในระเร็งเต้านมของหนู และมีส่วนเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำนม (Matsumoto และคณะ, 1972)

คุณสมบัติของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์

Talwar และคณะ (1964) เป็นกลุ่มแรกที่พบว่าฮอร์โมนอีสโตรเจนมีการจับตัวกับ macromolecule ในเซล และ 2 ปีต่อมามีผู้แสดงให้เห็นว่าถ้าใช้ฮอร์โมนอีสโตรเจนที่ติดฉลากรังสี ($17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$) ฉีดเข้าไปในมดลูกของหนูจะพบฮอร์โมนที่มีรังสีในส่วนของไซโตซอล (cytosol) ในเซลมดลูก (Toft และ Gorski, 1966) ปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นได้โดยวิธีเซ็นตริฟิวจ์ในสารละลายซูโครสที่มีความหนาแน่นต่างกัน (sucrose density gradient centrifugation) (Jensen และคณะ, 1971)

McGuire และ Chamness (1973) ทดลองหาความสามารถของรีเซพเตอร์โปรตีนในการจับ $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 1.2 พิโคโมล แยกพวก $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ ที่จับกับรีเซพเตอร์ออกจากพวก free $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ โดยใช้เทคนิคการดูดซับด้วยผงถ่าน หาค่า dissociation constant (K_d) จากสมการ Scatchard (Scatchard, 1949) พบว่าค่า K_d เท่ากับ 1.2×10^{-10} M แสดงว่าอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนมีความสามารถสูง (high affinity) ในการจับ $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$

นอกจากนี้ McGuire และ Chamness สรุปว่าการจับตัวของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน และ $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ นั้น มีความจำเพาะสูง (high specificity) เพราะสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ไม่ใช่อีสโตรเจน เช่น ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และ เทสโตสเตอโรน (testosterone) ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่า $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ 1000 ถึง 10,000 เท่า ไม่สามารถยับยั้งการจับตัวของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน และ $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ ได้ แต่ถ้าใช้ฮอร์โมนอีสโตรเจนที่ไม่ติดฉลากรังสี ($17\text{-}\beta\ E_2$) ที่ความเข้มข้นสูงกว่า $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ เพียง 10 เท่า การจับตัวของรีเซพเตอร์โปรตีนและ $17\text{-}\beta\ ^{3}H\text{-}E_2$ จะลดลงถึง 90% Wittliff และคณะ (1972 a) ได้แสดงข้อมูลว่าการจับตัวของ $^{3}H\text{-}E_2$ กับ

รีเซพเตอร์ในไซโตซอลของเซลเต้านมปกติและมะเร็งชนิด infiltrating ductal carcinoma นั้น รีเซพเตอร์ที่จับกับ ^{3}H - E$_2$ เป็นพวกที่มีสัมประสิทธิ์การตกตะกอนเท่ากับ 8 – 9 S ส่วนพวกที่มีสัมประสิทธิ์การตกตะกอนเท่ากับ 4 – 5S จะจับกับ ^{3}H - E$_2$ แบบไม่จำเพาะ และจากรายงานของ Jensen และคณะ (1971) มีข้อมูลที่สนับสนุนแนวคิดข้างต้น นอกจากนี้ผู้รายงานกลุ่มหลังเชื่อว่ารีเซพเตอร์พวกหลังนี้เป็นโปรตีนในพลาสมาซึ่งปะปนมากับไซโตซอลของเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม

จากการศึกษาเดียวกันที่กล่าวข้างต้น Wittliff และคณะ รายงานว่าในเนื้อเยื่อเต้านมปกติจะมีแต่โปรตีนที่มีสัมประสิทธิ์การตกตะกอนเท่ากับ 4 -- 5S เท่านั้น และผู้รายงานกลุ่มนี้เชื่อว่าการที่เขาตรวจไม่พบรีเซพเตอร์ไซท์ (receptor site) ของฮอร์โมนอีสโตรเจนอาจจะเนื่องมาจากในเนื้อเยื่อเต้านมปกตินี้มีเซลไขมันและพังผืดมากและมีเซลเยื่อบุน้อย

