บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การคัดเลือกสัตว์ป่วยและเก็บตัวอย่าง

ทำการคัดเลือกสุนัขที่เข้ารับการรักษาในคลินิกโรคมะเร็ง โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บรวบรวมข้อมูลจากเวชระเบียนสัตว์ที่เข้ารับการรักษาและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ โดยวิธี punch biopsy และ/หรือ วิธี fine needle aspiration (FNA) จำนวน 23 ตัว ซึ่งเป็นกลุ่มที่รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด Vinblastine sulfate ร่วมกับยา Prednisolone โดยมีขั้นตอนต่างๆดังนี้ คือ

1.1 ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลประวัติ พันธุ์ อายุ ตรวจร่างกายทางกายภาพ เพื่อให้ทราบถึงตำแหน่งเนื้องอก รูปร่าง และการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองตามระบบ TNM system ตามวิธีของ World Health Organization (WHO) เพื่อการประเมินระยะของเนื้องอกทางคลินิก (clinical staging system) (Withrow and McEwen, 1989)

1.2 ทำการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้ การตรวจค่าความสมบูรณ์ของเลือด ได้แก่ การตรวจจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cells; RBCs) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct) จำนวนเกล็ดเลือด (Platelets; PLT) และจำนวนเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell; WBCs) และการตรวจค่าชีวเคมีของไตและตับ ได้แก่ Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine และ Alanine amino transferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) เพื่อประเมินการทำงานของไตและตับ ซึ่งการตรวจทั้งหมดนี้เพื่อประเมินสภาพสัตว์ในระหว่างการรักษาด้วยเคมีบำบัดและการประเมินความเป็นพิษจากยา

1.3 ทำการตรวจ buffy coat smear เพื่อทำการประเมินการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ในกระแสเลือด (mastocytosis)

1.4 ทำการตรวจด้วยวิธีรังสีวินิจฉัย (x-rays) เพื่อประเมินการแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ม้าม

1.5 การเก็บตัวอย่าง

1.5.1 ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจทางเซลล์วิทยา (cytology) โดยวิธี fine needle aspiration (FNA) โดยใช้เข็มเบอร์ 22 G และกระบอกฉีดยา ทำการเจาะและดูดเซลล์เนื้องอก นำมา

ป้ายบนสไลด์ และทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรึงสภาพด้วย absolute methanol นาน 1 นาที แล้วทำการย้อมสี Giemsa และ Toluidine blue

1.5.2 ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) โดยวิธี punch biopsy และรักษสภาพด้วย 10% formalin buffer เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อต่อไป

2. ขั้นตอนการรักษา

ให้การรักษาสุนัขสำหรับสุนัขที่มีค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีคลินิกอยู่ในช่วงปกติ โดยวิธีเคมีบำบัด ด้วยยา Vinblastine sulfate (ONCO-TAIN®, Mayne Pharma , USA) ขนาด 2 มก./ตร.ม. เข้าทางหลอดเลือดดำ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ต่อมาให้ 2 สัปดาห์ต่อ 1 ครั้งเป็นจำนวน 4 ครั้ง สุนัขจะได้รับยา Vinblastine sulfate รวม 8 ครั้ง ร่วมกับการกินยา Prednisolone (Predon®, Thailand) ขนาด 1 มก./กก. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และลดขนาดยาเป็น 0.5 มก./กก. ต่อเนื่อง 8 สัปดาห์ ร่วมกับยาอื่น ๆ ตามอาการทางคลินิก เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาบำรุงเลือด ยาบำรุงตับ หรือยากลุ่ม H2 recepter blocker

3. การศึกษาทางพยาธิวิทยา

3.1 การวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา

นำสไลด์ที่ป้ายตัวอย่างที่ได้จากวิธี FNA ไปตรึงสภาพด้วย absolute methanol นาน 1 นาที จากนั้นจึงนำไปย้อมสี Giemsa และ Toluidine blue โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 การย้อมสี Giemsa โดยการใช้สี Giemsa 10% ที่เตรียมใหม่ หยดลงบนสไลด์ แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาดและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

3.1.2 การย้อมสี Toluidine blue โดยการนำแผ่นสไลด์แช่ในสารละลายสี Toluidine blue pH 3.5 เป็นเวลา 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาดและตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

การตรวจผล โดยพบเซลล์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์รูปร่างกลม นิวเคลียสมีลักษณะกลม ขอบเขตไซโตพลาสมชัดเจน ภายในไซโตพลาสมพบแกรนูลติดสีน้ำเงิน

