จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์
ชนินทร์ กัลล์ประวิทธ์

จฬ
สพ 15
012142

เมษายน ๒๕๔๗

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

โดย

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

ชนินทร์ กัลล์ประวิทธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมษายน 2547

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ที่มีรายนามดังต่อไปนี้

- กองทุน วิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2546 ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้
- ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำวิจัย
- อ. น.สพ. ครรชิต พงษ์เพชร ภาควิชาศัลยศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วย
- หน่วยโรคช่องปาก ภาควิชาศัลยศาสตร์ และ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วย
- คุณ สุประดิษฐ์ หวังในธรรม คุณโสภณ วุทธรา ที่ช่วยเหลืองานทางด้าน ห้องปฏิบัติการ
- สพ.ญ. สิริวลี แซ่โง้ว สพ.ญ. นิภาภรณ์ พัฒนไทยานนท์ และ สพ.ญ. พรทิพา เลิศรัตนชัยกุล ที่ให้ความช่วยเหลืองานห้องปฏิบัติการ
- กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเมลาโนมา
- ผศ. น.สพ. ดร. ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
- น.สพ. สรรพสิริ สิริพรประเสริฐ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะคณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ช่วยติดตามข้อมูลสัตว์ป่วย
- เจ้าของสัตว์ป่วยทุกท่าน ที่ให้ข้อมูลของสัตว์ป่วยที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้
- รวมทั้งสุนัขป่วยด้วยโรคมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากทุกราย ที่อุทิศชิ้นเนื้อตัวอย่าง เพื่อการศึกษา ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มา ณ โอกาส นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ สพ
สพ15
เลขทะเบียน 012142
วัน, เดือน, ปี 10 มี.ค. 2548

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

ชื่อผู้วิจัย อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ และ ชนินทร์ กัลล์ประวิทธ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ เมษายน 2547

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ ของการจำแนกประเภทและปัจจัยทางคลินิก ของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข การแสดงออกของโปรตีน Melan A ค่าดัชนี Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) และค่าดัชนี Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA) เพื่อการพยากรณ์โรค โดยทำการศึกษาข้อมูลย้อนหลังชิ้นเนื้อที่ส่งชันสูตร ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2546 จำนวน 67 ตัวอย่าง การจำแนกลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบชนิด benign melanocytoma ร้อยละ 2.98(2/67) และชนิด malignant melanoma ร้อยละ 97.02 (65/67) ซึ่งแบ่งออกเป็น epithelioid cell type ร้อยละ 47.67(32/67) spindle cell type ร้อยละ 23.88(16/67) และ mixed cell type ร้อยละ 25.73(17/67) ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยดัชนี AgNORs ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา การย้อมติดสี Masson-Fontana Silver(MFS) การแสดงออกของโปรตีน Melan A แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการจำแนกเกรด และปัจจัยทางคลินิก ได้แก่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนเนื้อ ($p<0.05$) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะทางจุลพยาธิ การจำแนกเกรด การย้อมติดสี MFS และการแสดงออกของโปรตีน Melan A แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเพศของสุนัขป่วย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนเนื้อ ($p<0.05$) การแสดงออกของโปรตีน Melan A ตรวจพบในมะเร็งเมลาโนมา ร้อยละ 50.77(33/65) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และปัจจัยทางคลินิก จากการศึกษาครั้งนี้ การแสดงออกของโปรตีน Melan A สามารถจำแนกมะเร็งที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เมลาโนไซต์ ได้ การแสดงออกของโปรตีน Melan A ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA สามารถนำมาใช้ร่วมกันเพื่อการพยากรณ์ความรุนแรงของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขได้

Project Title The Study on Prognostic Values in Canine Oral malignant Melanoma

Name of Investigators Anudep Rungsipipat and Chanin Kulpravidt

Year April, 2004

Abstract

The purpose of this research is to evaluate the relationship of histopathological appearance and clinical data and Melan A protein expression, Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORS) and Proliferative Cell Nuclear Antigen (PCNA) indices of canine oral malignant melanoma. A retrospective study was performed on biopsy specimens of 67 dogs submitted from 2000 to 2003 at Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. A total of 67 melanocytic tumors were histopathological diagnosed into two groups that were benign melanocytoma 2.98%(2/67) and malignant melanoma 97.02%(65/67). Malignant melanoma were pathological classified into three groups that were epithelioid cell type 41.67%(32/67), spindle cell type 23.88%(16/67) and mixed cell type 25.73%(17/67). Our results showed that average AgNORs index did not have significant differences with histopathological characteristics, Masson-Fontana Silver (MFS) stain, Melan A expression but AgNORs index showed significant differences with histological grading and tumor size ($p<0.05$). Average PCNA index did not have significant differences with histopathological characteristics and grading, MFS stain and Melan A protein expression but have significant differences with sex of affected dogs and tumor size ($p<0.05$). The expression of Melan A protein expression was detected in malignant melanoma 50.77%(33/65). The results did not show significant differences with histopathological classification and some clinical data. Upon the study Melan A protein expression is a useful marker for melanocytic derivation diagnosis in dogs. The study indicated that the expression of Melan A, AgNORs and PCNA indices can be used to provide the prognosis of oral malignant melanoma in dogs.

สารบัญ (Table of Contents)

หน้า

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement).....i

บทคัดย่อภาษาไทย (Thai Abstract).....ii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (English Abstract).....iii

สารบัญ (Table of Contents).....iv

รายการตารางประกอบ (List of Tables).....v

รายการภาพประกอบ (List of Figures).....vi

รายการสัญลักษณ์ (List of Symbols).....vii

บทนำ (Introduction).....1

การสำรวจแนวความคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature).....2

วิธีการวิจัย (Procedure).....7

ผลการวิจัย (Result).....15

การอภิปรายผล (Discussion).....34

ข้อสรุป(Conclusion).....40

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for Further Work).....40

เอกสารอ้างอิง (References).....42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ (List of Tables)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางคลินิก (อายุ เพศ พันธุ์) ตำแหน่งก้อนเนื้องอก ขนาดก้อนเนื้องอก ระยะเวลามีชีวิตรอด และสถานภาพภายหลังการรักษา ของสุนัขทดลอง จำนวน 67 ตัว.....21

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่าง ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA ผลการย้อม สี MFS ผลการแสดงออกของโปรตีน Melan A ของมะเร็งเมลาโนมาสุนัขทดลอง จำนวน 67 ตัว.....23

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่าง ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA แยกตามประเภทของมะเร็งเมลาโนมา.....25

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนของตัวอย่างมะเร็งเมลาโนมา จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา.. 26

ตารางที่ 5 แสดงจำนวน ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA จำนวนตัวอย่างของการย้อม Melan A จำแนกตามกลุ่มข้อมูลทางคลินิก.....27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

รูปที่ หน้า

รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดเมลาโนมาที่บริเวณเหงือกด้านบนของสุนัข โดยก้อนมะเร็งมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อสีขาวที่แบ่งออกเป็นหลายพู (multilobulated).....28

รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดเมลาโนมาที่บริเวณเหงือกด้านบนของสุนัข โดยก้อนมะเร็งมีลักษณะเนื้อแน่นสีดำ.....28

รูปที่ 3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ melanocytoma; พบเซลล์มะเร็งเป็นรูปกระสวย เรียงตัวเป็นวงอย่างหนาแน่น และเรียงตัวกันเป็นแนวยาวร่วมด้วย (H&E, bar= 40 μm).....28

รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ epithelioid cell type of malignant melanoma; จะพบเซลล์มะเร็งที่นิวเคลียสมีรูปร่างกลม หรือ รี ขนาดใหญ่เด่นชัด (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 μm) จัดเรียงตัวเป็น lobule หรือ trabeculae และพบนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด (H&E, bar= 20 μm)...28

รูปที่ 5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ spindle cell type of malignant melanoma; พบเซลล์มะเร็งมีนิวเคลียส รูปร่างรี หรือยาว เรียวเป็นรูปกระสวย (H&E, bar= 20 μm).....28

รูปที่ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mixed cell type of malignant melanoma; เซลล์มะเร็งจะประกอบด้วย spindle cell และ epithelioid cell อยู่ร่วมกัน (H&E, bar= 40μm)..... 28

รูปที่ 7 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade I(well differentiated); นิวเคลียสมีรูปร่างกลมจนถึงรีจะไม่พบนิวคลิโอลัส หรือเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว(H&E,bar=10 μm).....30

รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade II (moderately differentiated); มีความ pleomorphic เพิ่มมากขึ้น โดยเซลล์มีรูปร่างกลม จนถึงรี ภายใน 1 เซลล์อาจมี 2 นิวเคลียส พบลักษณะ vesicular nuclei และนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด และจะพบ mitotic cell 0-4 cell/HPF (H&E, bar= 10 μm).....30

รูปที่ 9 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade III(poorly differentiated); เซลล์จะมีรูปร่าง highly pleomorphism ขอบเขตของไซโตพลาสมไม่ชัดเจน รวมทั้งมักพบ binucleated, multinucleated และ giant cell ได้ พบนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด (H&E, bar= 10 μm).....30

รูปที่ 10 แสดงการติดสีดำ ภายในนิวคลิโอลัส หรือกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส ของเซลล์มะเร็งชนิด epithelioid cell ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี AgNORs(หัวลูกศร) (AgNORs stain, bar= 8 μm).....30

รูปที่ หน้า

รูปที่ 11 แสดงการติดสีดำภายในนิวเคลียส และการติดสีแดงภายในไซโตพลาสมของเมลาโนมา ชนิด mixed cell type และการติดสีฟ้าในส่วนที่เป็นเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อมสี Masson's Trichrome (MT stain, bar= 20μm).....30

รูปที่ 12 แสดงการติดสีแดงภายในนิวเคลียส และการติดสีดำของเม็ดสีเมลานินของเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี Masson Fontana Silver (MFS stain, bar= 20 μm)..... 30

รูปที่ 13 แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดเมลาโนมาเข้าไปยังบริเวณที่เป็นส่วนของ epidermis (H&E, bar= 10 μm)..... 32

รูปที่ 14 แสดงลักษณะของ tumor emboli ที่แพร่เข้าไปในหลอดน้ำเหลือง(หัวลูกศร) (H&E, bar= 20 μm).....32

รูปที่ 15 แสดงการติดสีน้ำตาลของส่วนนิวเคลียส ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน PCNA ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm).....32

รูปที่ 16 แสดงการติดสีน้ำตาลของส่วนนิวเคลียส ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน PCNA ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด spindle cell (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm).....32

รูปที่ 17 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell ของคน; ตัวควบคุมบวก (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm).....32

รูปที่ 18 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell ของสุนัข (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm).....32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์ (List of Symbols)

ชม.	: ชั่วโมง
ซม.	: เซนติเมตร
°ซ.	: องศาเซลเซียส
ABC	: Avidin Biotin Complex method
AgNORs	: Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions
BSA	: Bovine Serum albumin
H&E	: Hematoxylin and Eosin
Melan A	: Melan A/ MART-1, melanoma antigen recognized by T-cell 1
MFS	: Masson-Fontana Silver stain
MT	: Masson's Trichrome stain
NORs	: Nucleolar organizer Regions
PBS	: Phosphate buffer saline
PCNA	: Proliferative Cell Nuclear Antigen
w/v	: Weight / Volume
w/w	: Weight / Weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ (Introduction)

สำหรับในสัตว์นั้นสุนัขนับเป็นสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิดกับมนุษย์ มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากการศึกษาข้อมูลของโรคมะเร็งในสัตว์ จะพบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งมะเร็งของผิวหนังสูงเป็นอันดับหนึ่ง เกิดได้กับทั้งสองเพศ (Goldschmidt and Hendrick, 2002) เนื้องอกชนิดเมลาโนมาในสุนัขพบอุบัติการณ์ร้อยละ 6 ของเนื้องอกของผิวหนัง จากรายงานสุนัขในเขตกรุงเทพมหานครพบเนื้องอกชนิดนี้ ร้อยละ 7.1 (Rungsipipat et al., 2003) เนื้องอกเมลาโนมาในสุนัขพบบ่อยที่ผิวหนัง ดวงตา และช่องปาก โดยเฉพาะที่เหงือก เยื่อบุข้างแก้ม เพดาน และริมฝีปาก สุนัขที่ป่วยมีช่วงอายุ 7-14 ปี (Goldschmidt and Hendrick, 2002) เนื้องอกชนิดนี้มีลักษณะเป็นเนื้อแน่น มีหลายสี เช่น แดงชมพู น้ำตาล หรือดำ สามารถเจริญแทรกในเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือไปยังอวัยวะภายในอื่นๆ ได้เร็วภายหลังจากการเกิดโรคไม่นาน (Kenneth et al., 2001)

การทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพ (biological behavior) ของเนื้องอกชนิดเมลาโนมานั้นอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ระยะการเจริญของเนื้องอก (TNM system) ตำแหน่งและระยะเวลาในการขยายตัวของเนื้องอก และระยะเวลาที่เกิดเนื้องอกภายหลังการผ่าตัด แต่ก็อาจจะไม่เพียงพอในการทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพของเนื้องอกได้อย่างแม่นยำ ปัญหาที่พบคือ เซลล์เมลาโนไซต์เจริญมาจากเนื้อเยื่อศัพภะของ neuroectoderm และมีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปร่างต่างๆ ได้แก่ spindle, epithelioid หรือ signet ring cell การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์มะเร็งไปเป็นเซลล์ชนิดที่ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน (amelanotic cell) ทำให้การวินิจฉัยแยกแยะจากเนื้องอกชนิดอื่นๆ เช่น Undifferentiated carcinoma หรือ spindle cell sarcoma ทำได้ยากขึ้น (Oliver and Wolfe, 1992; Koenig et al., 2001)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจแนวคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมามีต้นกำเนิดมาจาก neuroectodermal origin ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (fetal growth) พบอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 4-7 ของโรคมะเร็งทุกชนิด โดยสุนัขที่ป่วยจะมีอายุเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7-14 ปี และมักพบอุบัติการณ์สูงในพันธุ์ Scottish terriers, Boston terriers, Airedales และ Cocker spaniels (Stannard and Pulley, 1990; Goldschmidt and Hendrick, 2002) โดยทั่วไปสุนัขที่มีผิวหนังหรือ mucous membranes สีเข้มจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูง (Carpenter et al., 1980) และสุนัขเพศผู้จะมีแนวโน้มของการเกิดโรคสูงกว่าสุนัขเพศเมีย (Borthwick and Head, 1982; Hoyt and Withrow, 1984) มะเร็งเมลาโนมาพบบ่อยที่ผิวหนัง ดวงตา และช่องปากของสุนัข โดยผิวหนังจะเป็นบริเวณที่พบการเกิดโรคมากที่สุด รองลงมาคือบริเวณภายในช่องปาก ที่เหงือก เยื่อบุกระพุ้งแก้ม เพดานและริมฝีปาก (James et al., 1980; Stannard and Pulley, 1990; Roels et al., 1999) มะเร็งชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นเนื้อแน่น มีหลายสี เช่น แดงชมพู หรือน้ำตาล หรือดำ ลักษณะที่เห็นด้วยตาเปล่าของมะเร็งชนิดเมลาโนมา อาจจะมีขนาดตั้งแต่เป็นเพียงตุ่มสีดำ (black macule) ที่มองเห็นไม่ค่อยเด่นชัด ไปจนถึงเป็นก้อนขนาดใหญ่ ก้อนมะเร็งที่มีการขยายขนาดอย่างรวดเร็ว อาจจะเป็นมะเร็งชนิดที่ไม่มีการสร้างเม็ดสี (amelanotic) หรือมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงเทาหรือสีดำเลยก็ได้ มะเร็งชนิดนี้สามารถทำลายเนื้อกระดูก และมักแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ปอด ต่อมน้ำเหลือง โดยผ่านทางน้ำเหลืองและเลือด และมะเร็งชนิดนี้ยังสามารถเจริญแทรกเข้าไปรอบๆเนื้อเยื่อปกติได้เร็ว และมีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดการแพร่กระจายโรค (metastasis) ได้เร็วหลังจากที่เกิดโรคได้ไม่นาน (James et al., 1980; Hoyt and Withrow, 1984; Robert and Heidi, 1997; Steven, 2000; Kenneth et al., 2001; Catchpole et al., 2002; Goldschmidt and Hendrick, 2002) สาเหตุของการเกิดโรคนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

การวินิจฉัยโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขทางจุลพยาธิวิทยานั้น มีความสับสนกับโรคมะเร็งชนิดอื่นๆได้ เนื่องจากลักษณะทางเซลล์วิทยาของมะเร็งชนิดนี้จะมีความแปรผันมาก และยังมีความคล้ายคลึงกับ carcinomas, sarcomas, lymphoma และ osteogenic tumors (Nakhleh et al.,