นักวิทยาศาสตร์มีความเชื่อว่าทั้งรีเซพเตอร์ที่มีสัมประสิทธิ์การตกตะกอนเป็น 8 – 9 S และ 4 – 5S เป็นโปรตีนเนื่องจากรีเซพเตอร์ทั้งสองพวกถูกย่อยได้ด้วยเอ็นไซม์โปรเนส (pronase) แต่ไม่มีปฏิกริยากับเอ็นไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) หรือดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease) (Jensen และ DeSombre, 1972) คุณสมบัตินี้เหมือนกับรีเซพเตอร์ในเซลเต้านมปกติและแสดงให้เห็นได้โดยอาศัยวิธีเซ็นตริฟิวจ์ในสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นต่างกัน (Wittliff และคณะ, 1972 b, Shyamala และ Nandi, 1972, Gardner และ Wittliff, 1973) นอกจากนี้รีเซพเตอร์ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติและมะเร็งเต้านม ยังมีความคล้ายคลึงกันคือการจับตัวกับฮอร์โมนอยู่ใต้อิทธิพลของอุณหภูมิ (Hahnel และ Twaddle, 1971) และ polyanion กับ ionic strength จะมีอิทธิพลต่อการตกตะกอน (McGuire และ DelaGarza 1973) แต่พวกเนื้อเยื่อเต้านมปกติและพวกเนื้องอกเต้านมชนิดธรรมดา (benign) มีความแตกต่างจากพวกเนื้อเยื่อ

มะเร็งเต้านมในขบวนการเมตาบอลิสมของการ์โบไฮเดรตและไลปิด (Savlov และคณะ, 1974) กล่าวคือ เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมชนิด infiltrating ductal carcinoma มีสมบัติของ pyruvate kinase (PYK), glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6 PD), isocitrate dehydrogenase (ICD) และ hexokinase (HK) สูงกว่าเนื้อเยื่อเต้านมที่ไม่ใช่มะเร็ง 2 - 8 เท่า (Hilf และคณะ, 1970) นอกจากนี้เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมชนิด infiltrating ductal carcinoma ที่เป็น "Hormonal dependent breast cancer" จะมีสมบัติของเอ็นไซม์ PYK, G6PD และ ICD ต่ำกว่าเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่เป็น "Hormonal independent breast cancer" (Hilf และคณะ, 1973)

<u>ความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนอีสโตรเจนกับอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน</u>

Wittliff และคณะ (1972 a) พบว่า พวกเนื้องอกที่เต้านมซึ่งไม่ใช่มะเร็งจะไม่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ หรือถ้ามีก็มีน้อยมาก เมื่อเทียบกับเนื้องอกที่เป็นมะเร็ง และรีเซพเตอร์มักเป็นพวกที่มีความจำเพาะต่ำ (Hahnel และ Twaddle, 1971; Feherty และคณะ, 1971; Hahnel และคณะ, 1971) โดยพวกที่เป็นเซลเนื้อเยื่อเต้านมปกติของสตรีมีความสามารถจับกับ $^{3}H - E_2$ ได้ในร่างกาย แต่ปริมาณที่จับน้อยกว่าพวกเซลมะเร็ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลของเนื้อเยื่อเต้านมปกติประกอบด้วยเซลไขมันเป็นส่วนใหญ่ ผิดกับพวกมะเร็งเต้านมที่เป็นพวกเซลเยื่อบุ (Deshpande และคณะ, 1967; McGuire และ Chamness, 1973)