3.2 การวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา

นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ punch biopsy เก็บรักษาสภาพตัวอย่างชิ้นเนื้อลงใน 10% buffer formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการล้างและผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางฮิสโตเทคนิค ดังนี้ นำชิ้นเนื้อผ่านแอลกอฮอล์ 70% 80% 95% 100% xylene และ พาราฟินเหลว เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อ

ที่อยู่ในบล็อกพาราฟีน จากนั้นนำไปตัดให้มีความหนาประมาณ 3-5 µm และนำสไลด์ที่ได้มาทำการย้อมสี เพื่อวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาและจำแนกเกรดตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป

3.2.1 การย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H&E)

ทำการละลายพาราฟีนออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปย้อมในน้ำยา Mayer's hematoxylin 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปานาน 10 นาที Differentiate ชิ้นเนื้อในน้ำยา 0.25% HCl acid แล้วล้างด้วยน้ำประปานาน 5 นาที นำมาย้อมด้วยสี eosin นาน 4 นาที และล้างด้วยน้ำประปานาน 10 นาที จากนั้นดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็ว โดยใช้แอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

3.2.2 การย้อมสี Toluidine blue (Bancrof and Stevens, 1996)

ทำการละลายพาราฟีนออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% แล้วแช่สไลด์ในสารละลายสี toluidine blue pH 3.87 เป็นเวลา 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด แช่ในสารละลาย acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 2-3 นาที จากนั้น แช่ใน xylene และปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

นำสไลด์ที่ได้จากการย้อมสีมาวินิจฉัย เพื่อจำแนกเกรดและลักษณะจุลพยาธิวิทยาโดยละเอียดตามหลักเกณฑ์ของ Patnaik และคณะ (1984) โดยดูลักษณะขอบเขตเนื้องอก การกระจายตัวไปยังชั้นผิวหนังและชั้นใต้ผิวหนัง รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ ขนาดของเซลล์ รูปร่างของเซลล์ ลักษณะของไซโตพลาสมและแกรนูล รูปร่างของนิวเคลียส ลักษณะโครมาตินภายในนิวเคลียส จำนวนนิวคลิโอลัส ค่าเฉลี่ย mitosis ปริมาณ stroma การเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือด ปริมาณของอิโอซิโนฟิล การบวมน้ำ การเกิดเลือดออก การเกิดเนื้อตาย

4. การตรวจค่าดัชนีงอกขยาย

นำสไลด์ตัวอย่างที่ได้จากชิ้นเนื้อที่การผ่านขั้นตอนทางฮิสโตเทคนิค มาย้อมสีพิเศษเพื่อทำการตรวจดัชนีงอกขยายดังนี้

4.1 ดัชนี AgNORs

ทำการตรวจค่าดัชนี AgNORs โดยวิธีฮิสโตเคมี (Kravis et al., 1996) โดยทำการละลายพาราฟีนออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น รักษาสภาพชิ้นเนื้อบนสไลด์ โดยใช้ Clarke's solution (Ethanol-acetic acid, 3:1) นำไปย้อมในน้ำยา silver nitrate 35 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในห้องมืดและล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยใช้แอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

ตรวจผลค่าดัชนี AgNORs โดยการศึกษาการติดสีในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง นับจำนวน AgNORs ใน นิวคลิโอลัส หรือที่กระจายอยู่ในนิวเคลียส โดยนับจากมาสต์เซลล์จำนวน 100 เซลล์ภายใต้กำลังขยาย x100 ด้วยการสุ่มอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (non randomize sampling) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนจุดต่อเซลล์ (dots/cell)

4.2 ดัชนี PCNA

ทำการตรวจค่าดัชนี PCNA โดยการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีชนิด Avidin-Biotin peroxidase Complex (ABC) (Simoes et al., 1994) โดยการละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น ทำการเผยแอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยวิธีใช้ตู้อบความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 5 นาที ในสารละลาย Tris-EDTA buffer pH 8.0 ทำการ block non-specific endogenous peroxidase ด้วย 3% H_2O_2 ใน absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ทำการ block non-specific binding ด้วย 1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ monoclonal mouse anti-PCNA antibody (ความเข้มข้น 1:200, Dako Corp., Denmark) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 12-14 ช.ม. นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (ความเข้มข้น 1:400, Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำปฏิกิริยา conjugation ด้วย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดสีด้วย 0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6) (Sigma, USA) ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยใช้แอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยนับเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ จำนวน 500 เซลล์ ที่กำลังขยาย X40 (HPF) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการติดสี โดยการเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวกของเนื้องอกเต้านมสุนัข (simple tubular adenocarcinoma)