1990; Che′nier and Dore′, 1999) อีกด้วย ได้มีรายงานการนำสีฮีสโตเคมีชนิดต่างๆ เช่น วิธีการย้อมสี Masson' s trichrome (MT) วิธีการย้อมสี Masson-Fontana Silver (MFS) (Carpenter et al., 1980; Sheehan and Hrapchak, 1980; Roels et al., 1999; Goldschmidt and Hendrick, 2002; Head et al., 2002) และการย้อมสี AgNORs มาใช้ในการช่วยวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมา ซึ่งวิธีการย้อมสี MT นั้นจะมีประโยชน์ในการช่วยแยกระหว่างมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขชนิด spindle กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดไฟโบรบลาสต์ สำหรับวิธีการย้อมสี MFS นั้นจะช่วยในการวินิจฉัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในเมลาโนมาที่มีการสร้างเม็ดสีน้อย (Sheehan and Hrapchak, 1980; Kravis et al.,1 996; Head et al., 2002)

การแบ่งประเภทของเนื้องอกชนิดเมลาโนมาตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยดูจากตำแหน่งการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ ขนาดก้อนเนื้องอก การเกิดเนื้อตาย ดัชนีการแบ่งตัว และการเจริญแทรกเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงและท่อน้ำเหลือง (Goldschmidt and Hendrick, 2002) พบว่าเนื้องอกเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขมักมีความร้ายแรง การทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพของเนื้องอกชนิดเมลาโนมานั้นอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ระยะการเจริญของเนื้องอก ตำแหน่งและระยะเวลาในการขยายตัวของเนื้องอก และระยะเวลาที่เกิดเนื้องอกภายหลังการผ่าตัด แต่ก็อาจจะไม่เพียงพอในการทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพของเนื้องอกได้อย่างแม่นยำ ปัญหาที่พบคือ เซลล์เมลาโนไซต์เจริญมาจากเนื้อเยื่อคัพภะของ neuroectoderm และมีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปร่างต่างๆ ได้แก่ spindle, epithelioid หรือ signet ring cell การเปลี่ยนแปลงรูปร่งของเซลล์มะเร็งไปเป็นเซลล์ชนิดที่ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน (amelanotic cell) ทำให้การวินิจฉัยแยกแยะจากเนื้องอกชนิดอื่นๆ เช่น Undifferentiated carcinoma หรือ spindle cell sarcoma ทำได้ยากขึ้น (Oliver and Wolfe, 1992; Koenig et al., 2001) ดังนั้นการตรวจหาโปรตีนที่เซลล์เนื้องอกเหล่านั้นแสดงออกจึงเป็นวิธีที่นำมาช่วยในการวินิจฉัย มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน S-100, vimentin และ neuron specific enolase ในมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข พบการแสดงออกในเซลล์มะเร็ง แต่โปรตีนเหล่านี้มีความจำเพาะต่อ

เซลล์เมลาโนไซต์ และเซลล์ชนิดอื่นๆ ของเนื้องอกผิวหนังร่วมด้วย (Sandusky et al., 1985; Berrington et al., 1994; Blessing et al., 1998)

Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) คือ loop ของดีเอ็นเอในนิวคลิโอลัส ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการคัดลอกของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) โดยจะพบมากในระยะ S phase (DNA synthetic phase) และทำให้ตรวจพบเป็นจุดสีดำอยู่ภายในนิวคลิโอลัส ซึ่งเกิดจากการที่ซิลเวอร์ไนเตรตเข้าไปจับกับ Nucleolar Organizer Regions (NORs) ที่อยู่บน acrocentric chromosome โดยมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรง (malignancy) จะมีจำนวนของ AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเนื้องอกชนิดที่ไม่รุนแรง (benign) ดังนั้นค่าดัชนี AgNORs จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและสามารถนำมาใช้วัดระดับความรุนแรงของมะเร็งได้ มีรายงานการศึกษาเข้ามาใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของมะเร็งชนิดต่างๆ ในทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เช่น ovarian carcinoma และ canine mammary tumor ซึ่งทำให้การพยากรณ์โรคมีความแม่นยำมากขึ้น และช่วยในการตัดสินการวางแผนการรักษา (Bostock et al., 1989; Crocker, 1990; Contractor et al., 1991; Derenzini and Ploton, 1991; Derenzini and Trere, 1991; Zusman et al., 1991; Risio and Rossini, 1993; Kravis et al., 1996; Ghazizadeh et al., 1997; Lohr et al., 1997) โดยเนื้องอกชนิดที่มีความร้ายแรง จะมีค่าดัชนี AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง ในเนื้องอกชนิดมาสท์เซลล์พบว่าค่าดัชนี AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์ผกผันกับระยะเวลาที่สุนัขมีชีวิตรอด และพบค่าดัชนี AgNORs สูงขึ้นในเนื้องอกที่เกิดขึ้นอีกภายหลังการรักษาหรือมีการแพร่กระจาย และมีรายงานการศึกษาเข้ามาใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของเนื้องอกชนิดต่างๆในคนและสัตว์ เช่น มะเร็งเต้านม และมะเร็งเมลาโนมา ค่าดัชนี AgNORs มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการเจริญพัฒนาของนิวเคลียส (nuclear grade) และระยะการแพร่กระจายของมะเร็งเมลาโนมาในช่องปาก (Sae-Ngow et al., 2002)

Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) มีมวลโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน และเป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น auxiliary protein ของ DNA polymerase-δ ซึ่งจะช่วยให้มีการสังเคราะห์และซ่อมแซม DNA โดยจะมีการสังเคราะห์ PCNA เพิ่ม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มากขึ้นในระยะ S phase ซึ่งเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (proliferative stage) โดยอาศัยการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PCNA จะใช้เป็น proliferative marker ที่ดีในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดต่างๆ ในปัจจุบันเช่น มะเร็งเต้านม เนื้องอกมาสท์เซลล์ และมะเร็งเมลาโนมา (Reddy et al., 1995; Lohr et al., 1997; Kawahira, 1999; Laprie et al., 2001) โดยพบความแตกจ่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการแสดงออกโปรตีน PCNA ระหว่างเนื้องอกและมะเร็งเมลาโนมา แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างก้อนมะเร็งปฐมภูมิและระยะแพร่กระจายของก้อนมะเร็ง ซึ่งควรต้องใช้การแสดงออกของโปรตีนชนิดอื่นร่วมในการพยากรณ์โรค (Roel et al., 1999)

โปรตีน Melan A (Melan A/ MART 1, melanoma antigen recognized by T-cell 1) เป็นแอนติเจนที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ลิมป์โฟไซต์ (Busam et al., 1998; Ramos-Vara et al., 2002) ได้มีการศึกษาการแสดงออกในเซลล์เมลาโนไซต์ โดยทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเมลาโนมา พบว่ามีการแสดงออกที่จำเพาะและมีความไว ในมะเร็งเมลาโนมา ใน คน สุนัข และ แมว (Bolon et al., 1990; Hofbauer et al., 1998; Laprie at al., 2001) จากรายงานการย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Melan A พบการแสดงออกที่จำเพาะในส่วนไซโตพลาสมของเซลล์เนื้องอกเมลาโนมา และมีความแตกต่างของการแสดงออกในแต่ละกลุ่มเซลล์ตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา มีรายงานการศึกษาการแสดงออกในประเภทต่างๆของเนื้องอกเมลาโนมาในคน พบว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการแยกประเภทของเนื้องอกเมลาโนมาชนิด melanotic nevi จากมะเร็งชนิดเมลาโนมาชนิดอื่นๆ (Berset et al., 2001) โปรตีน Melan A มีประโยชน์ในการแยกประเภทมะเร็งเมลาโนมาในคนได้เป็นอย่างดี (Blessing et al, 1998) สำหรับในสุนัขมีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลาโนมาและก้อนเนื้องอกชนิดเมลาโนมาทั้งแบบมีเม็ดสีและไม่มีเม็ดสีเมลานิน พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มของเนื้องอก (Koenig et al., 2001) โดยพบการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเมลาโนมาในระยะแรก ซึ่งพบการสร้างเม็ดสีเมลานินน้อย (Berrington et al., 1994) Ramos-Vara et al. (2000) รายงานพบการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเนื้องอกเมลาโนมาร้อยละ 89.1 โดยมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอก โดย

ตรวจพบในเซลล์คล้ายเยื่อบุ (epithelioid cell type) มากกว่าชนิดเซลล์รูปกระสวย (spindle cell type) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ (Synder and Paulino, 2002)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อ วินิจฉัยและแบ่งแยกประเภทของมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และศึกษาความสัมพันธ์ประเภทของมะเร็งโดยการจำแนกความรุนแรงจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological characteristics) กับการแสดงออกของโปรตีน Melan A ที่มีความจำเพาะในการเจริญพัฒนาของเซลล์มะเร็งชนิดเมลาโนมาในสุนัข ศึกษาความสัมพันธ์ประเภทของมะเร็งโดยการจำแนกความรุนแรงจากลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา กับ proliferative marker ชนิด AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer region) และ PCNA (proliferating cell nuclear antigen) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์โรคและเป็นข้อมูลประกอบการรักษา ศึกษาความสัมพันธ์ประเภทของมะเร็ง การแสดงออกของโปรตีน Melan A ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA กับข้อมูลทางคลินิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย (Procedure)

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ทำการศึกษาย้อนหลัง (retrospective study) เนื้องอกชนิดเมลาโนมาในช่องปาก ของสุนัขที่เข้ามาตรวจรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์เล็กและรับบริการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อของหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2546 เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้องอกสุนัขที่มารับการรักษาจากโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ทำการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งเมลาโนมา รวมจำนวนทั้งสิ้นไม่ต่ำกว่า 60 ตัวอย่าง โดยรวบรวมข้อมูลอื่นๆ ประกอบ เช่น ลักษณะและขนาดมะเร็งเมื่อตรวจดูด้วยตาเปล่า การแทรกตัวไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง เป็นต้น

เก็บรวบรวมข้อมูลประวัติสัตว์ป่วย อาทิเช่น พันธุ์สัตว์ เพศ อายุ ขนาดก้อนมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงหรือเนื้อเยื่อข้างเคียง ระยะเวลาการเกิดโรค การตรวจวินิจฉัยทางคลินิก และข้อมูลการรักษาเบื้องต้น

ตัวอย่างที่ได้มาเลือกบริเวณที่ไม่มีเนื้อตาย และการตกเลือด แล้วนำมาเก็บรักษาตามขั้นตอน โดยเก็บตัวอย่างในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อไปผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อทางฮิสโตเทคนิคซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ (Silliphant, 1960)

ทำการเก็บรักษา (fixation) โดยตัดชิ้นเนื้อหนาไม่เกิน 0.5 ซม. แช่ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชม. ทำการดึงน้ำออก (dehydration) โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ จากความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ 70%, 95%,95%, 100% และ ไซลีน I ใช้เวลาประมาณ 60 นาทีและ ไซลีน II ประมาณ 60 นาที อินฟิวเตรชั่น (infiltration) โดยใช้พาราฟินที่หลอมเหลว (melted paraffin) ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 40 นาที หลังจากนั้นก็ย้ายไปพาราฟินที่หลอมเหลว I ที่อุณหภูมิ 60°ซ. ประมาณ 40 นาที และย้ายไปสู่พาราฟินที่หลอมเหลว II ที่อุณหภูมิ 60°ซ. ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นนำออกจากตู้อบไปเข้าสู่ขบวนการฝังชิ้นเนื้อ โดยการวางชิ้นเนื้อตัวอย่างในแม่พิมพ์หรือถาด นำมาหั่นให้บางประมาณ 5 ไมครอน ด้วย microtome แล้วจึงทำการเมาต์สไลด์ที่มีเซกชั่น (mounting of section on slides) จากนั้น

ทำสไลด์ให้แห้ง (drying) โดยการนำสไลด์ที่เซกชั่นติดอยู่ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 37°ซ. เมื่อสไลด์แห้งสนิทดีแล้ว จึงนำมาย้อมทางฮิสโตเคมีต่อไป แล้วทำการบันทึกและแปลผลตัวอย่างที่ทำการศึกษาลงในแบบฟอร์มที่จัดทำ โดยแบ่งการศึกษาในครั้งนี้ ออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. การเปรียบเทียบการย้อมสีฮิสโตเคมี เพื่อวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

1.1 ฮีมาท็อกไซลีนและอีโอซิน (Hematoxylin and eosin, H&E)

1.2 แมสซองไตรโครมสเตรน (Masson's Trichrome Stain, MT)

1.3 ฟ่อนตานา-แมสซอง ซิลเวอร์ (Masson-Fontana Silver, MFS)

โดยการย้อมสีฮิสโตเคมีแต่ละชนิดมีรายละเอียดดังนี้

1.1 วิธีการย้อมสี H&E (เวคิน, 2524)

ละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีน I และ II และจุ่มใน 100%, 95%, 80%, 70% แอลกอฮอล์ ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมในสีฮีมาท็อกไซลีน 6 นาทีและล้างออกด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่านสไลด์ตลอดเวลา 5 นาที Differentiate ชิ้นเนื้อในน้ำยาด้วย 0.25% กรดไฮโดรคลอริกในน้ำกลั่น จุ่มเร็วๆ 1 ครั้ง ล้างด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่าน 5 นาที จุ่มในลิเทียมคาร์บอเนต ($LiCO_3$) เร็วๆ 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่าน 5 นาที ย้อมในสีอีโอซิน 45 วินาที จุ่มใน 70% แอลกอฮอล์ จุ่มเร็วๆ 1-2 ครั้ง จุ่มใน 95% แอลกอฮอล์ 2 นาที จุ่มใน 95% แอลกอฮอล์ 2 นาที เพื่อให้ชิ้นเนื้อสะอาด โดยแช่ไซลีน II 5 นาที ไซลีน I 10 นาที ปิดทับชิ้นเนื้อด้วยโคเวอร์กลาส โดยน้ำยาเปอร์เมาต์

1.2 วิธีการย้อมสี MT (Masson's trichrome stain) (Masson, 1929) เพื่อแยกระหว่างมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขชนิด spindle กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด fibroblast

ล้างพาราฟินออกและเอาน้ำออกจากเนื้อเยื่อ จนกระทั่งถึงน้ำกลั่น ถ้าดองเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน ต้องนำสไลด์มามอร์แดนต์ (mordant) ในสารละลายบลูแองโซลูชั่น นาน 1 ชม. ที่ 56°ซ. ล้างในน้ำกลั่น จุ่มสไลด์ในสารละลายไวเกิร์ตไอออนฮีมาท็อกไซลีน (Weigert's Iron Hematoxylin) เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่านสไลด์ตลอดเวลา 10 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปล้างอย่าง

รวดเร็วในน้ำกลั่น จุ่มในน้ำยาไบบริช สคาร์เล็ตแอซิดฟุชชิน (Briebrich Scarlet acid fuschin) เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น จุ่มในน้ำยาฟอสโฟโมลิบดิกฟอสโฟทังสติกแอซิด (Phosphomolybdic Phosphotungstic acid) เป็นเวลา 15 นาที ย้อมสีด้วยอะนิลีนบลู (Aniline blue) นาน 15 นาที ล้างออกอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น จุ่มสไลด์ในกรดอะซีติกนาน 3 นาที ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็ว โดยใช้ 70%, 80%, 95%, 100% แอลกอฮอล์ ตามลำดับ เพื่อทำให้ชิ้นเนื้อสะอาดโดยแช่ในไซลีน ปิดทับชิ้นเนื้อด้วยโคเวอร์กลาส โดยน้ำยาเปอร์เมาต์ เซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี MT จะพบการติดสีดำภายในนิวเคลียส ไซโตพลาสม กล้ามเนื้อ และเซลล์เม็ดเลือดแดง จะติดสีแดง ส่วนเส้นใยคอลลาเจนจะติดสีฟ้า

1.3 วิธีการย้อมสี MFS (Masson, 1928)

ละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในไซลีน และจุ่มใน 100%, 95%, 80%, 70% แอลกอฮอล์ ล้างน้ำกลั่น 5 นาที จุ่มสไลด์ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$ solution) ที่อุณหภูมิ 56°ซ. นาน 1 ชม. เซกชั่นจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นด้วยความรวดเร็ว จุ่มในสารละลายโกลด์คลอไรด์ ($AuCl_2$) นาน 10 นาที ล้างด้วยความรวดเร็วในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 3 ครั้ง จุ่มสไลด์ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($NaHSO_4$) นาน 5 นาที ล้างในน้ำกลั่นด้วยความรวดเร็ว จุ่มสไลด์ในนิวเคลียร์ฟาสต์เรด (Nuclear fast red) นาน 5 นาที ล้างในน้ำกลั่นด้วยความรวดเร็ว เปลี่ยนน้ำกลั่น 2 ครั้ง ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อด้วยความรวดเร็วโดยใช้น้ำยา 70%, 80%, 90%, 100% แอลกอฮอล์ตามลำดับ ทำให้ชิ้นเนื้อให้สะอาดโดยแช่ในไซลีน ปิดทับชิ้นเนื้อด้วยโคเวอร์กลาส โดยน้ำยาเปอร์เมาต์ เซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี MFS จะพบการติดสีแดงภายในนิวเคลียส และเมลานินและ argentaffin cells จะติดสีดำ

2. การตรวจวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อจำแนกประเภท

2.1 ตรวจลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อจำแนกประเภท ตาม Goldschmidt and Hendrick, 2002 ได้แก่

Benign melanoma (melanocytoma)

Malignant melanoma, epithelioid cell type

Malignant melanoma, spindle cell type

Malignant melanoma, mixed type

2.2 ระดับความรุนแรง (histologic malignancy grade) ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระดับได้แก่ grade I (well differentiated), II (moderately differentiated) และ III (poorly differentiated) ทั้งนี้โดยสังเกตรูปร่างลักษณะไซโตพลาสม ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งรวมถึง nuclear differentiation รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ เนื้อตาย การแทรกเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงและอื่นๆ ซึ่งหากลักษณะเซลล์มีลักษณะจำเพาะน้อยเพียงใดก็ยิ่งมีความร้ายแรงขึ้นเท่านั้น

Grade I malignant proliferation ที่จำกัดขอบเขตภายในก้อนเนื้องอก

Grade II malignant proliferation ที่ขยายลงไปยังเนื้อเยื่อโดยรอบ

Grade III มะเร็งแทรกเข้าไปยังหลอดเลือดและท่อน้ำเหลือง

3. การย้อมด้วย proliferative marker ในที่นี้ใช้ AgNORs และ PCNA เพื่อตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

3.1 ค่าตัวนี Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) ในโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข โดยใช้ชุดย้อมอิสโตเคมีสำเร็จรูป AgNORs (Bio-Optica Milano S.p.a., Italy) ศึกษา AgNORs โดยวิธีอิสโตเคมีดังนี้ (Ploton et al., 1986)

ละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อโดยแช่ในไซลีน และจุ่มใน 100%, 95%, 80%, 70% แอลกอฮอล์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 5นาที เมลานิน บลีช (melanin bleach) โดยจุ่มสไลด์ในโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ใน 0.3% กรดซัลฟิวริค 30 นาที ล้างน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที จุ่มสไลด์ใน 1% กรดอ็อกซาลิค 1-2 นาที หรือจนไม่มีสี ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที เช็ดสไลด์ให้แห้ง หยดสาร A (เจลาติน) 44 µl และหยดสาร B (ซิลเวอร์) 56 µl เก็บไว้ในห้องมืด 30 นาที ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง หยดสาร c (สารละลายหยุดปฏิกิริยา; stop solution) จนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง ดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็วโดยใช้ 70%, 80%, 95%, 100% แอลกอฮอล์ตามลำดับ เพื่อให้ชิ้น

เนื้อสะอาดโดยแช่ในไซลีน ปิดทับชิ้นเนื้อด้วยโคเวอร์กลาส โดยน้ำยาเปอร์เมาต์ การแปลผลสีฮีสโตเคมีชนิด AgNORs ทำได้โดยศึกษาการติดสีในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงขาว นับจำนวน AgNORs ในนิวคลิโอลัส หรือที่กระจายอยู่ในนิวเคลียส โดยจะนับจากเมลาโนมาเซลล์จำนวน 200 เซลล์ ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า แสดงค่าออกมาเป็นจำนวนจุดต่อเซลล์ ด้วยการสุ่มตัวอย่างโดยไม่ใช้หลักการความน่าจะเป็นแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling) (Crocker et al., 1989)

3.2 ค่าดัชนี PCNA อาศัยหลักการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) จากเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน โดยใช้ monoclonal mouse anti-PCNA antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ทำการละลายพาราฟินและผ่านขบวนการเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับข้างต้น

- ลดการรบกวนการอ่านผลจาก non-specific endogenous peroxidase binding โดยการใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในเมธานอลบริสุทธิ์ (absolute methanol) นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

- Pretreatment ด้วย microwave method ความร้อนระดับปานกลาง กำลังเครื่อง 700 วัตต์ โดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์

- ลดการรบกวนการอ่านผลจาก non-specific binding อื่นๆ โดยการใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน PBS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที

- หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ monoclonal mouse anti-PCNA antibody ความเข้มข้น 1 ส่วนต่อ PBS 200 ส่วน ลงให้ท่วมชิ้นเนื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 12-14 ชม. ล้างด้วย PBS

- หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody ในขนาดความเข้มข้น 1 ส่วนต่อ PBS 400 ส่วน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ล้างด้วย PBS

- หยดสารละลาย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako®, Denmark) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

- ทำให้เกิดสีโดยการเติมสารละลาย DAB (Sigma, U.S.A.) ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ใน 0.01 M Tris-HCl pH 7.6 ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin

- ตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงขาว โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่า โดยสุ่มนับจากเซลล์มะเร็งจำนวน 500 เซลล์ จำนวน 5 บริเวณรวมกัน โดยเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมที่ให้ผลบวก (เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนู rat) แสดงผลออกมาเป็นร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก

4. การย้อมเพื่อตรวจสอบโปรตีน Melan A อาศัยหลักการย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมี ด้วยวิธี avidin biotin peroxidase complex (ABC) จากเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟิน โดยใช้ monoclonal mouse anti-human Melan A antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ ตัวควบคุมบวกที่ใช้คือ ชิ้นเนื้อมะเร็งในช่องปากชนิดเมลาโนมาของคน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก งานกลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี กรุงเทพฯ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ใน xylene และจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 95 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

- ทำการ pretreatment โดยการนำสไลด์ที่แช่ใน Tris HCl buffer, pH 8.0 เข้าเครื่องอบไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ. นาน 5 นาทีแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- ทำการขจัดเอนไซม์ endogenous peroxidase โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นและสารละลาย PBS

- ทำการ nonspecific background blocking ด้วยการใช้ bovine serum albumin (BSA, Fluka®, Japan) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS

- หยดแอนติบอดีปฐมภูมิ Monoclonal anti-human Melan A antibody (DAKO®, Denmark) ความเข้มข้น 1 ส่วนต่อ PBS 50 ส่วน ลงบนสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°ซ. แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS

- หยดแอนติบอดีทุติยภูมิ Biotinylated rabbit anti-mouse Ig (DAKO®, Denmark) ในอัตราส่วน 1:400 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBS

- นำ avidin-biotin complex peroxidase solution (ABC kit, DAKO®, Denmark) หยดลงบนสไลด์ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีแล้วล้างออกด้วยสารละลาย PBS

- ทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วยน้ำยา DAB (0.05% diaminobenzidinetetrachloride in 0.01 M Tris HCl pH7.6 and 0.03% H_2O_2) นาน 5 นาทีแล้วล้างด้วยสารละลาย PBS ย้อมสีทับ (counter stain) โดยใช้ Mayer's hematoxylin นาน 5 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็วด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแล้วแช่ใน xylene เพื่อทำความสะอาด

- การวัดและวิเคราะห์ผล

แต่ละตัวอย่างจะถูกวัดผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา การแสดงออกของโปรตีน Melan A โดยประเมินการย้อมติดสีตัวรับจำเพาะดังนี้

เกรด - เซลล์ไม่มีการติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี

เกรด + เซลล์มะเร็งมีการติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี

หรือใช้การประเมินแบบ semiquantitative โดยการนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกในชิ้นเนื้อมะเร็งจากพื้นที่ทั้งหมดของชิ้นเนื้อ ยกเว้นบริเวณที่พบเนื้อตาย

เกรด - เซลล์มะเร็งติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีน้อยกว่าร้อยละ10

เกรด + เซลล์มะเร็งติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีน้อยกว่าร้อยละ 30

เกรด ++ เซลล์มะเร็งติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีประมาณร้อยละ 30-70

เกรด +++ เซลล์มะเร็งติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมีมากกว่าร้อยละ 70

5. ประเมินความสัมพันธ์ร่วมระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Melan A กับปัจจัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา proliferative marker ทั้งสองชนิด และปัจจัยอื่นๆ ทางคลินิกโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวิธี chi-square และ Fisher exact test ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและดัชนี AgNORs และ PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข โดยใช้ one way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$ (โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป Minitab)

6. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและอาการทางคลินิกที่ปรากฏของโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากสุนัข

6.1 เก็บรวบรวมข้อมูล จากใบบันทึกประวัติสัตว์ป่วยที่นำมาทำการรักษาที่โรงพยาบาล สัตว์เล็ก และส่งตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อหรือชันสูตรซากที่หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี 2543-2545

6.2 บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะอาการที่ปรากฏทางคลินิก ภาพถ่ายทางรังสีวิทยา ระยะเวลาการเกิดโรค ระยะเวลาการมีชีวิตรอดภายหลังการรักษา และการตายเนื่องจากการสาเหตุของมะเร็งเมลาโนมา และการตายที่ไม่ใช่จากสาเหตุอื่นๆ เช่น อุบัติเหตุ หรือ โรคติดเชื้ออื่นๆ

6.3 สรุปและประเมินผลความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA การแสดงออกของโปรตีน Melan A และข้อมูลที่ปรากฏทางคลินิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย (Result)

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาและผลการย้อมสีฮิสโตเคมี

ผลการศึกษาเนื้องอกชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขจำนวน 67 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็นเนื้องอกเมลาโนมาชนิดที่ไม่รุนแรง (melanocytoma) ร้อยละ 2.98(2/67) (ตารางที่ 1) ซึ่งจัดเป็นชนิด cellular type โดยลักษณะทางจุลพยาธิพบว่าเซลล์เนื้องอกจะเป็นรูปกระสวย (fusiform cells) เรียงตัวกันเป็นวง (whorled arrangement) อยู่กันอย่างหนาแน่น และมักจะมีกลุ่มของเซลล์รูปกระสวยอีกชนิดหนึ่ง (spindle cells) เรียงตัวกันเป็นแนวยาว (longitudinal arrangement) ร่วมอยู่ด้วย โดยจะพบกระจายอยู่ในบริเวณที่มีการบวมน้ำหรือบริเวณที่เกิดเป็นแผลหลุม ไม่พบลักษณะของ cell pleomorphism แต่อาจจะพบเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียส (mitoses) บริเวณที่เกิดเนื้อตายได้ อาจพบเซลล์ melanophages และมักพบเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมาก (รูปที่ 3)

สำหรับมะเร็งชนิดเมลาโนมา (malignant melanoma) พบร้อยละ 97.02(65/67) เซลล์มะเร็งจะพบ นิวคลิโอไลสีชีด ไซโตพลาสมติดสีเทา เม็ดสีเมลานิน (melanin pigment granules) อาจจะมีลักษณะละเอียด คล้ายฝุ่นผง รูปร่างเหมือนเข็ม หรือมีลักษณะหยาบเป็นเม็ดเล็กๆ พบจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียสไม่แน่นอน และพบการแทรกของเซลล์อักเสบบริเวณที่เกิดเนื้อตาย จากข้อมูลการศึกษาครั้งนี้สามารถแบ่งตามชนิดของเซลล์ (Roels et al., 1999) ออกได้เป็น epithelioid type ร้อยละ 47.67(32/67), spindle type ร้อยละ 23.88(16/67) และ mixed type ร้อยละ 25.73(17/67) (ตารางที่ 3) เซลล์มะเร็งชนิด epithelioid type จะมีนิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรี ขนาดใหญ่เด่นชัด (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 μm) จัดเรียงตัวเป็น lobule หรือ trabeculae และมีนิวคลิโอไลที่เด่นชัด (prominent nucleoli) หนึ่งอันหรือหลายอัน (รูปที่ 4) สำหรับชนิด spindle type จะพบนิวเคลียสมีรูปร่างรีหรือยาวเรียวเป็นรูปกระสวย เซลล์มะเร็งมีการจัดเรียงตัวคล้ายคลึงกับมะเร็งชนิด fibrosarcoma (รูปที่ 5) ซึ่งสามารถใช้สีย้อม MT ในการแยกเซลล์มะเร็งเมลาโนมาจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน โดยเซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่ให้ผลบวกต่อการย้อม MT จะพบการติดสีดำภายในนิวเคลียส และพบการติดสี

แดงภายในไซโตพลาสม ส่วนเส้นใยคอลลาเจนจะติดสีฟ้า (รูปที่ 11) ส่วนชนิด mixed type มักจะประกอบด้วยเซลล์มะเร็งชนิด spindle cell และ epithelioid cell ร่วมกัน (รูปที่ 6)

เมื่อแบ่งตามลักษณะเกรดทางจุลพยาธิวิทยา (histologic malignancy grade) ซึ่งพบ 3 ระดับดังนี้ คือ well differentiated (เกรด I) ร้อยละ 15.38(10/65), moderately differentiated (เกรด II) ร้อยละ 55.38(36/65) และ poorly differentiated(เกรด III) ร้อยละ 29.23(19/65) โดยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ well differentiated นั้นจะพบว่าเซลล์มะเร็งเมลาโนมามีการจัดเรียงตัวเป็นแถวหรือกลุ่มเล็กๆ และมีเส้นใยคอลลาเจนแทรกตัวอยู่ระหว่างแถว เซลล์มีลักษณะกลมและมีลักษณะ monomorphic โดยจะมีขอบเขตของไซโตพลาสมชัดเจน ภายในไซโตพลาสมจะพบแกรนูล นิวเคลียสมีรูปร่างกลมจนถึงรีจะไม่พบนิวคลิโอลัสและ mitotic cell (รูปที่ 7) สำหรับ moderately differentiated จะมีจำนวนเมลาโนมาเซลล์เพิ่มมากขึ้น และรูปร่างของเซลล์เริ่มเปลี่ยนแปลงไป คือมีความเป็น pleomorphic เพิ่มมากขึ้นโดยเซลล์มีรูปร่างกลมจนถึงรี ภายใน 1 เซลล์อาจจะมี 2 นิวเคลียส พบลักษณะ vesicular nuclei และนิวคลิโอลัสเด่นชัด สังเกตพบ fibrovascular stroma และจะพบ mitotic cell 0-4 cell/HPF (รูปที่ 8) ส่วนใน poorly differentiated เมลาโนมาเซลล์จะมีรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิมมาก (highly pleomorphism) พบเซลล์ที่มีรูปร่างกลมรีหรือรูปกระสวย เรียงตัวอัดแน่น ขอบเขตของไซโตพลาสมไม่ชัดเจน และมักไม่พบแกรนูลภายในไซโตพลาสมรวมทั้งมักพบ binucleated, multinucleated และ giant cell ได้ พบนิวคลิโอลัสเด่นชัด (รูปที่ 9) เซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่ให้ผลบวกต่อการย้อม MFS จะพบการติดสีแดงภายในนิวเคลียส ส่วนเมลานินและ argentaffin cells จะติดสีดำ (รูปที่ 12) ซึ่งผลการย้อมสีพิเศษแมสซองฟอนตานา (MFS) ให้ผลบวกในเมลาโนมา โดยแบ่งคะแนนการติดสีเป็น ระดับน้อย (+1) ระดับปานกลาง (+2) และระดับมาก (+3) โดยมะเร็งเมลาโนมาชนิด epithelioid type มีจำนวนร้อยละ 40.63(13/32), 25(8/32) และ 34.38(11/32), ชนิด spindle type มีจำนวนร้อยละ 25(4/16), 37.50(6/16) และ 37.50(6/16) และชนิด mixed type มีจำนวนร้อยละ 29.41(5/17), 35.29(6/17) และ 35.29(6/17) ตามลำดับ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้มี 2 รูปแบบ คือ การแทรกตัวขึ้นไปบนชั้น

epidermis (รูปที่ 13) และการแพร่กระจายเข้าไปยังหลอดน้ำเหลืองและต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง(รูปที่ 14) โดยพบว่าส่วนใหญ่ของมะเร็งเมลาโนมาเป็นชนิดที่มีการแทรกตัวไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง

การย้อมติดสีของ AgNORs จะมองเห็นเป็นจุดสีดำ ซึ่งพบอยู่ในนิวคลิโอลัสหรือกระจายอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเมลาโนมา (รูปที่ 10) ค่าดัชนี AgNORs เฉลี่ย 1.371±0.360 สำหรับค่าดัชนี AgNORs ในแต่ละชนิดของมะเร็งชนิดเมลาโนมา โดยมีค่าเท่ากับ 1.429±0.357, 1.234±0.289 และ 1.392±0.410 ในกลุ่ม epithelioid, spindle และ mixed type ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.202) มีค่าดัชนี AgNORs ในกลุ่ม well, moderately และ poorly differentiated เท่ากับ 1.175±0.278, 1.457±0.381 และ 1.312±0.285 ตามลำดับ พบว่าทั้ง 3 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.061) (ตารางที่ 3) ค่าดัชนี AgNORs ในแต่ละกลุ่มระดับน้อย (+1) ระดับปานกลาง (+2) และระดับมาก (+3) คือ 1.452±0.0389, 1.285±0.260 และ 1.312±0.401 ตามลำดับ พบว่าดัชนี AgNORs ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.326) (ตารางที่ 3)

การย้อม proliferative cell nuclear antigen หรือ PCNA ด้วยวิธีอิมมูนโนฮิสโตเคมี พบว่ามีการย้อมติดสีที่ชัดเจนภายในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งชนิดเมลาโนมา สำหรับในเซลล์มะเร็งที่กำลังแบ่งตัวจะพบการติดสีจางๆ ได้ในไซโตพลาสม (รูปที่ 15 และ 16) ค่าเฉลี่ยดัชนี PCNA ของตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ คือ 66.73±25.90 การจำแนกมะเร็งเมลาโนมาตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา คือ melanocytoma เท่ากับ 6.42±9.03, epithelioid type เท่ากับ 70.20±23.49, spindle type เท่ากับ 59.13±32.18 และ mixed type เท่ากับ 67.38±23.71 พบว่าดัชนี PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.381) (ตารางที่ 3) ค่าดัชนี PCNA ในกลุ่ม well, moderately และ poorly differentiated เท่ากับ 63.46±33.79, 68.49±23.26 และ 65.12±27.36 ตามลำดับ พบว่าทั้ง 3 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.823) (ตารางที่ 3) ค่าดัชนี PCNA ในแต่ละกลุ่มที่ย้อมติดสี MFS คือ ระดับน้อย (+1) ระดับปานกลาง (+2) และระดับมาก (+3) มีค่า 72.59±23.04, 65.10±25.76 และ 62.56±28.59 ตาม

ลำดับ พบว่าดัชนี PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.413) (ตารางที่ 3)

ลักษณะการแสดงออกของโปรตีน melan A ด้วยเทคนิคอิมมูนโนฮิสโตเคมี พบว่าเซลล์มะเร็งเมลาโนมาของสุนัข ให้ผลบวกติดสีเหลืองน้ำตาลจนถึงน้ำตาลภายในไซโตพลาสมของเซลล์ โดยพบว่ามีระดับความเข้มของการติดสีที่ใกล้เคียงกับชิ้นเนื้อมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากของคน ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก (รูปที่ 17 และ 18) จากผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวก มีจำนวนร้อยละ 50.77(33/65) ผลลบจำนวนร้อยละ 49.23(32/65) โดยตัวอย่าง melanocytoma ให้ผลลบทั้งสองตัวอย่าง เมื่อทำการจำแนกตามระดับการให้ผลบวก จาก +1, +2 และ +3 พบว่าร้อยละ 9.23(6/65), 12.31(8/65) และ 29.23(19/65) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อทำการจำแนกลักษณะมะเร็งทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกในกลุ่ม epithelioid type ร้อยละ 41.54(27/65), spindle type 12.30(8/65) และ mixed type ร้อยละ 13.85(9/65) (ตารางที่ 5) ค่าดัชนี AgNORs เฉลี่ยในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อโปรตีน Melan A คือ 1.320±0.352 และในกลุ่มที่ให้ผลบวก คือ 1.420±0.367 พบว่าค่าดัชนี AgNORs ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.489) (ตารางที่ 4) ค่าดัชนี PCNA เฉลี่ยในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อโปรตีน Melan A คือ 62.63±30.15 และในกลุ่มที่ให้ผลบวก คือ 70.71±20.70 พบว่าค่าดัชนี PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.211) (ตารางที่ 3)

ผลทางคลินิก

พบอุบัติการณ์ในสุนัขพันธุ์ผสมร้อยละ 43.08(28/64) และพันธุ์แท้ร้อยละ 56.92(37/64) (Chow-chow 19.44%(7/36), Poodle 13.89%(5/36), Rottweiler 11.11%(4/36), German shepherd 8.33%(3/36), Basset hound 5.56%(2/36), Cocker spaniel 5.56%(2/36), Doberman 5.56%(2/36), Shi Tzu 5.56%(2/36), Dachshund 2.78%(1/36), St. Bernard 2.78%(1/36), Yorkshire terrier 2.78%(1/36), Pug 2.78%(1/36), Miniature 2.78%(1/36), Golden Retriever 2.78%(1/36), Boxer 2.78%(1/36), Bull dog 2.78%(1/36) และ Labrador 2.78%(1/36) (ตารางที่ 1 และ 2) ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA ใน

กลุ่มสุนัขพันธุ์แท้ คือ 1.365±0.351 และ 64.41±27.02 และในกลุ่มพันธุ์ผสม คือ 1.374±0.383 และ 69.47±25.05 พบว่าค่าดัชนี AgNORs และ PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p-0.917, p-0.446) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มพันธุ์แท้ ร้อยละ 51.35(17/37) และในกลุ่มพันธุ์ผสม ร้อยละ 50(14/28)

ผลการศึกษามะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขจำนวน 65 ตัวอย่าง พบว่าสุนัขมีอายุโดยเฉลี่ย 9.59±3.17 ปี โดยอาจพบได้ตั้งแต่อายุ 2-20 ปี ค่ามัธยฐาน และค่าฐานนิยมของช่วงอายุสุนัข คือ 10 ปี เมื่อแบ่งตามกลุ่มอายุ พบว่าในสุนัขกลุ่มอายุน้อยกว่า 10 ปี พบมะเร็งชนิดเมลาโนมาร้อยละ 67.69(44/65) และกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 10 ปี พบร้อยละ 32.30(21/65) ค่าดัชนี AgNORs เท่ากับ 1.365±0.358 และ 1.384±0.372 ตามลำดับ ค่าดัชนี PCNA เท่ากับ 64.67±26.30 และ 77.06±25.11 พบว่าค่าดัชนี AgNORs และ PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มอายุไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.545 และ p=0.325) (ตารางที่ 2) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี จำนวนร้อยละ 40.91(18/44) และในกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 10 ปี ร้อยละ 71.43(15/21)

พบความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยเป็นเพศผู้ร้อยละ 76.56(49/64) เพศเมียร้อยละ 23.44(15/64) (ตารางที่ 5) ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA ในกลุ่มสุนัขเพศผู้ คือ 1.382±0.325 และ 71.32±21.87 และในกลุ่มเพศเมีย คือ 1.336±0.396 และ 51.45±32.69 พบว่าค่าดัชนี AgNORs ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 2 กลุ่มเพศไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.668) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.008) ของค่าดัชนี PCNA ของกลุ่มเพศ (ตารางที่ 2) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ในกลุ่มเพศผู้ จำนวนร้อยละ 51.02(25/49) และในกลุ่มเพศเมีย ร้อยละ 46.67(7/15)

สำหรับตำแหน่งของการเกิดมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขที่พบมากที่สุดคือ บริเวณเหงือกและขากรรไกรร้อยละ 42.62(26/61) (รูปที่ 1 และ 2) กระพุ้งแก้มและช่องปากร้อยละ 2.95(14/61) ส่วนที่โคนลิ้น ริมฝีปาก เพดานปาก คอหอย และช่องจมูก คิดเป็นร้อยละ 14.75(9/61),

8.20(5/61), 8.20(5/61), 1.64(1/61) และ 1.64(1/61) ตามลำดับ และก้อนเนื้อมีขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ตั้งแต่ 0.5-12.5 ซม. โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 5.37±2.98 ซม. ค่ามัธยฐาน และค่าฐานนิยมของก้อนเนื้อ 5 ซม. เมื่อทำการแบ่งตามขนาดของก้อนมะเร็งตาม TNM system (Withrow and MacEwen, 1989) สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ขนาดเล็กกว่า 2 ซม. ร้อยละ 10.34(6/58) ขนาดระหว่าง 2 ถึง 4 ซม. ร้อยละ 24.14(14/58) และขนาดใหญ่กว่า 4 ซม. ร้อยละ 65.52(38/58) (ตารางที่ 1) ค่าดัชนี AgNORs ในแต่ละกลุ่มคือ 1.170±0.238, 1.588±0.405 และ 1.366±0.246 ตามลำดับ ค่าดัชนี PCNA ในแต่ละกลุ่มคือ 44.87±39.41, 81.51±10.49 และ 68.12±23.33 พบว่าค่าดัชนี AgNORs และ PCNA ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p=0.039, p=0.007) (ตารางที่ 2) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโปรตีน Melan A ของกลุ่มมะเร็งที่มีขนาดน้อยกว่า 2 ซม. จำนวนร้อยละ 50.00(3/6) กลุ่มมะเร็งที่มีขนาด 2-4 ซม. จำนวนร้อยละ 35.71(5/14) และกลุ่มมะเร็งที่มีขนาดมากกว่า 4 ซม. จำนวนร้อยละ 59.89(22/38)

เนื่องจากข้อมูลทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับช่วงเวลาของการมีชีวิตรอด (survival time) นั้นมีไม่เพียงพอ ซึ่งอาจจะเกิดจากการจัดเก็บประวัติสัตว์ป่วยไม่ดีและการกรอกรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลประวัติสัตว์ป่วยไม่ครบถ้วน จึงไม่สามารถสรุประยะเวลาการมีชีวิตรอดของสุนัขได้ ข้อมูลที่รวบรวมได้จำนวน 44 ราย พบว่าสุนัขเสียชีวิตร้อยละ 97.73(43/44) และมีชีวิตรอดร้อยละ 2.27(1/44) แต่พบการงอกขยายของก้อนเนื้ออยู่ พบว่ามีจำนวนตัวอย่างร้อยละ 39.53(17/43) ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมโปรตีน Melan A ช่วงเวลาของการมีชีวิตรอดจากการศึกษาในครั้งนี้อยู่ในช่วง 7-537 วัน โดยมีค่าเฉลี่ย 93.62±123.73 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน แต่จากข้อมูลที่มีอยู่พบว่าสุนัขที่เป็นเมลาโนมาชนิด epithelioid type มีช่วงเวลาการรอดชีวิต โดยเฉลี่ยคือ 142.77±142.46 วัน ค่ามัธยฐาน 79 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน ส่วน spindle type มีช่วงเวลาการรอดชีวิต โดยเฉลี่ยคือ 122.89±121.69 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 60 วัน และ mixed type มีช่วงเวลาการรอดชีวิตโดยเฉลี่ย 105.90±97.07 วัน ค่ามัธยฐาน 90 วัน และค่าฐานนิยม 30 วัน โดยในทุกกลุ่มให้ผลบวกต่อ การย้อม Melan A จำนวนร้อยละ 66.67(24/36)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางคลินิก (อายุ เพศ พันธุ์) ตำแหน่งก้อนเนื้องอก ขนาดก้อนเนื้องอก ระยะเวลามีชีวิต และสถานภาพภายหลังการรักษา ของสุนัข จำนวน 67 ตัว

หมายเลขตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	พันธุ์	ตำแหน่งก้อนเนื้องอก	ขนาด เนื้องอก(ซม)	ระยะเวลามีชีวิต(วัน) (Survival time)	สถานภาพ
1. 4A (D9718)	10	ผู้	ผสม	เหงือก	6.0	30	ตาย
2. 5A (D8047)	10	ผู้	แท้ (Chow chow)	เหงือก	5.0	30	ตาย
3. 1A (D8022)	8	ผู้	แท้(Terrier)	ช่องปาก	7.5	150	ตาย
4. 3A (D7825)	7	ผู้	ผสม	เหงือก	2.5	410	ตาย
5. 16A (D9031)	9	ผู้	แท้ (Dutch shund)	ริมฝีปากล่าง	1.7	60	ตาย
6. 18A (D5898)	10	ผู้	ผสม	เหงือก	MD	MD	MD
7. 20A(2D029)	7	ผู้	แท้ (Doberman)	เหงือกด้านซ้าย	10.0	MD	MD
8. 21A(1D1005)	8	ผู้	ผสม	เหงือกด้านซ้าย	5.0	MD	MD
9. 22A (1D941)	11	ผู้	แท้ (Basset hound)	ช่องปาก	5.0	60	ตาย
10. 24A(D6887)	7	ผู้	แท้ (Miniature)	ขากรรไกรล่าง	12.0	60	ตาย
11. 28A(D9522)	20	ผู้	ผสม	ขากรรไกรบนขวา	1.5	MD	MD
12. 29A(1D548)	10	เมีย	ผสม	ช่องปาก	4.0	51	ตาย
13. 31A(D8944)	7	ผู้	ผสม	โคนลิ้น	4.0	240	ตาย
14. 34A(D1088)	10	ผู้	แท้ (German shepherd)	ช่องปาก	12.5	180	ตาย
15. 41A(2D183)	11	ผู้	แท้ (Poodle)	เหงือก	7.5	MD	MD
16. 46A(1D826)	11	เมีย	แท้ (Poodle)	ขากรรไกรล่าง ต่อมน้ำลาย	5.0	145	ตาย
17. 6A(D9567)	4	เมีย	ผสม	ริมฝีปากล่าง	0.5	MD	ตาย
18. 10A(D9503)	7	ผู้	แท้ (German shepherd)	เพดานอ่อน	10.0	21	ตาย
19. 13A(D9414)	7	ผู้	ผสม	โคนลิ้น	MD	MD	MD
20. 14A(1D056)	10	ผู้	ผสม	ช่องปาก	2.5	MD	ตาย
21. 27A(1D638)	8	เมีย	ผสม	ฟันกรามบนขวา	1.0	395	ตาย
22. 32A(1D678)	10	ผู้	แท้ (Rottweiller)	ช่องปากซ้าย	10.0	14	ตาย
23. 35A(2D008)	11	เมีย	แท้ (Rottweiller)	เหงือก	MD	MD	MD
24. 44A(1D175)	12	เมีย	แท้ (Chow chow)	โคนลิ้น	MD	109	ตาย
25. 47A(1D893)	4	ผู้	แท้ (St. Bernard)	ช่องปาก	5.0	63	ตาย
26. 2A(1D016)	8	ผู้	แท้ (Chow chow)	เหงือกขวา	5.0	MD	MD
27. 8A(D8217)	7	เมีย	แท้ (Chow chow)	โคนลิ้น	8.0	30	ตาย
28. 11A(D9707)	8	เมีย	แท้ (Chow chow)	โคนลิ้น	6.0	270	ตาย
29. 12A(1D474)	11	เมีย	ผสม	ขากรรไกรล่างขวา	MD	MD	MD
30. 25A(1D138)	15	ผู้	แท้ (Cocker spaniel)	ช่องปาก	10.0	MD	MD
31. 26A(D6869)	15	เมีย	ผสม	ริมฝีปากล่าง	5.0	90	ตาย
32. 30A(D6815)	7	ผู้	แท้ (Pug)	เหงือก	MD	30	ตาย
33. 39A(1D953)	10	ผู้	ผสม	โคนลิ้น	6.0	231	ตาย