มีรายงานที่ชี้นำว่า ปริมาณของฮอร์โมนอีสโตรเจนในพลาสมา อาจมีส่วนสำคัญต่อการวัดปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ Mass และคณะ (1972) พบว่าปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ที่เขาวัดได้มีความสัมพันธ์กับภาวะของรอบเดือน และถ้าปริมาณของอีสโตรเจนในพลาสมาสูงกว่า 300 พิโคกรัม/มล. จะตรวจไม่พบ

อีสโตรเจนรีเซพเตอร์เลย นอกจากนี้ Wittliff และคณะ (1972 b) รายงานว่าจากการวัดอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ในคนไข้ที่หมดประจำเดือนแล้ว 5 ปี เขาตรวจพบรีเซพเตอร์ในคนไข้ประมาณ 60% จากรายงานดังกล่าว ทำให้กาดได้ว่าการที่ผู้วิจัยหลายกลุ่มไม่สามารถตรวจพบรีเซพเตอร์ในคนไข้ที่มีปริมาณอีสโตรเจนในพลาสมาสูง ๆ นั้น อาจเป็นเพราะรีเซพเตอร์ไซท์ถูกจับโดยอีสโตรเจนในพลาสมาหมด การวัดอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มาจากคนไข้ในช่วงอายุที่ยังมีประจำเดือนอยู่จึงควรจะคำนึงถึงอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนในพลาสมาต่อผลการวัดด้วย

<u>การหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน</u>

การวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนมีหลายวิธี คือ

1. วิธีตัดเนื้อเยื่อเป็นแผนบาง (tissue slice) (Gorski และคณะ, 1968) เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้วัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ โดยตัดเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมออกเป็น slice หนา 0.5 มม. อินคิวเบทกับ 17 - β ^{3}H - E_2 estradiol (^{3}H - E_2) ใน Krebs - Ringer NaHCO buffer ซึ่งมีสาร antiestrogen เช่น nofoxidine และไม่มีสาร antiestrogen ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60, 80, 100 และ 120 นาที นำแผนเนื้อเยื่อที่อินคิวเบทที่เวลาดังกล่าวมาล้างด้วย buffer ทำให้แห้งบนกระดาษกรอง ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี ผลต่างของปริมาณกัมมันตรังสีของ tissue slice ที่มีสาร antiestrogen และไม่มีสาร antiestrogen ก็คือปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในเนื้อเยื่อนั้นมีหน่วยเป็น ($\frac{\text{dpm}}{\text{mg dry weight}}$) ในรายที่ไม่มีรีเซพเตอร์ (receptor negative) จะไม่พบผลต่างของปริมาณกัมมันตรังสีของเนื้อเยื่อที่มีสาร antiestrogen และไม่มีสาร antiestrogen วิธีนี้มีข้อเสียคือ ความถูกต้องและความจำเพาะต่ำ ผู้ทดลองมักจะตรวจพบจำนวนตัวอย่างที่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (receptor positive) น้อยกว่าการ

หาโดยวิธีอื่นในตัวอย่างชุดเดียวกัน คือ ประมาณ 34% ขณะที่วิธีอื่นพบประมาณ 45% – 60% (Gorski และคณะ, 1968 ; Maass และคณะ, 1972)