4.3 ดัชนี Ki-67

ทำการตรวจค่าดัชนี Ki-67 โดยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีชนิด Avidin-Biotin peroxidase Complex (ABC) (Sakai et al., 2002) โดยทำการละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น ทำการเผยแอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยวิธีใช้ตู้อบความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 20 นาที ด้วยสารละลาย citrate buffer pH 6.0 แล้วตามด้วยการใช้ microwave ที่ความร้อนต่ำสุดของระดับ medium-high นาน 5 นาที ทำการ block non-specific endogenous peroxidase ด้วย 3% H_2O_2 ใน

absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ทำการ block non-specific binding ด้วย bovine serum albumin 1% ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ monoclonal mouse anti Ki-67 (clone MIB-I) antibody (ความเข้มข้น 1:50, Immunotech, Westbrook, USA) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 12-14 ชม.นำไปทำปฏิกิริยากับ biotinylated anti-mouse IgG antibody (Dako, Denmark) ความเข้มข้น 1:200 ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที นำมาทำปฏิกิริยา conjugation ด้วย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ทำให้เกิดสีด้วย DAB 0.05% (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6) (Sigma, USA) ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยใช้แอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยนับเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ จำนวน 500 เซลล์ ที่กำลังขยาย X40 (HPF) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการติดสี โดยการเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวกของเนื้องอกเต้านมในคน (mammary solid carcinoma)

5. การตรวจการแสดงออกของโปรตีนต่อต้านยา

P-glycoprotein (PGP) และ Multidrug Resistance associated Protein (MRP)

โดยการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีแบบ Avidin-Biotin peroxidase Complex (ABC) (Miyoshi et al., 2002) ทำการละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อโดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100%, 95%, 80% และ 70% ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น ทำการเผยแอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยวิธีใช้ตู้อบความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 10 นาที ด้วยสารละลาย citrate buffer pH 6.0 ทำการ block non-specific endogenous peroxidase ด้วย 3% H_2O_2 ใน absolute methanol 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการ block non-specific binding ด้วย bovine serum albumin 1% ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 30 นาทีนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ monoclonal mouse anti-PGP antibody ความเข้มข้น 1:150 (C494, DAKO Corp., Denmark) สำหรับการตรวจหา PGP หรือ monoclonal mouse anti-MRP antibody ความเข้มข้น 1:50 (MRPmb, Nichirei Corp., Japan) สำหรับการตรวจหา MRP ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 12- 14 ช.ม.นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (ความเข้มข้น 1:200) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. นาน 30 นาที แล้วนำมาทำปฏิกิริยา conjugation ด้วย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako Corp., Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที ทำให้เกิดสีด้วย DAB 0.05% (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6) (Sigma, USA) ย้อมทับด้วยสี

Mayer's hematoxylin แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยใช้แอลกอฮอล์ 70%, 80%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์

ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง มี 2 แบบ คือโดยนับเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์จำนวน 500 เซลล์ ที่กำลังขยาย X40 (HPF) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการติดสี โดยการเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวกของเนื้อเยื่อไตสุนัขปกติ (renal proximal convoluted tubule) สำหรับการตรวจหา PGP และเนื้อเยื่อต่อมหมวกไตของสุนัขปกติ(adrenal cortical cell) สำหรับการตรวจหา MRP และแบบที่สองคือ ทำการให้คะแนนตามจำนวนเซลล์ที่ติดสี โดยคะแนน 0 คือ ไม่พบเซลล์ที่ติดสี คะแนน 1 คือ พบจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้อยกว่าร้อยละ 10 คะแนน 2 คือพบจำนวนเซลล์ที่ติดสีร้อยละ 10-50 คะแนน 3 คือพบจำนวนเซลล์ที่ติดสีมากกว่าร้อยละ 50 ทำการแปลผลโดยให้คะแนนที่ 2 หรือ 3 ถือว่าให้ผลบวกต่อการแสดงออกของ PGP และ MRP

6. การประเมินผลภายหลังการรักษา

ทำการประเมินผลการตอบสนองต่อการรักษา เมื่อสิ้นสุดการให้การรักษา ประเมินขนาดของเนื้องอกเปรียบเทียบกับก่อนทำการรักษา มีขนาดลดลงหรือไม่ การประเมินผลทางคลินิก และการประเมินความเป็นพิษจากยา โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

6.1 การประเมินผลการตอบสนองต่อการรักษา (evaluating response) (McCaw et al., 1994)