หมายเลขตัวอย่าง	อายุ (ปี)	เพศ	พันธุ์	ตำแหน่งก้อนเนื้องอก	ขนาดเนื้องอก(ซม)	ระยะเวลามีชีวิต(วัน) (Survival time)	สถานภาพ
34. 40A(2D102)	10	ผู้	ผสม	โคนลิ้น	5.0	90	ตาย
35. 42A(2D100)	12	ผู้	ผสม	ขากรรไกรบนซ้าย	5.0	92	ตาย
36. 41(2D057)	MD	ผู้	แท้ (Chow chow)	คอหอย	12 .0	MD	MD
37. 42(D100)	12	ผู้	ผสม	เหงือก	5.0	MD	MD
38. 43(2D102)	10	ผู้	ผสม	โคนลิ้น	5.0	MD	MD
39. 44(2D183)	11	เมีย	แท้ (Poodle)	MD	7.0	MD	MD
40. 45(2D222)	7	เมีย	แท้(Chow chow)	โคนลิ้น	5 .0	MD	ตาย
41. 46 (2D234)	10	ผู้	แท้(Labrador retriever)	ขากรรไกรล่าง	5.0	214	ตาย
42. 47(2D240)	10	เมีย	ผสม	ริมฝีปากบน	5.0	9	MD
43. 48(2D265)	2	ผู้	ผสม	เหงือก	2.5	MD	MD
44. 49(2D317)	12	ผู้	ผสม	ริมฝีปากบน	5.0	MD	ตาย
45. 50(2D621)	10	ผู้	ผสม	ช่องปาก ต่อมน้ำเหลือง	2.0	15	ตาย
46. 51(2D657)	18	ผู้	ผสม	ขากรรไกรล่างซ้าย	5.0	28	ตาย
47. 52(2D711)	11	ผู้	ผสม	เพดานปาก	2.5	180	ตาย
48. 53(2D740)	12	ผู้	แท้(Basset hound)	MD	5.0	75	ตาย
49. 54(2D743)	9	ผู้	แท้ (Rottweiller)	ขากรรไกรล่าง	5.0	159	MD
50. 55(2D878)	17	ผู้	ผสม	ขากรรไกรบน	8.0	MD	ตาย
51 56(2D922)	10	ผู้	ผสม	MD	3.0	7	ตาย
52. 57(2D979)	11	ผู้	ผสม	MD	5.0	210	ตาย
53. 58(2D997)	8	ผู้	แท้(Bull dog)	เหงือกซ้าย	4.0	MD	MD
54. 59(3D148)	8	ผู้	แท้(Boxer)	เหงือก	3.0	537	มีชีวิต
55. 60(3D166)	6	ผู้	แท้(Rottweiller)	ช่องปาก	1.0	MD	MD
56. 61(3D198)	8	เมีย	แท้(Shih tzu)	ช่องปาก	3.0	MD	ตาย
57. 62(3D219)	12	ผู้	แท้ (Golden retriever)	ฟันกรามซี่ที่ 1	6.0	41	ตาย
58. 63(3D320)	MD	ผู้	แท้ (Shih tzu)	ช่องปาก	10.0	MD	MD
59. 64(3D345)	13	ผู้	แท้(Cocker spaniel)	ช่องปาก	5.0	MD	ตาย
60. 65(3D373)	7	ผู้	แท้(Doberman)	ช่องปากขวา	3.0	7	ตาย
61. 66(3D400)	13	ผู้	ผสม	MD	7.0	MD	MD
62. 67(3D430)	10	ผู้	MD	MD	MD	MD	ตาย
63. 68(3D530)	8	ผู้	แท้(Poodle)	เพดานแข็ง	5.0	150	ตาย
64. 69(3D561)	5	ผู้	แท้(Chow chow)	เพดานแข็ง	12.0	MD	MD
65. 70(3D586)	10	ผู้	ผสม	ขากรรไกรบน	1.5	79	ตาย
66. 71(3D638)	10	ผู้	แท้ (German shepherd)	โพรงจมูก	4.0	MD	MD
67. 72(3D673)	8	เมีย	แท้ (Poodle)	ช่องปาก	3.0	90	ตาย

MD: ไม่มีข้อมูลคิบ สถานภาพ ตาย หมายถึง การตายของสุนัขที่เป็นผลมาจากมะเร็งเมลาโนมาในช่องปาก

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตัวอย่าง ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA ผลการย้อม สี MFS ผลการแสดงออกของโปรตีน Melan A ของมะเร็งเมลาโนมาในสุนัข จำนวน 67 ตัว

หมายเลขตัวอย่าง	จุลพยาธิวินิจฉัย (histopathological type)	เกรด (histologic grade)	สีย้อม Masson Fontana (MFS stain)	ดัชนี AgNORs (/ ต่อ เซลล์)	ดัชนี PCNA (ร้อยละ)	ผลย้อม Melan A
1. 4A(D9718)	Melanocytoma	I	ผลบวก +3	1.020	0.03	ผลลบ
2. 5A(D8047)	Melanocytoma	I	ผลบวก +3	1.036	12.80	ผลลบ
3. 1A(D8022)	Epithelioid	II	ผลบวก +1	1.052	81.00	ผลลบ
4. 3A(D7825)	Epithelioid	I	ผลบวก +1	1.010	94.60	ผลลบ
5. 16A(D9031)	Epithelioid	III	ผลบวก +3	1.100	18.20	ผลบวก +3
6. 18A(D5898)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.070	19.20	ผลลบ
7. 20A(2D029)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.104	81.80	ผลบวก +3
8. 21A(1D1005)	Epithelioid	II	ผลบวก +1	1.040	57.40	ผลลบ
9. 22A(1D941)	Epithelioid	III	ผลบวก +2	1.090	64.60	ผลลบ
10. 24A(D6887)	Epithelioid	II	ผลบวก +1	1.022	39.80	ผลบวก +1
11. 28A(D9522)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.050	80.00	ผลบวก +3
12. 29A(1D548)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.116	80.40	ผลลบ
13. 31A(D8944)	Epithelioid	I	ผลบวก +3	1.056	81.80	ผลลบ
14. 34A(D1088)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.244	18.00	ผลลบ
15. 41A(2D183)	Epithelioid	III	ผลบวก +2	1.146	17.00	ผลบวก +2
16. 46A(1D826)	Epithelioid	II	ผลบวก +2	1.078	66.20	ผลบวก +1
17. 6A(D9567)	Spindle	I	ผลบวก +3	1.118	8.00	ผลลบ
18. 10A(D9503)	Spindle	II	ผลบวก +3	1.078	75.40	ผลบวก +3
19. 13A(D9414)	Spindle	I	ผลบวก +3	1.040	59.00	ผลบวก +3
20. 14A(1D056)	Spindle	I	ผลบวก +3	1.026	73.20	ผลบวก +1
21. 27A(1D638)	Spindle	I	ผลบวก +3	1.020	2.00	ผลลบ
22. 32A(1D678)	Spindle	II	ผลบวก +2	1.040	34.20	ผลลบ
23. 35A(2D008)	Spindle	II	ผลบวก +2	1.004	3.00	ผลลบ
24. 44A(1D175)	Spindle	II	ผลบวก +2	1.100	87.80	ผลลบ
25. 47A(1D893)	Spindle	II	ผลบวก +2	1.024	83.60	ผลลบ
26. 2A(1D016)	Mixed	II	ผลบวก +3	1.112	74.40	ผลบวก +3
27. 8A(D8217)	Mixed	III	ผลบวก +3	1.134	77.60	ผลลบ
28. 11A(D9707)	Mixed	II	ผลบวก +3	1.112	2.00	ผลลบ
29. 12A(1D474)	Mixed	III	ผลบวก +2	1.106	51.40	ผลบวก +3
30. 25A(1D138)	Mixed	III	ผลบวก +1	1.064	60.40	ผลลบ
31. 26A(D6869)	Mixed	II	ผลบวก +2	1.048	52.40	ผลบวก +3
32. 30A(D6815)	Mixed	II	ผลบวก +3	1.150	44.40	ผลลบ

หมายเลขตัวอย่าง	จุลพยาธิวินิจฉัย (histopathological type)	เกรด (histologic grade)	สีย้อม Masson Fontana (MFS stain)	ค่านี AgNORs (/ ค่อ เซลล์)	ค่านี PCNA (ร้อยละ)	ผลย้อม Melan A
33. 39A(1D953)	Mixed	III	ผลบวก +2	1.118	69.00	ผลลบ
34. 40A(2D102)	Mixed	III	ผลบวก +1	1.034	86.40	ผลลบ
35. 42A(2D100)	Mixed	III	ผลบวก +2	1.034	92.00	ผลบวก +3
36. 41(2D057)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.990	53.20	ผลลบ
37. 42(D100)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	2.300	86.40	ผลบวก +3
38. 43(2D102)	Epithelioid	II	ผลบวก +2	1.740	78.20	ผลบวก +2
39. 44(2D183)	Mixed	II	ผลบวก +2	1.550	86.20	ผลบวก +2
40. 45(2D222)	Mixed	II	ผลบวก +1	2.050	57.60	ผลบวก +3
41. 46(2D234)	Spindle	II	ผลบวก +1	1.675	92.40	ผลลบ
42. 47(2D240)	Mixed	II	ผลบวก +2	1.590	46.60	ผลบวก +3
43. 48(2D265)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.625	72.20	ผลลบ
44. 49(2D317)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.515	71.80	ผลบวก +2
45. 50(2D621)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.580	80.60	ผลบวก +2
46. 51(2D657)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.820	91.10	ผลบวก +1
47. 52(2D711)	Epithelioid	I	ผลบวก +1	1.920	89.40	ผลลบ
48. 53(2D740)	Epithelioid	III	ผลบวก +1	1.520	92.60	ผลบวก +1
49. 54(2D743)	Spindle	II	ผลบวก +2	1.475	47.40	ผลบวก +3
50. 55(2D878)	Epithelioid	III	ผลบวก +2	1.560	74.80	ผลบวก +2
51 56(2D922)	Mixed	III	ผลบวก +1	2.130	86.00	ผลลบ
52. 57(2D979)	Mixed	II	ผลบวก +1	1.485	95.60	ผลลบ
53. 58(2D997)	Mixed	II	ผลบวก +3	1.830	74.60	ผลบวก +3
54. 59(3D148)	Epithelioid	II	ผลบวก +1	1.885	68.40	ผลลบ
55. 60(3D166)	Spindle	I	ผลบวก +1	1.080	87.00	ผลบวก +3
56. 61(3D198)	Mixed	II	ผลบวก +3	2.115	88.80	ผลบวก +3
57. 62(3D219)	Spindle	I	ผลบวก +3	1.150	51.20	ผลบวก +2
58. 63(3D320)	Spindle	I	ผลบวก +2	1.330	88.40	ผลบวก +1
59. 64(3D345)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.850	86.80	ผลบวก +2
60. 65(3D373)	Epithelioid	III	ผลบวก +3	1.380	92.40	ผลลบ
61. 66(3D400)	Spindle	II	ผลบวก +1	1.680	91.60	ผลบวก +3
62. 67(3D430)	Epithelioid	II	ผลบวก +1	1.530	74.00	ผลบวก +3
63. 68(3D530)	Epithelioid	II	ผลบวก +3	1.685	75.20	ผลลบ
64. 69(3D561)	Epithelioid	II	ผลบวก +2	1.350	88.20	ผลลบ
65. 70(3D586)	Epithelioid	III	ผลบวก +2	1.650	74.00	ผลลบ
66. 71(3D638)	Epithelioid	II	ผลบวก +2	1.660	97.00	ผลบวก +3
67. 72(3D673)	Spindle	II	ผลบวก +1	1.900	61.80	ผลลบ

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่าง ค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA แยกตามประเภทของมะเร็งเมลาโนมา

ประเภท	จำนวนตัวอย่าง ร้อยละ(จำนวน)	ค่าดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)	ค่าดัชนี PCNA (ร้อยละ)
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา			
Melanocytoma	2.98(2/67)	1.028±0.011	6.42±9.03
Melanoma, epithelioid	47.76(32/67)	1.429±0.357	70.20±23.49
Melanoma, spindle	23.88(16/67)	1.234±0.289	59.13±32.18
Melanoma, mixed	25.73(17/67)	1.392±0.410	67.38±23.71
ค่าเฉลี่ย		1.371±0.360	66.73±25.90
Histologic malignancy grade			
เกรด I	15.38(10/65)	1.175±0.278[a]	63.46±33.79
เกรด II	55.38(36/65)	1.457±0.381[b]	68.49±23.26
เกรด III	29.23(19/65)	1.312±0.285	65.12±27.36
ผลการย้อมสี MFS			
ผลบวก +1	33.85(22/65)	1.452±0.389	72.59±23.04
ผลบวก +2	30.77(20/65)	1.285±0.260	65.10±25.76
ผลบวก +3	35.39(23/65)	1.312±0.401	62.56±28.59
ผลการย้อม Melan A			
ผลลบ	49.23(32/65)	1.320±0.352	62.63±30.15
ผลบวก +1	9.23(6/65)	1.299±0.323	75.22±20.34
ผลบวก +2	12.31(8/65)	1.511±0.251	68.33±23.58
ผลบวก +3	29.23(19/65)	1.420±0.421	70.30±20.53
ผลบวก	50.77(33/65)	1.420±0.367	70.71±20.70

a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p< 0.05$

ตารางที่ 4 จำนวนของตัวอย่างมะเร็งเมลาโนมา จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ประเภท	Melanoma, epithelioid	Melanoma, spindle	Melanoma, mixed
Histologic malignancy grade			
เกรด I	9.38(3/32)	43.75(7/16)	-
เกรด II	53.13(17/32)	56.25(9/16)	58.82(10/17)
เกรด III	37.5(12/32)	-	41.18(7/17)
รวม	49.23(32/65)	24.61(16/65)	26.15(17/65)
ผลการย้อมสี MFS			
ผลบวก +1	40.63(13/32)	25.00(4/16)	29.41(5/17)
ผลบวก +2	25.00(8/32)	37.50(6/16)	35.29(6/17)
ผลบวก +3	34.38(11/32)	37.50(6/16)	35.29(6/17)
รวม	49.23(32/65)[a]	24.61(16/65)[b]	26.15(17/65)[c]
ผลการย้อม Melan A			
ผลลบ	50.00(16/32)[a]	50.00(8/16)	47.06(8/17)[b]
ผลบวก +1	12.50(4/32)	12.50(2/16)	-
ผลบวก +2	18.75(6/32)	6.25(1/16)	5.88(1/17)
ผลบวก +3	26.15(17/65)	31.25(5/16)	47.06(8/17)
ผลบวก	41.54(27/65)	12.30(8/65)	13.85(9/65)

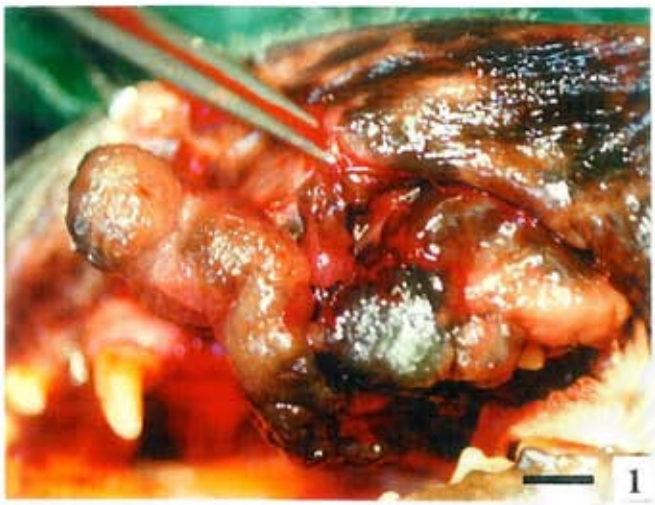
a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p< 0.05$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

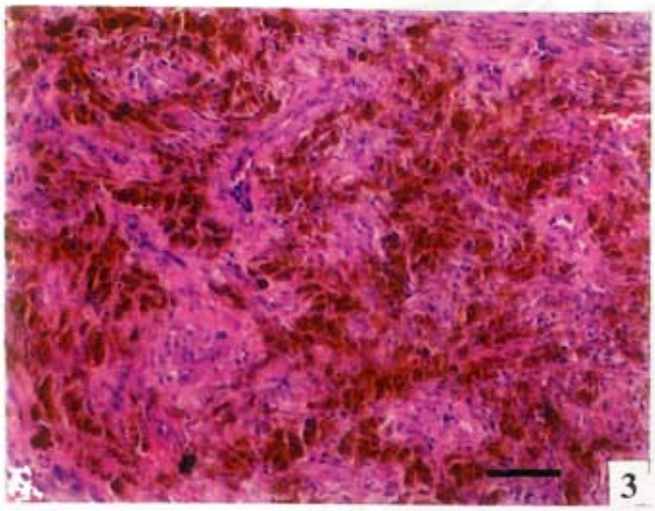
ตารางที่ 5 แสดงจำนวน ค่าดัชนี AgNORs ค่าดัชนี PCNA จำนวนตัวอย่างของการย้อม Melan A จำแนกตามกลุ่มข้อมูลทางคลินิก