2. วิธี agar gel electrophoresis เป็นวิธีที่นิยมทำกันมาก โดยเฉพาะการหาแอนโดรเจนรีเซพเตอร์ (androgen receptor) สำหรับการหาอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน นำเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมมา homogenize ปั่นแยกเอาชั้นไซโตซอลส่วนหนึ่งไปอุ่นที่ 48 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายรีเซพเตอร์โปรตีน (Jensen และ DeSombre, 1972) หรือจะใส่สาร antiestrogen เช่น nofoxidine เพื่อให้เกิดการแข่งขันในการรวมตัว (Wagner, 1972) ไซโตซอลอีกส่วนเก็บที่ 2 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไซโตซอลทั้ง 2 ส่วนมาอินกิวเบทกับ $^{3}H - E_2$ ที่ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำ gel electrophoresis ซึ่งใช้เวลา 90 นาทีที่ 110 mA/300 V จากนั้นตัก gel ออกเป็นชิ้น ๆ หนา 3 มม. นำไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี พบว่าพวก free $^{3}H - E_2$ จะเคลื่อนไปทางขั้วลบ ส่วนอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ complex จะเคลื่อนไปยังขั้วบวก ซึ่งไซโตซอลที่อุ่น หรือใส่สาร antiestrogen จะไม่พบมีสารกัมมันตรังสีที่ขั้วบวก ทั้งนี้เพราะรีเซพเตอร์โปรตีนสลายตัวเมื่อถูกความร้อนที่ 48 องศาเซลเซียส (Jensen และ DeSombre, 1972) ผลต่างของปริมาณกัมมันตรังสีจากไซโตซอลที่อุ่นและไม่อุ่น หรือใส่สาร antiestrogen และไม่ใส่สาร antiestrogen ก็คือปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนนั่นเอง มีหน่วยเป็น cpm/mg cytosol protein (Wagner, 1972) วิธี gel electrophoresis นี้ง่ายและสะดวกในการหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ แต่ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

3. วิธีเซ็นตริฟิวจ์ในสารละลายซูโครสที่มีความหนาแน่นต่างกัน วิธีนี้มีผู้ใช้ในการหาคุณสมบัติของรีเซพเตอร์โปรตีนและใช้หาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมในคน (Toft และ Gorski, 1966; Jensen และคณะ, 1971) หลักการของวิธีนี้คล้ายกับ 2 วิธีแรกที่กล่าวมาแล้วคือ นำ

ไซโตซอลส่วนหนึ่งที่ใส่สาร antiestrogen กับอีกส่วนที่ไม่ใส่สาร antiestrogen มาอินคิวเบทกับ $^3H - E_2$ แล้วนำไปเซ็นตริฟิวจ์ในสารละลายซูโครสที่มีความหนาแน่นต่างกัน (10% – 30% sucrose) เก็บส่วนที่ความหนาแน่นต่าง ๆ ไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี พบว่าไซโตซอลที่ใส่สาร antiestrogen ไม่มี peak ของ $^3H - E_2$ ที่ 8 – 9 S รีเซพเตอร์เลย ตรงกันข้ามกับไซโตซอลที่ไม่ใส่สาร antiestrogen จะพบ peak ของ $^3H - E_2$ ที่ 8 – 9S รีเซพเตอร์ ผลต่างของปริมาณกัมมันตรังสีที่จับกับ 8 – 9 S รีเซพเตอร์กับที่ไม่มีการจับตัวของสารกัมมันตรังสี ก็คือปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนนั่นเอง มีหน่วยเป็น f mole/mg cytosol protein (Wittliff และคณะ, 1972a)

4. วิธีดูดซับด้วยผงถ่าน (charcoal adsorption) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ผงถ่านใช้ในการแยก free form หรือ unbound $^3H - E_2$ ออกจาก bound form ซึ่งเป็น complex ของ $^3H - E_2$ กับรีเซพเตอร์โปรตีน วิธีนี้ทำได้โดยอินคิวเบทไซโตซอลจากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมกับ $^3H - E_2$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นจึงเติมผงถ่านลงไปเพื่อแยก free form ออกจาก bound form และ free form จะตกตะกอนลงมากับผงถ่าน ส่วน bound form จะอยู่ในชั้นน้ำใส ปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี แล้วคำนวณหาปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนซึ่งอาจใช้หน่วยเป็น f mole/mg cytosol protein (Korenman และ Dukes, 1970; feherty และคณะ, 1971)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้ปริมาณ $^3H - E_2$ และเนื้อเยื่อมะเร็งน้อย ความแม่นยำก็มีมากกว่าวิธี tissue slice หรือ gel electrophoresis แต่ไม่เท่าวิธีเซ็นตริฟิวจ์ในสารละลายซูโครสที่มีความหนาแน่นต่างกัน