- Complete Response (CR) หมายถึง ไม่พบเนื้องอกในบริเวณที่เคยปรากฏเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังเสร็จสิ้นการรักษาหรือได้รับยาครั้งสุดท้าย
- Partial Response (PR) หมายถึง ยังคงพบก้อนเนื้องอกอยู่ โดยที่ก้อนเนื้องอกนั้นมีปริมาตรลดลงมากกว่าร้อยละ 50 ที่ 4 สัปดาห์ หลังเสร็จสิ้นการรักษาหรือได้รับยาครั้งสุดท้าย
- Stable Disease (SD) หมายถึง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือยังคงพบก้อนเนื้องอกอยู่แต่ก้อนเนื้องอกนั้นมีปริมาตรลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 หรือก้อนเนื้องอกมีขนาดเพิ่มขึ้น น้อยกว่าร้อยละ 25 ซึ่งจะทำการประเมินที่ 4 สัปดาห์ หลังเสร็จสิ้นการรักษาหรือได้รับยาครั้งสุดท้าย
- Progressive Disease (PD) หมายถึง การพบรอยโรคใหม่หรือรอยโรคเดิมมีขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าร้อยละ 25

6.2 การประเมินผลการรักษาทางคลินิก เมื่อสิ้นสุดการให้ยา ได้แก่

- Survival time หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่วินิจฉัยโรคจนกระทั่งสัตว์เสียชีวิต
- Remission duration time หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่สัตว์ตอบสนองต่อการรักษาจนกลับมาเป็นซ้ำ โดยที่ก้อนเนื้องอกมีขนาดมากกว่าร้อยละ 25 ของก้อนเนื้องอกครั้งที่แล้ว
- Time to progression หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มรักษาจนกระทั่งพบรอยโรคใหม่

6.3 การประเมินความเป็นพิษจากยา (drug toxicities)

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อประเมินฤทธิ์ไม่พึงประสงค์และอาการข้างเคียงจากการใช้ยา โดยทำการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBCs) ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hct) ค่าเกล็ดเลือด (PLT) จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ค่าเอนไซม์ตับ ได้แก่ serum alanine amino transferase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) ค่าชีวเคมีที่บ่งชี้การทำงานของไต ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine โดยทำการเก็บตัวอย่างในช่วงก่อนการรักษา และระหว่างการรักษา แบ่งเป็นช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 สัปดาห์ที่ 5-8 สัปดาห์ที่ 9-12 เพื่อทำการเปรียบเทียบกับพารามิเตอร์ต่างๆ (Dhaliwal et al., 2003) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การประเมินความเป็นพิษจากยา (Drug toxicities) (Dhaliwal et al., 2003)

		ภาวะความเป็นพิษ
Hematocrit	≤ 25 %	ภาวะเลือดจาง (anemia)
Erythrocytes count	$\leq 3 \times 10^{6}$ / µl	ภาวะเลือดจาง (anemia)
Leucocytes count	$\leq 5.5 \times 10^{3}$ / µl	ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leucopenia)
Platelets count	$\leq 130 \times 10^{3}$/ µl	ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia)
ALT	≥ 100 U/l	ภาวะการเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxic)
ALP	≥ 150 U/l	ภาวะการเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxic)
BUN	≥ 20 mg%	ภาวะการเป็นพิษต่อไต (nephrotoxic)
Creatinine	≥ 2 mg%	ภาวะการเป็นพิษต่อไต (nephrotoxic)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

7.1 ประเมินข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกได้แก่ พันธุ์ อายุ ตำแหน่งเนื้องอก การตรวจการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง การตรวจการแพร่การจายไปยังกระแสเลือด ระดับทางคลินิก ระดับเกรดทางจุลพยาธิวิทยา และลักษณะรายละเอียดทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอก

7.2 นำข้อมูล ค่าดัชนีงอกขยาย (AgNORs index, PCNA index และ Ki-67 index) และโปรตีนต่อต้านยา (%PGP และ %MRP) ก่อนและหลังการรักษา มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) รายงานผลการแสดงออกของ PGP และ MRP ในรูปร้อยละจากจำนวนสัตว์ป่วยทั้งหมด

7.3 นำข้อมูลผลการรักษาทางคลินิกมาหาค่ามัธยฐานของ survival time, remission duration time และ time to progression ภายหลังการรักษาจนกระทั่งเสร็จสิ้นระยะเวลาโครงการวิจัยหรือจนกระทั่งสุนัขเสียชีวิต

7.4 นำข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกได้แก่ พันธุ์ เพศ อายุ การตรวจการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง การตรวจการแพร่การจายไปยังกระแสเลือด ระดับทางคลินิก ระดับเกรดทางจุลพยาธิวิทยา ผลการตอบสนองต่อการรักษา มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับดัชนีงอกขยายและโปรตีนต่อต้านยาด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรม Minitab™ version 13.32 (Minitab Inc., USA)