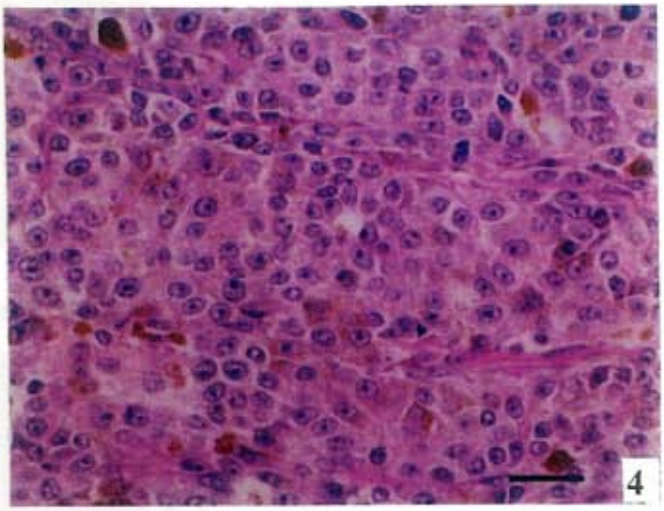
ข้อมูลทางคลินิก	จำนวนตัวอย่าง ร้อยละ	ดัชนี AgNORs (ต่อเซลล์)	ดัชนี PCNA (ร้อยละ)	ผลการย้อม Melan A (ร้อยละ) ผลลบ	ผลบวก
ช่วงอายุ					
≤ 10 ปี	67.69(44/65)	1.365±0.358	64.67±26.30	59.09(26/44)	40.91(18/44)
> 10 ปี	32.30(21/65)	1.384±0.372	77.06±25.11	28.57(6/21)	71.43(15/21)
เพศ					
เพศผู้	76.56(49/64)	1.382±0.325	71.32±21.87[a]	48.99(24/49)	51.02(25/49)
เพศเมีย	23.44(15/64)	1.336±0.396	51.45±32.69[b]	53.33(8/15)	46.67(7/15)
พันธุ์					
พันธุ์แท้	56.92(37/64)	1.365±0.351	64.41±27.02	48.65(18/37)	51.35(17/37)
พันธุ์ผสม	43.08(28/64)	1.374±0.383	69.47±25.05	50.00(14/28)	50.00(14/28)
ขนาดของก้อนเนื้อ					
< 2 ซม.	10.34(6/58)	1.170±0.238[a]	44.87±39.41[a]	50.00(3/6)	50.00(3/6)
2-4 ซม.	24.14(14/58)	1.588±0.405[b]	81.51±10.49[b]	64.29(9/14)	35.71(5/14)
> 4 ซม.	69.52(38/58)	1.366±0.346[c]	68.12±23.33[c]	42.11(16/38)	57.89(22/38)
สถานภาพ					
ตาย	97.73(43/44)	1.334±0.355	64.69±39.12	60.47(26/43)	39.53(17/43)
มีชีวิตรอด	2.27(1/44)	1.885	68.4	100(1/1)	-
กลุ่มสุนัขที่มีข้อมูล survival time ผลลบการย้อม Melan A	158.21±138.61	1.334±0.357	68.44±28.03	-	66.67(24/36)
ผลบวกการย้อม Melan A	66.25±48.84	1.291±0.283	62.79±23.91	33.33(12/36)	-

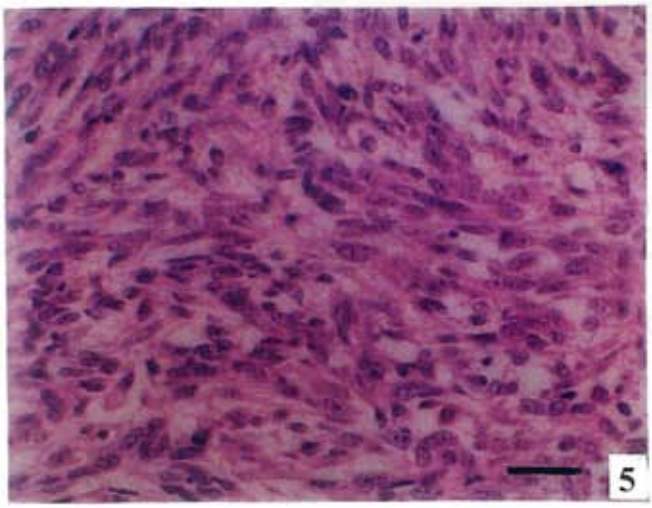
a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

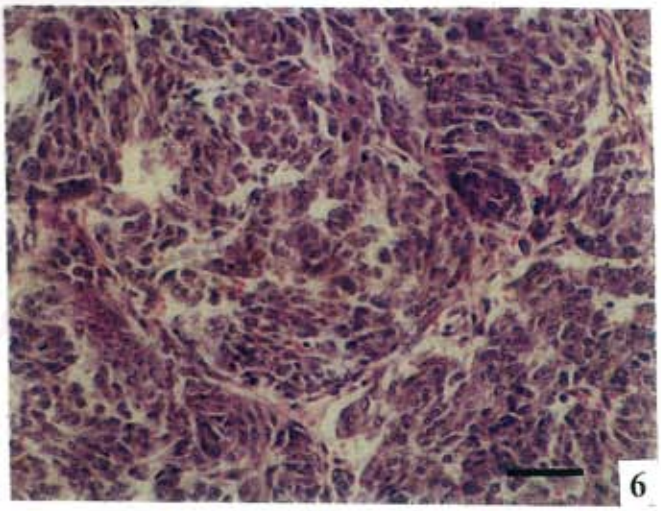

1

2


3


4


5


6

รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดเมลาโนมาที่บริเวณเหงือกด้านบนของสุนัข โดยก้อนมะเร็งมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อสีขาวที่แบ่งออกเป็นหลายพู (multilobulated)

รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดเมลาโนมาที่บริเวณเหงือกด้านบนของสุนัข ก้อนมะเร็งมีลักษณะเนื้อแน่นสี ดำ

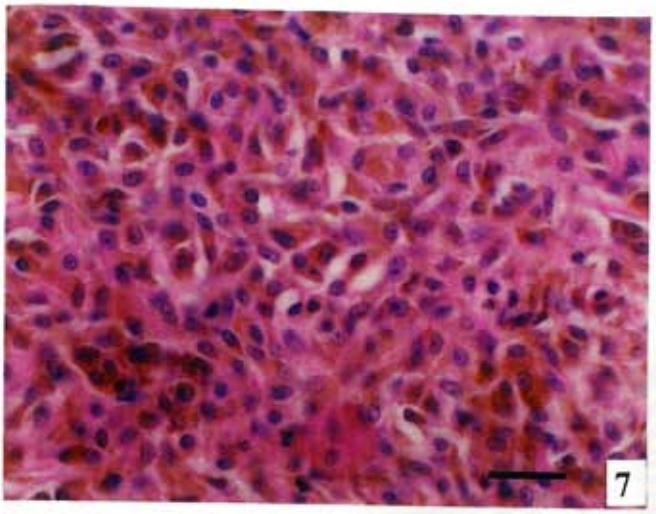
รูปที่ 3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ melanocytoma; พบเซลล์มะเร็งเป็นรูปกระสวย เรียงตัวเป็นวงอย่างหนาแน่นและเรียงตัวกันเป็นแนวยาวร่วมด้วย (H&E, bar= 40 μm)

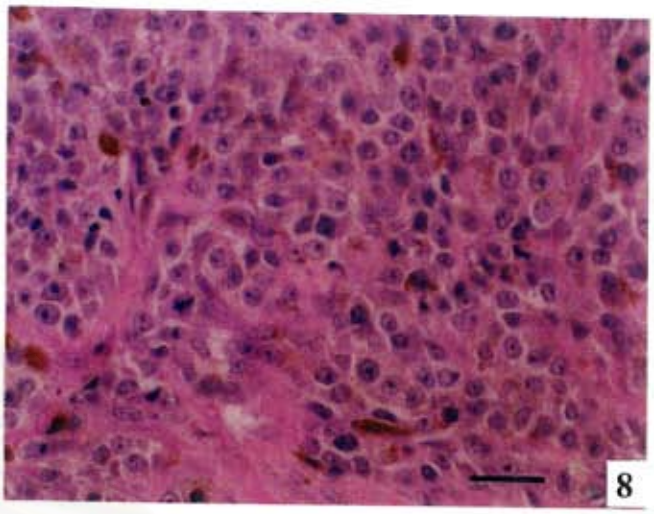
รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ epithelioid cell type of malignant melanoma; จะพบเซลล์มะเร็งที่นิวเคลียสมีรูปร่างกลม หรือ รี ขนาดใหญ่เด่นชัด (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 μm) จัดเรียงตัวเป็น lobule หรือ trabeculae และพบนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด (H&E, bar= 20 μm)

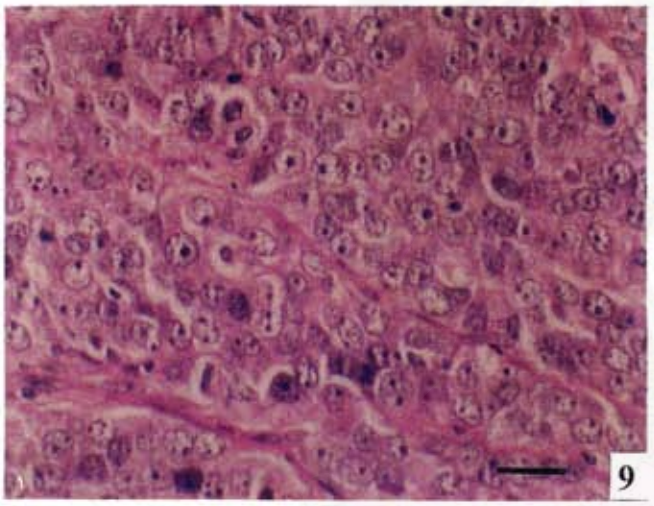
รูปที่ 5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ spindle cell type of malignant melanoma; พบเซลล์มะเร็งมีนิวเคลียส รูปร่างรี หรือยาว เรียวเป็นรูปกระสวย (H&E, bar= 20 μm)

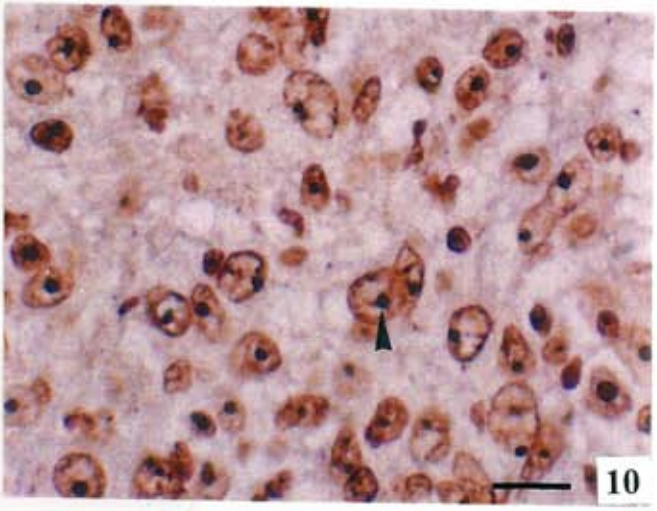
รูปที่ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mixed cell type of malignant melanoma; เซลล์มะเร็งจะประกอบด้วย spindle cell และ epithelioid cell อยู่ร่วมกัน (H&E, bar= 40 μm)

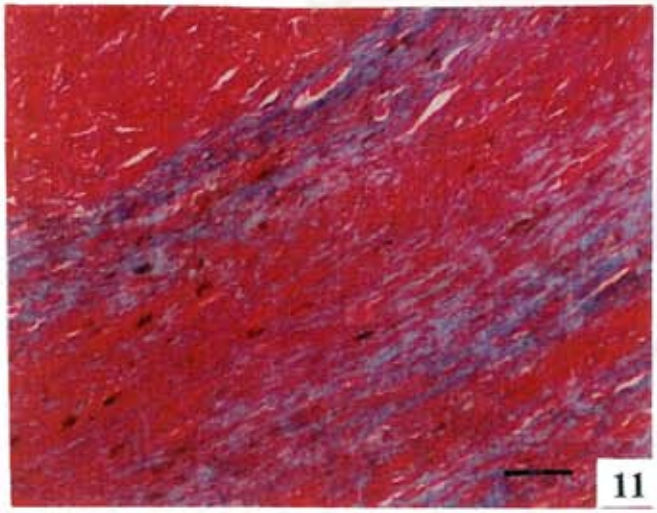
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

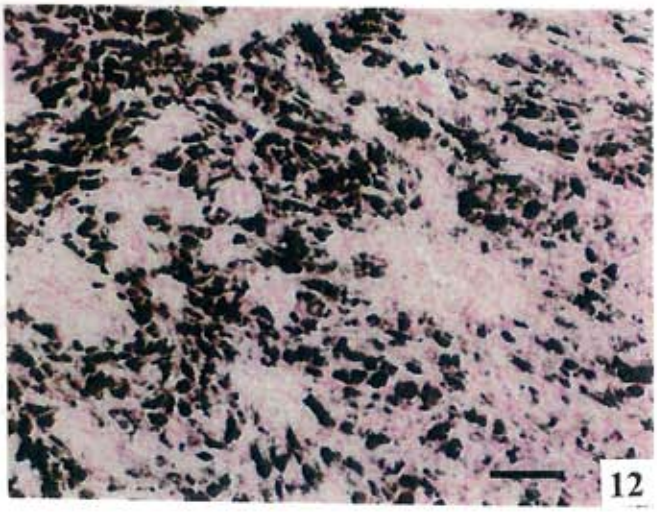

7


8


9


10


11


12

รูปที่ 7 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade I(well differentiated); นิวเคลียสมีรูปร่างกลมจนถึงรี จะไม่พบนิวคลิโอลัส หรือเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว(H&E, bar=10 μm)

รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade II (moderately differentiated); มีความ pleomorphic เพิ่มมากขึ้น โดยเซลล์มีรูปร่างกลม จนถึงรี ภายใน 1 เซลล์อาจมี 2 นิวเคลียส พบลักษณะ vesicular nuclei และนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด และจะพบ mitotic cell 0-4 cell/HPF (H&E, bar= 10 μm)

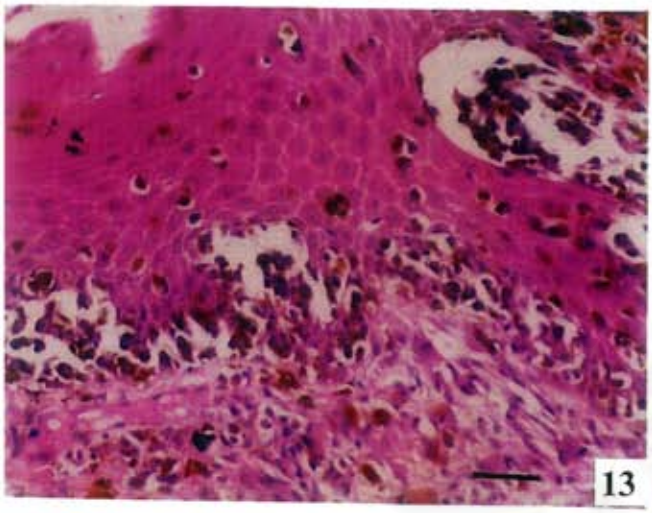
รูปที่ 9 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ grade III(poorly differentiated); เซลล์จะมีรูปร่าง highly pleomorphism ขอบเขตของไซโตพลาสมไม่ชัดเจน รวมทั้งมักพบ binucleated, multinucleated และ giant cell ได้ พบนิวคลิโอลัสที่เด่นชัด (H&E, bar= 10 μm)

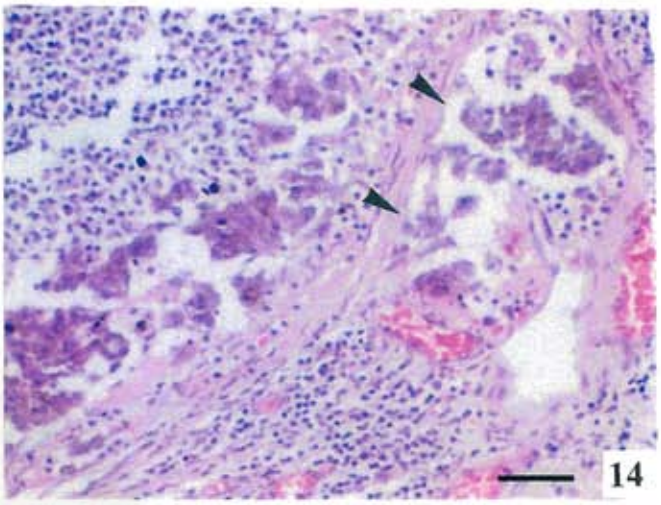
รูปที่ 10 แสดงการติดสีดำ ภายในนิวคลิโอลัส หรือกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส ของเซลล์มะเร็งชนิด epithelioid cell ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี AgNORs(หัวลูกศร) (AgNORs stain, bar= 8 μm)