ประโยชน์จากการวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

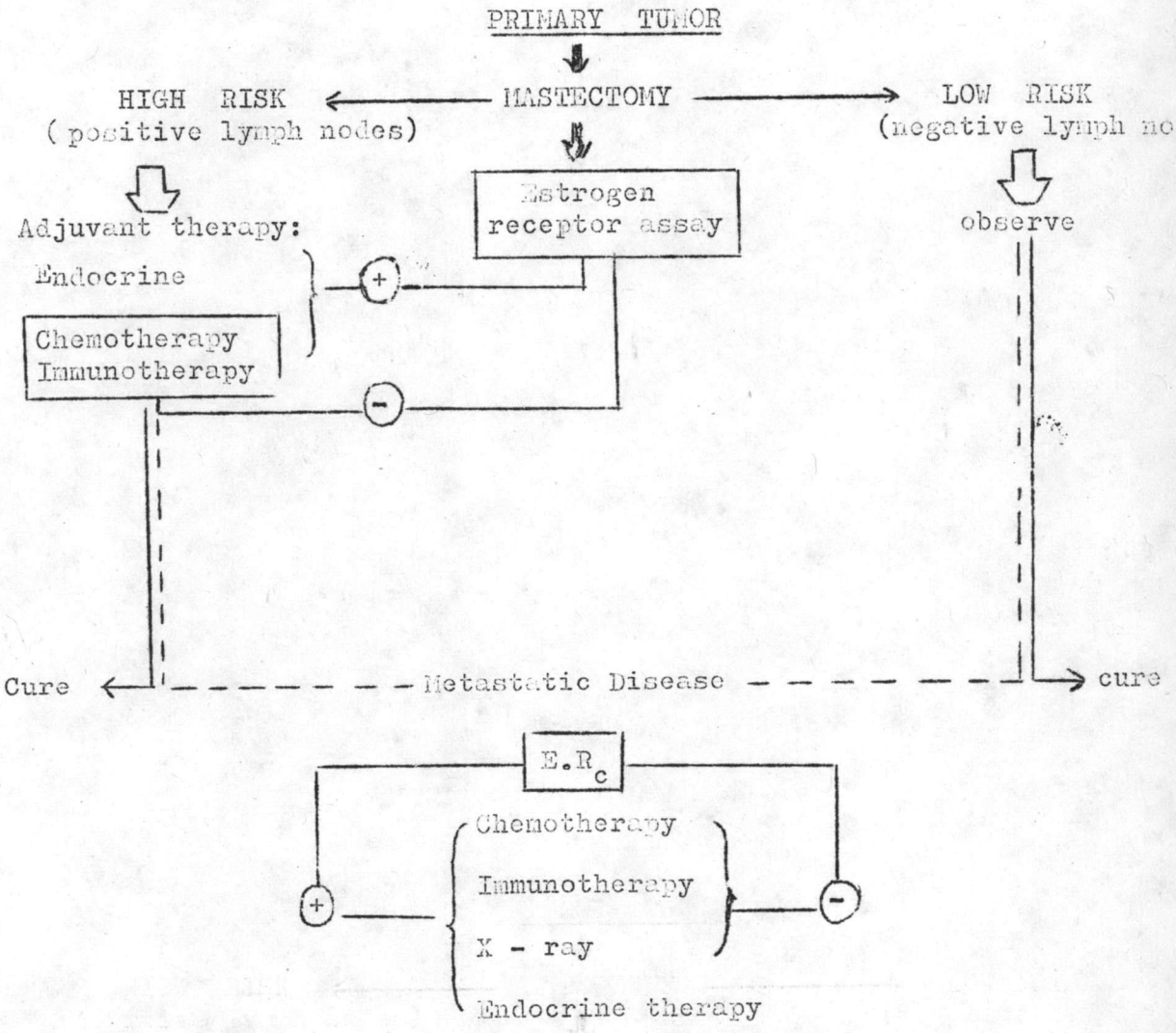
การวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (estrophilin) ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมมีประโยชน์มากทางการแพทย์ในการเลือกวิธีเพื่อรักษาคนไข้ ด้วยเหตุผลที่จะกล่าวต่อไปนี้คือ