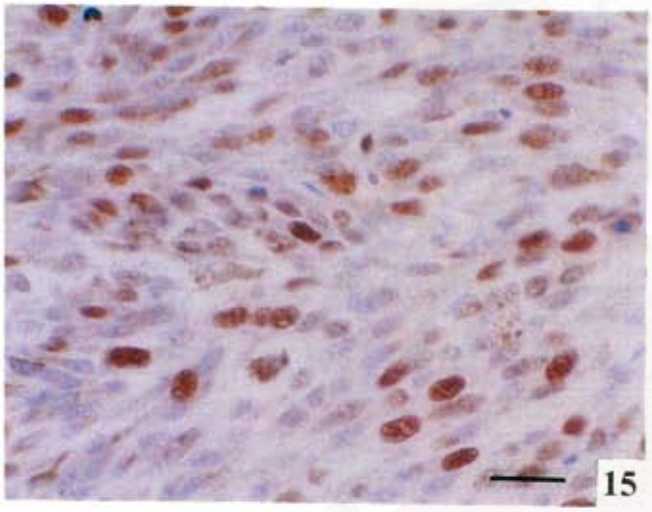
รูปที่ 11 แสดงการติดสีดำภายในนิวเคลียส และการติดสีแดงภายในไซโตพลาสมของเมลาโนมาชนิด mixed cell type และการติดสีฟ้าในส่วนที่เป็นเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อมสี Masson's Trichrome (MT stain, bar= 20 μm)

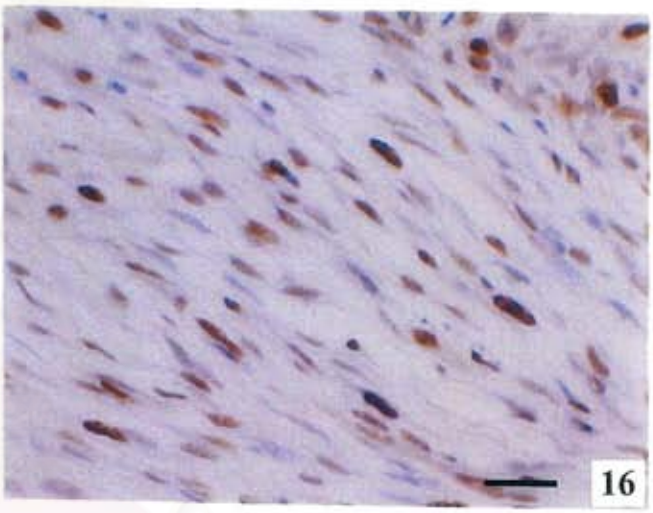
รูปที่ 12 แสดงการติดสีแดงภายในนิวเคลียส และการติดสีดำของเม็ดสีเมลานินของเมลาโนมาชนิด epithelioid cell ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสี Masson Fontana Silver (MFS stain, bar= 20 μm)

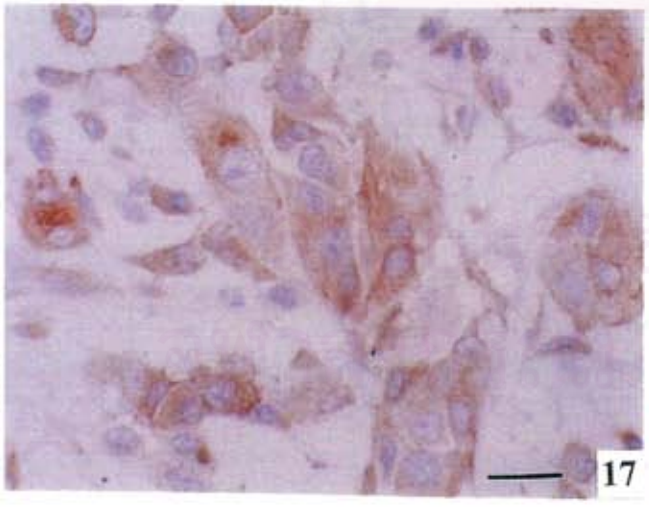
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

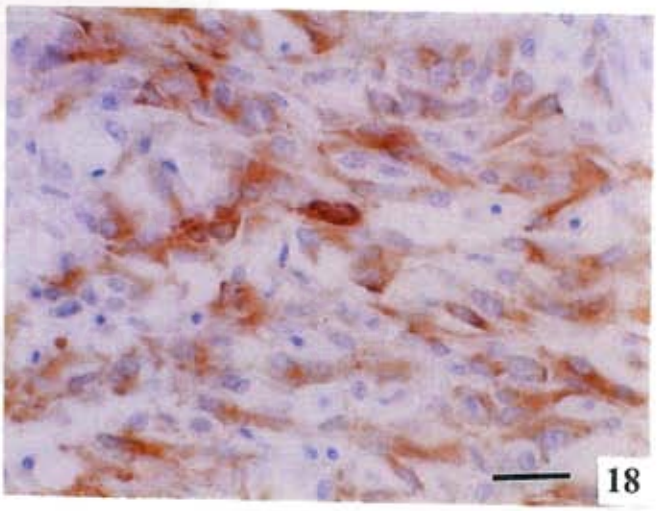

13


14


15


16


17


18

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 แสดงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดเมลาโนมาเข้าไปยังบริเวณที่เป็นส่วนของ epidermis (H&E, bar= 10 μm)

รูปที่ 14 แสดงลักษณะของ tumor emboli ที่แพร่เข้าไปในหลอดน้ำเหลือง(หัวลูกศร) (H&E, bar= 20 μm)

รูปที่ 15 แสดงการติดสีน้ำตาลของส่วนนิวเคลียส ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน PCNA ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm)

รูปที่ 16 แสดงการติดสีน้ำตาลของส่วนนิวเคลียส ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน PCNA ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด spindle cell (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm)

รูปที่ 17 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell ของคน; ตัวควบคุมบวก (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm)

รูปที่ 18 แสดงการติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสม ที่ให้ผลบวกต่อโปรตีน Melan A ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ชนิด epithelioid cell ของสุนัข (ABC, counterstained with Mayer's Hematoxylin, bar= 20 μm)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล (Discussion)

จากการศึกษาพบว่า ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยามีความสอดคล้องกับพฤติกรรมเชิงชีวภาพของเนื้องอกชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข คือเนื้องอกชนิดเมลาโนมาจะมีความแปรผันของลักษณะทางเซลล์วิทยาอย่างมาก ซึ่งเมลาโนมาชนิดที่มีความรุนแรงมาก (malignant melanoma) อาจจะเป็นได้ทั้งชนิดที่มีลักษณะทางเซลล์วิทยาเป็น fibroblast- like spindle cells หรือเป็นชนิด epithelioid cell type บางชนิดอาจเป็นแบบ mixed type คือมีทั้ง spindle cells และ epithelioid cells ปะปนกัน (Roels et al., 1999) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุนัขเป็นเมลาโนมาชนิด epithelioid cell type มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหนึ่งที่พบว่า epithelioid type เป็นชนิดของเซลล์ที่พบมากที่สุดในโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข (Berrington et al., 1994) สามารถแบ่งชนิดของมะเร็งชนิดเมลาโนมาตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่แนะนำโดย WHO (World Health Organization) (WHO system) (Owen, 1980) แต่ก็มีบางรายงานที่พบว่ามีการจัดระบบการแบ่งชนิดของมะเร็งชนิดเมลาโนมาแตกต่างไปจากที่ WHO system ซึ่งได้แก่ polygonal cell type, spindle cell type, mixture cell type, clear cell type(balloon cell type), signet ring cell type และ adenoid/ papillary cell type และอาจพบรอยโรค osseous and chondroid metaplasia ร่วมด้วย (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002) ซึ่งช่วยในการวินิจฉัยได้แม่นยำยิ่งขึ้น แต่จากการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ในลักษณะเช่นนี้ อาจเนื่องจากมะเร็งทุกชนิดที่แบ่งได้ตามกลุ่มต่างๆเหล่านี้เป็นชนิดที่มีความรุนแรง และข้อมูลที่ได้จากการจัดเก็บอาจมีน้อยเกินไปจนไม่สามารถจัดแบ่งได้ตามกลุ่มเหล่านี้ได้ ซึ่งการพบลักษณะของเซลล์ที่มีความหลากหลาย ทำให้การวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยา โดยอาศัยสีย้อม H&E เพียงชนิดเดียวทำได้ไม่แม่นยำนัก จึงควรมีการนำสี MFS มาช่วยในการวินิจฉัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในเมลาโนมาที่มีการสร้างเม็ดสีน้อย ดังที่พบการติดสีของเซลล์มะเร็งเมลาโนมาชนิด amelanotic มีการติดสีที่เพิ่มขึ้น (Kravis et al., 1996; Sheehan and Hrapchak, 1980; Ramos-Vara et al., 2000) แต่ในบางกรณีการย้อมสี MFS อาจติดเม็ดสีชนิดอื่น เช่น lipofuscin ได้ (Masson, 1929) จากผลการศึกษาการย้อมสี MFS ในเซลล์มะเร็งเมลาโนมาในกลุ่มต่างๆ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเซลล์เนื้องอกที่จำแนกตามลักษณะทางจุล

พยาธิวิทยา เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มีแนวโน้มการย้อมติดสีที่ลดลงเมื่อลักษณะทางจุลพยาธิวิทยามีความรุนแรงมากขึ้น และเซลล์ชนิดไม่สร้างเม็ดสีให้ผลบวกน้อยกว่าเซลล์ที่สร้างเม็ดสี ส่วนการย้อมสี MT นั้นจะมีประโยชน์ในการช่วยแยกเซลล์มะเร็งเมลาโนมาจากเซลล์ไฟโบบลาสต์ที่มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนได้ชัดเจนยิ่งขึ้น (Masson, 1929) นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบ Dihydroxyphenylalanine oxide (DOPA) test ซึ่งเป็นการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสาร tyrosine เป็นเมลานิน ซึ่งนำมาในทางปฏิบัติในการตรวจสอบเซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่มีการสร้างเม็ดสีน้อย นอกจากนี้การย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมี ดูการแสดงออกของโปรตีน S100 มีหน้าที่ในการจับตัวกับแคลเซียม ซึ่งให้ผลบวกทั้งภายในไซโตพลาสมและนิวเคลียสของเซลล์เนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อประสาท และเนื้อเยื่ออื่นๆ บางชนิด เซลล์มะเร็งเมลาโนมาให้ผลบวกต่อโปรตีน S100 เช่นกัน จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ามะเร็งชนิดเมลาโนมาในสุนัขเกือบจะทั้งหมดเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่เคยพบว่าอย่างน้อยร้อยละ 90 ของโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาเป็นชนิดที่มีความรุนแรง (Stannard and Pulley, 1990) และเกือบทั้งหมดของเมลาโนมาในช่องปากจะเป็นชนิดที่มีความรุนแรง (Ramos-Vara et al., 2000; Head et al., 2002)

พบความแตกต่างของค่าดัชนี AgNORs ในกลุ่มเนื้องอกและมะเร็งเมลาโนมา โดยเฉพาะในกลุ่มของ epithelioid และ mixed cell type โดยพบว่ามีค่าดัชนี AgNORs เฉลี่ยสูงกว่า อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าดัชนี AgNORs ในการจำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา แต่พบว่ามะเร็งในกลุ่ม epithelioid cell type มีค่าดัชนี AgNORs สูงสุด ซึ่งแสดงถึงดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ การแบ่งเกรดของมะเร็งชนิดเมลาโนมาตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส (nuclear grading) พบว่าค่าดัชนี AgNORs ที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเกรด I และเกรด II โดยกลุ่ม moderately differentiated มีค่าดัชนี AgNORs มากกว่ากลุ่ม well differentiated โดยมะเร็งที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว จะมีค่า NORs/cell nucleus มาก ในขณะที่มะเร็งที่มีการแบ่งตัวช้าอาจจะมีค่าเพียง 1 จุดNORs ต่อเซลล์เท่านั้น เพราะการติดสีของ AgNORs ภายในนิวเคลียสของเมลาโนมาแสดงให้เห็นถึงเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อ

การเจริญแบ่งตัวและจำนวนของ AgNORs มีความแปรผันตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็ง (Bostock et al., 1989; Simoes et al., 1994; Kravis et al., 1996) เมื่อเปรียบเทียบผลการย้อมสี MFS พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ให้ผลบวกน้อยมีค่าดัชนี AgNORs ที่สูงกว่า ผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่พบว่า AgNOR/ nucleus และ nuclear area จะมีค่าสูงขึ้น เมื่อระดับความรุนแรงของเมลาโนมาเพิ่มขึ้น (Crocker, 1990; Derenzini and Ploton, 1991; Derenzini and Trere, 1991; Zusman et al., 1991; Nyska et al., 1995) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขจะมีความสัมพันธ์กับค่าดัชนี AgNORs โดยเฉพาะการแบ่งตาม histologic malignancy grade และการแพร่กระจาย ดังนั้นจึงสามารถนำค่าดัชนี AgNORs มาใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขได้ และยังช่วยในการทำนายพฤติกรรมเชิงชีวภาพได้แม่นยำกว่าลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เนื่องจากจำนวนของค่าดัชนี AgNORs มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในมะเร็งชนิดที่มีความรุนแรงมาก นอกจากนี้วิธีการย้อมสี AgNORs ยังสามารถทำได้ง่าย ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย โดยขั้นตอนการย้อมสีจะใช้เวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง ส่วนการนับจำนวนค่าดัชนี AgNORs จะใช้เวลาประมาณ 10 นาที และค่าใช้จ่ายสไลด์ชิ้นเนื้อไม่สูงมากนัก (ประมาณ 50 บาท/1 ตัวอย่าง) ดังนั้นการทำการย้อมสี AgNORs จะสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว (Kravis et al., 1996)

การใช้ค่าดัชนี AgNORs นั้นจะสามารถช่วยในการทำนายการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขได้ แต่ควรอาศัยการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติม เช่น ภาพถ่ายรังสีช่องอก เพื่อดูการแพร่กระจายของโรคไปยังปอดและการตรวจต่อมน้ำเหลืองร่วมด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลข้อมูลทางคลินิกที่มากพอจะตรวจสอบการเกิดการแพร่กระจายของโรคไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกายได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น แต่การผลศึกษาในครั้งนี้ก็มีแนวโน้มที่ให้ผลสอดคล้องกับรายงานอื่นๆที่พบว่า มะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากมักเกิดการเจริญแทรกเข้าไปรอบๆเนื้อเยื่อปกติ และมักพบการแพร่กระจายของโรคไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง ต่อมน้ำเหลืองและบริเวณอื่นๆของร่างกาย(เช่น ปอด สมอง และอวัยวะภายในอื่นๆ) (ร้อยละ 14-74 ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปาก) มีรายงานหนึ่งซึ่งพบว่ามีการเกิด local

invasion ประมาณร้อยละ 81 ของมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปาก ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้มีการเกิด local invasion ถึงร้อยละ 100 โดยพิจารณาจากการแทรกตัวของเซลล์มะเร็งของตัวอย่างชิ้นเนื้อ

การประเมินค่าดัชนี PCNA ในมะเร็งเมลาโนมา พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม melanocytoma ซึ่งมีค่าดัชนี PCNA ต่ำ กลุ่มของมะเร็งชนิด epithelioid cell type และกลุ่ม mixed cell type มีค่าดัชนี PCNA ที่สูงกว่ากลุ่ม spindle cell type และค่าสูงกว่าค่าดัชนีเฉลี่ย ซึ่งบ่งชี้ถึงความรุนแรงของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับค่าของดัชนี AgNORs เมื่อทำการจำแนกตามลักษณะของนิวเคลียส พบว่าค่าดัชนี PCNA มีค่าสูงสุดในเกรด II ซึ่งสัมพันธ์กับความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง โดยปกติแล้วโปรตีน PCNA จะสามารถตรวจพบได้ในเซลล์ที่กำลังเข้าสู่ระยะท้ายของ S phase ในวงจรการแบ่งตัว สำหรับในเกรด III นั้นพบว่าค่าดัชนี PCNA มีค่าต่ำกว่าในเกรด II อาจเนื่องการตรวจพบเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวมากกว่า และเซลล์ในระยะนี้มักให้การแสดงออกของโปรตีน PCNA แบบอ่อนภายในไซโตพลาสมเท่านั้น ซึ่งไม่ได้ทำการนับจำนวนเซลล์ดังกล่าวในการประเมินผล เมื่อทำการแบ่งกลุ่มเซลล์ตามการย้อมสี MFS เป็นที่ยอมรับกันว่า เซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสี MFS น้อยสัมพันธ์กับความรุนแรงของเซลล์ ซึ่งผลของค่าดัชนี PCNA ก็สอดคล้องและสัมพันธ์กับความรุนแรง ดังนั้นค่าดัชนี PCNA สามารถนำมาใช้เป็นตัวแปรในการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับที่มีการรายงานในเนื้องอกชนิดอื่นๆ ซึ่งรายงานว่าค่าดัชนี PCNA มักจะมีค่าสูงขึ้นแปรผันตามความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามค่าดัชนี PCNA เพียงค่าเดียวนั้นยังไม่มีความสัมพันธ์การการพยากรณ์โรคในลักษณะการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยที่ลดลง ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึง proliferative marker ชนิดอื่นๆ ที่สามารถนำมาพยากรณ์โรคร่วมกัน โดยมีรายงานค่าดัชนี Ki-67 มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์มะเร็งเมลาโนมาที่ทำการจำแนกตามจุลพยาธิวิทยา การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงและอัตราการมีชีวิตรอดของสัตว์ป่วยในระยะเวลา 6 เดือน