Folca และคณะ (1961) พบว่าคนไข้ที่เป็นมะเร็งเต้านมและไม่พบอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ (receptor negative) มีเพียง 5 ราย จากจำนวน 80 ราย ซึ่งมีอาการดีขึ้นจากการตัดต่อมไร้ท่อ ซึ่งเป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนเพศ หรือการรักษาด้วยฮอร์โมน . ผิดกับคนไข้ที่ตรวจพบอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ (receptor positive) ประมาณ 50% – 60% ของคนไข้จะตอบสนองต่อการรักษาทางฮอร์โมน (Hall, 1968; Jensen, 1975; McGuire, 1975; Jensen และคณะ, 1976)

ปกติการรักษามะเร็งเต้านมนั้นมีแบบแผนเฉพาะที่เรียกว่า "Systematic treatment" กล่าวคือ ถ้าก้อนมะเร็งเต้านมมีขนาดเล็กกว่า 5 ซม. และต่อมน้ำเหลือง (lymphnode) โคที่บริเวณรักแร้ (axillary node) หรือบริเวณไหปลาร้า (supraclavicular node) จะคลำได้หรือคลำไม่ได้ก็ตาม การรักษาทำได้โดยการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งเต้านมพร้อมทั้งต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณดังกล่าวออก McGuire (1975) ได้แบ่งอาการของคนไข้เป็นกลุ่มที่มีอันตรายสูง (high risk) ในกรณีตรวจพบมีเซลมะเร็งในต่อมน้ำเหลืองที่ตัดออกมา (positive lymphnode) และกลุ่มที่มีอันตรายต่ำ (low risk) ในกรณีที่ตรวจไม่พบเซลมะเร็งในต่อมน้ำเหลืองที่ตัดออกมา (negative lymphnode) สำหรับคนไข้กลุ่มที่มีอันตรายสูง (รูปที่ 2) และตรวจพบอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ (receptor positive) ถ้าได้รับการรักษาโดยใช้ฮอร์โมน ไม่ว่าจะเป็นการตัดอวัยวะที่เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนหรือรักษาโดยการให้ยาพวกสเตอรอยด์ฮอร์โมน มีโอกาสได้ผลสูง โดยเหตุที่การมีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์แสดงถึงภาวะของเซลมะเร็งเต้านมที่อาจจะเป็น

"Hormonal dependont breast cancer" ในพวกเซลมะเร็งเหล่านั้นทั้งหมดหรือเพียงบางส่วนซึ่งมีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ก็น่าจะเจริญและควบคุมได้ด้วยฮอร์โมน ฉะนั้นการทำให้ภาวะฮอร์โมนในร่างกายน้อยลงหรือมากขึ้นโดยการตัดอวัยวะที่เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนหรือการให้ยาพวกฮอร์โมน ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลมะเร็งหยุดชงักหรือลดลง แต่ถ้าการใช้ฮอร์โมนรักษาไม่ได้ผล อาจรักษาต่อโดยการให้สารเคมี (chemotherapy) ซึ่งมีทั้งชนิก antimetabolite และ antibiotic รวมทั้งการใช้พวก vaccine, corynebacterium parvum vaccine เพื่อกระตุ้นให้สร้าง monocyte ซึ่งเป็น macrophage system การทำลายเนื้องอกมะเร็งในรูปแบบของ immunotherapy (Baum, 1974) ก็สามารถฆ่าเซลมะเร็งได้หรือบางครั้งก็ใช้รวมกับการฉายรังสี (radiotherapy) ตรงบริเวณที่เป็นมะเร็ง การรักษาดังกล่าวเป็นการยืดอายุของคนไข้ให้ยาวขึ้น ในรายที่มีการตอบสนองต่อยาไม่ว่าจะเป็นพวกฮอร์โมนหรือสารเคมี จัดเป็นการรักษาให้หายได้ แต่ถ้าไม่ตอบสนองต่อการรักษาและเกิดเป็นมะเร็งขึ้นมาและมีการแพร่กระจาย (metastases) ไปสู่อวัยวะอื่น เช่น ปอด, สมอง, กระดูกหรือตับ การรักษาก็เป็นแบบพยุง (palliative treatment) หรือตามอาการ (symptomatic treatment)

ในกรณีที่คนไข้อยู่ในกลุ่มที่มีอันตรายสูงและไม่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ การรักษามักจะไม่ใช้ฮอร์โมน เนื่องจากเชื่อกันว่าเซลมะเร็งเต้านมนั้นจะไม่ตอบสนองต่ออิทธิพลของฮอร์โมน การรักษาที่ถูกต้อง คือ การใช้สารเคมี (chemotherapy) หรือ วัคซีน (immunotherapy) เท่านั้น ซึ่งถ้าเซลมะเร็งตอบสนองต่อยาดังกล่าวก็อาจหายได้ ถ้าไม่หายหรือเกิดแพร่กระจาย (distance metastases) ก็รักษาตามอาการ (symptomatic treatment) เท่านั้น



รูปที่ 2 แสดงแผนภูมิการรักษาคนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งเต้านม โดยอาศัยการหาอีสโตรเจนรีเซพเตอร์เป็นหลัก

ในคนไข้กลุ่มที่มีอันตรายต่ำและไม่พบเซลมะเร็งในต่อมน้ำเหลือง การผ่าตัดอย่างเดียวก็อาจรักษาให้หายขาดได้ แต่ทั้งนี้ต้องติดตามอาการคนไข้อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งถ้าคนไข้เกิดเป็นมะเร็งขึ้นอีก หรือมีการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่น ๆ ก็วัดหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ ถ้ามีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ หรือไม่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ก็รักษาแบบเดียวกับในคนไข้กลุ่มที่มีอันตรายดังที่กล่าวมาแล้ว (McGuire, 1975)

การวัดหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน จึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการรักษาอย่างมาก กล่าวคือ หลังผ่าตัด วัดหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ว่ามีหรือไม่มี ถ้ามีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ก็รักษาคนไข้ตามอาการ โดยเริ่มด้วยการใช้ฮอร์โมนรักษา แต่ถ้าไม่มีอีสโตรเจนรีเซพเตอร์ก็ข้ามขั้นไปใช้สารเคมีรักษา ซึ่งการประหยัดเวลาและลดอันตรายที่จะเกิดกับคนไข้ลง

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษารีเซพเตอร์โปรตีนของฮอร์โมนอีสโตรเจนในมะเร็งเต้านมของหญิงไทย</u>

เพื่อศึกษาเทคนิคและสำรวจสถิติการตรวจวัดอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในมะเร็งเต้านมของหญิงไทยครั้งแรกด้วยวิธี ดูดซับด้วยผงถ่าน โดยแบ่งการศึกษาเป็นลำดับดังนี้

1. ทดลองหาสภาพการณ์ต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โดยวิธีดูดซับด้วยผงถ่าน เช่น อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการจับตัวของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนกับสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ปริมาณของสารมาตรฐาน 17-β ^{3}H - E_2 ที่ใช้ในปฏิกริยา รวมทั้งปริมาณของผงถ่านที่ใช้ในการดูดซับ

2. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในเนื้องอกทั้งชนิก benign, gynaecomastia และเนื้องอกมะเร็งเต้านม รวมทั้งเนื้อเยื่อเต้านมปกติ

3. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมกับภาวะการณ์ต่าง ๆ ทางคลีนิค เช่น อายุของคนไข้ ระยะของโรค และสภาพทางพยาธิ