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์มะเร็งเมลาโนมามีการแสดงออกของโปรตีน Melan A จำนวนร้อยละ 50.77 โดยส่วนใหญ่จะแสดงออกในระดับสูง ซึ่งพบได้ในทั้งสามกลุ่มที่จำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยมะเร็งเมลาโนมาในกลุ่ม epithelioid cell ให้ผลบวกสูงสุด ซึ่งสามารถนำเทคนิคการ

ย้อมอิมมูนโนฮิสโตเคมีของโปรตีน Melan A มาใช้ในการวินิจฉัยได้เป็นอย่างดี โดยพบว่า โปรตีน Melan A เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ CD8+ cytotoxic T-cell มีความสำคัญต่อขบวณการสร้างเม็ดสีเมลานินของเซลล์เมลาโนไซต์ ซึ่งแตกต่างจากขบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินของเอนไซม์ tyrosinase ที่สามารถตรวจสอบจาก DOPA test ได้ มีรายงานการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลาโนมา พบการแสดงออกหรือย้อมติดสีเป็นกลุ่มบริเวณ polar perinuclear และขยายออกไปยังไซโตพลาสม โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์รูปกระสวย (Koenig et al., 2001) การศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเนื้องอกเมลาโนมา โดยพบจำนวนร้อยละ 90 พบว่าเซลล์กลุ่ม amelanotic melanoma ให้ผลบวกร้อยละ 32 และในบางรายงานพบว่าร้อยละ 90 ของเนื้องอกที่มีการสร้างเม็ดสีจำนวนมากให้ผลบวก แต่ให้ผลลบต่อเซลล์ melanophages (Ramos- Vara et al., 2000; Ramos- Vara et al., 2002) โปรตีน Melan A ให้ผลบวกต่อเซลล์เมลาโนไซต์บริเวณชั้นหนังแท้ และพบว่าเซลล์มะเร็งชนิด epithelioid cell และ spindle cell ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการแสดงออกของโปรตีน Melan A แต่มีข้อสังเกต คือ เซลล์ชนิดรูปกระสวยให้ผลบวกที่มากกว่าบริเวณเยื่อบุผิว เช่นเดียวกับกลุ่มเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายออกไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ (Orosz, 1999) ในบางครั้งอาจพบการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน Melan A ในเซลล์เพาะเลี้ยง และเซลล์มะเร็งเมลาโนมา ซึ่งสามารถอธิบายหลักการในการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากโปรตีน Melan A เป็นแอนติเจนของเซลล์มะเร็งที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี (Koenig et al., 2001)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน Melan A และค่าดัชนี proliferative marker พบว่าในกลุ่มที่ให้ผลลบมีค่าดัชนี AgNORs และ PCNA ที่ต่ำกว่าในกลุ่มที่ให้ผลบวก ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นคุณค่าในการการพยากรณ์โรคของการแสดงออกของโปรตีน Melan A ที่มีการเจริญแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา มีรายงานศึกษาความสัมพันธ์พฤติกรรมชีวภาพ และเป็นตัวแปรอิสระกับเซลล์เมลาโนมาชนิดที่สร้างเม็ดสี (Ramos-Vara et al., 2000) การแสดงออกของโปรตีน Melan A มีความสัมพันธ์กับการลดลง

ของช่วงเวลาปลอดโรค (disease free interval) และอัตราการรอดชีวิต (overall survival rate) ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นมะเร็งเมลาโนมาในช่องปาก (Berset et al., 2001) จากข้อมูลช่วงเวลาการมีชีวิตรอด พบว่าสุนัขในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อการย้อม มีค่าการรอดชีวิตที่สูงกว่ากลุ่มสุนัขที่ให้ผลบวกประมาณ 2-2.5 เท่า แต่จำนวนของสุนัขในกลุ่มที่ให้ผลลบมีจำนวนสัตว์ป่วยที่ตายสูงกว่ากลุ่มที่ให้ผลบวก 1 เท่า ดังนั้นความสำคัญของการแสดงออกของโปรตีน Melan A ที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคอาจยังไม่เด่นชัดนัก ซึ่งควรทำการเก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกให้ละเอียดมากขึ้น แต่ปัญหาหลักของการติดตามข้อมูลทางคลินิกในสัตว์ คือ การนำสุนัขป่วยมาทำการรักษาขาดความต่อเนื่อง และมีการเปลี่ยนผู้ดูแลสุนัขป่วย สัตว์ป่วยมักจะเสียชีวิตที่บ้านในช่วงของการรักษา ทำให้การติดตามอาการทางคลินิกกระทำได้ไม่ต่อเนื่อง

จากผลทางด้านคลินิกพบว่า อายุของสุนัขที่พบมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากอยู่ในช่วง 2-20 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 9.59±3.17 ปี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆที่พบว่า สุนัขที่ป่วยจะมีอายุระหว่าง 7-14 ปี (Stannard and Pulley, 1990) บางรายงานพบว่าอยู่ในช่วงอายุ 3-15 ปี โดยมีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงอายุ 9-13 ปี (Goldschmidt and Hendrick, 2002) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายรายงานที่พบว่าเมลาโนมาในช่องปากพบบ่อยที่สุดในสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี (Ramos-Vara et al., 2000) ผลการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยพบว่าสุนัขเพศผู้เกิดมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากมากว่าเพศเมีย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานส่วนใหญ่ที่พบว่า สุนัขเพศผู้มีแนวโน้มของการเกิดโรคสูงกว่าสุนัขเพศเมีย (Hoyt and Withrow, 1984) แต่ก็มีบางรายงานที่ไม่พบว่าสุนัขเพศใดจะมีแนวโน้มในการเกิดโรคสูง (Goldschmidt and Hendrick, 2002) พันธุ์ของสุนัข ที่สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ คือ พันธุ์ที่มีผิวหนังสีดำ หรือเยื่อบุช่องปากสีดำ ดังเช่น ในพันธุ์ Chow chow อาจมีความเสี่ยงในการเกิดเนื้องอกสูงกว่าพันธุ์อื่น แต่อย่างไรก็ตามไม่พบมีความแตกต่างของพันธุ์สุนัขในการเกิดมะเร็งเมลาโนมาในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกับรายงานที่ผ่านมา จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเหงือกเป็นบริเวณที่เกิดมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขมากที่สุด รองลงมาคือ ลิ้น ริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม และต่อมน้ำลายตามลำดับ ซึ่งจากรายงานส่วนใหญ่พบว่า เหงือกเป็นตำแหน่งที่พบมะเร็งชนิดนี้ได้บ่อยที่สุด (Ramos-Vara et al., 2000) ส่วนลิ้นและต่อมทอนซิลจะเป็นตำแหน่งที่ไม่ค่อยพบการ

เกิดโรค (Beck et al, 1986) ขนาดของก้อนเนื้อที่พบมากที่สุดอยู่ในช่วงมากกว่า 4 ซม. และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าดัชนี AgNORs และ PCNA สอดคล้องกับรายงานที่ศึกษาเนื้องอกเมลาโนมาในสุนัขที่สรุปว่า ความสัมพันธ์ของขนาดก้อนเนื้อในการพยากรณ์โรคยังไม่เด่นชัดนัก นอกจากนี้ตัวบ่งชี้อากรทางคลินิก นอกจากขนาดของชิ้นเนื้อ ควรดูตำแหน่งของก้อนเนื้อ ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าก้อนเนื้องอกที่ปะกอบด้วยเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูงมีความสำคัญต่อการพยากรณ์โรคที่แย่ จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขไม่เกี่ยวข้องกับเพศ อายุ ตำแหน่งของรอยโรค mitotic index ปริมาณของการสร้างเม็ดสี ปริมาตรของก้อนเนื้องอก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานส่วนใหญ่ที่พบว่าการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดนี้มักจะไม่มีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆเหล่านี้ (Harvey et al., 1981; Beck et al., 1986; Hatta et al., 1998; Goldschmidt and Hendrick, 2002, Head et al., 2002)

ข้อสรุป (Conclusion) และข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)

การวินิจฉัยมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัข สามารถกระทำโดยใช้การจำแนกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็น 3 รูปแบบ คือ epithelioid cell type, spindle cell type และ mixed cell type การจำแนกเกรดทางนิวเคลียส การย้อมสี Masson's Fontana ซึ่งพบการติดสีในระดับที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์มะเร็งชนิดที่ไม่สร้างเม็ดสี และสามารถนำการใช้เทคนิคทางอิมมูนโนฮิสโตเคมีมาใช้ในการแสดงออกโปรตีน Melan A ในการวินิจฉัยมะเร็งเมลาโนมาในสุนัขได้เป็นอย่างดี สำหรับคุณค่าในเชิงการพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมาในช่องปากสุนัข พบว่า สามารถนำค่าดัชนี AgNORs และค่าดัชนี PCNA มาหาความสัมพันธ์กับความรุนแรงตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็นอย่างดี ค่าการแสดงออกของโปรตีน Melan A มีความสัมพันธ์กับลักษณะของเซลล์มะเร็ง การประเมินผลปัจจัยทางคลินิก มีความสำคัญในการพยากรณ์โรคเช่นกัน และผลที่ได้สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมเชิงชีวภาพของเมลาโนมาในสุนัขได้ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจสามารถนำมาใช้ประกอบคำแนะนำสำหรับเจ้าของสุนัข ก่อนที่จะทำการวินิจฉัยหรือดำเนินการรักษาต่อไป อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าตัวแปรดังกล่าวข้างต้นจะมีประโยชน์ในการช่วยพยากรณ์โรคมะเร็งชนิดเมลาโนมาในช่องปากของสุนัขได้ แต่ก็ควรจะอาศัยข้อ

มูลทางคลินิก เช่น ระยะเวลาในการขยายตัว ระยะการเจริญของมะเร็ง ขนาดของมะเร็ง ระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบและให้การรักษา และการเกิดมะเร็งภายหลังการผ่าตัด อัตราการรอดชีวิต รวมทั้งลักษณะทางจุลพยาธิวิทยามาประกอบกันด้วย เพื่อความแม่นยำในการพยากรณ์โรคมะเร็งเมลาโนมาในสุนัขต่อไป สำหรับแนวทางทางการศึกษาทางด้านมะเร็งเมลาโนมาในสุนัข ทั้งในการวินิจฉัย พยาธิกำเนิด การพยากรณ์โรค และ นำไปสู่แนวทางการรักษาที่สัมฤทธิ์ผลนั้น ควรใช้แนวทางทางด้านอณูชีววิทยา การพัฒนาเทคนิค *In situ* hybridization โดยการใช้ cDNA probe ที่จำเพาะ หรือเทคนิคอื่นๆ เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส ในการตรวจหาเซลล์มะเร็งจากรอยโรคปฐมภูมิและรอยโรคที่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง หรืออวัยวะภายใน การศึกษา tumor marker ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเมลาโนมาที่รุนแรง การศึกษาการแสดงออกของ oncogene, tumor suppressor gene และยีนอื่นๆ ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของมะเร็งเมลาโนมา ซึ่งตัวบ่งชี้เหล่านี้จะมีความสำคัญในแง่การพยากรณ์โรคของสัตว์ป่วยที่จะวางแผนการรักษา และ การติดตามภายหลังการรักษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง (References)

1. เวคิน นพนิตย์. 2524. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา. สำนักพิมพ์ห้างขายยาตรางู. กรุงเทพฯ. 168 หน้า.

2. Beck, E.R., Withrow, S.J., McChesney, A.E., Richardson, R.C., Henderson, R.A., Norris, A.M., Caywood, D.D., Klausner, J.S., Harvey, H.J. and Holmberg, D.L. 1986. Canine tongue tumors: a retrospective review of 57 cases. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 22: 525-532.

3. Berrington, A.J., Jimbow, K., Haines, D.M. 1994. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. Vet. Pathol. 31(4): 455-461.

4. Berset, M., Cerottini, J.P., Guggisberg, D., Romero, P., Burri, F., Rimoldi, D., Panizzon, R.G. 2001. Expression of Melan-A/ MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. Int. J. Cancer 20(95): 73-77.

5. Blessing, K., Sanders, D.S., Grant, J.J. 1998. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. Histopathology 32(3): 139-146.

6. Bolon, B, Calderwood Mays, M.B., Hall, B.J. 1990. Characteristics of canine melanomas and comparision of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. Vet. Pathol. 27(2): 96-102.

7. Borthwick, R., Else, R.W. and Head, K.W. 1982. Neoplasia and allied conditions of the canine orophaymx. Vet. Ann. 22: 248-269.

8. Bostock, D.E., Crocker, J., Harris, K., Smith, P. 1989. Nuclear organizer regions as indications of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. Br. J. Cancer. 59: 915-918.

9. Busam, K.J., Chen, Y.T., Old, L.J., Stockert, E., Iversen, K., Coplan, K.A., Rosai, J., Barnhill, R.L., Jungbluth, A.A. 1998. Expression of melan-A(MART-1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. Am. J. Surg. Pathol. 22(8): 976-982.

10. Carpenter, W.J., Novilla, N.M. and Griffing, J.W. 1980. Metastasis of a malignant, amelanotic lingual melanoma in a dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 16: 685-689.

11. Catchpole, B., Gould, S.M., Kellett-Gregory, L.M. and Dobson, J.M. 2002. Immunosuppressive cytokines in the regional lymph node of a dog suffering from oral malignant melanoma. J. Small Anim. Pract. 43: 464-467.

12. Che′nier, S. and Dore′, M. 1999. Oral malignant melanoma with osteoid formation in a dog. Vet. Pathol. 36: 74-76.

13. Contractor, H., Ruschoff, J., Hanisch, T., Ulshofer, B., Neumann, K., Schultze-Seemann, W. and Thomas, C. 1991. Silver stained structures in prostatic carcinoma: evaluation of diagnostic and prognostic relevance by automated image analysis. Uro. Intern. 46: 9-14.

14. Crocker, J. 1990. Nucleolar organizer regions. Current Topics in Pathology. 82: 91-149.

15. Crocker, J., Boldy, D.A. R. and Egan, M.J. 1989. How should we count AgNORs?; proposal for a standardized approach. J. Pathol. 158: 185.

16. De Vico, G., Maiolino, P. and Restucci, B. 1995. Silver-stained nucleolar(Ag-NOR) cluster size in feline mammary carcinomas: lack of correlation with histological appearance, mitotic activity, tumor stage, and degree of nuclear atypia. J. Comp. Pathol. 113(1): 69-73.

17. Derenzini, M. and Ploton, D. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. Inter. Rev. Exp. Pathol. 32: 150-192.

18. Derenzini, M. and Trere, D. 1991. Importance of interphase nucleolar organizer in tumor pathology. Virchow's Archiv B cell Pathology. 61: 1-8.

19. Ghazizadeh, M., Sasaki, Y., Araki, T., Konishi, H. and Aihara, K. 1997. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNORs analyses. Am. J. Clin. Pathol. 107: 451-458.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

20. Girod, S.C., Groth, W., Junk, M. and Gerlach, K.L. 1994. P53 and PCNA expression in malignant melanomas of the head and neck. Pigment Cell Res. 7(5): 354-357.

21. Goldschmidt, M.H. and Hendrick, M.J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. In: Tumors in Domestic Animals. D.J. Meuten 4th ed. Iowa State Press, Ames: 45-84.

22. Harvey, H.J., MacEwan, E.G., Braun, D., Patnaik, A.K., Withrow, S.J. and Jongeward, S. 1981. Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. J. Am. Vet. Med. Assoc. 178: 580-582.

23. Hatta, N., Takata, K., Takehara, K. and Ohara, K. 1998. Polymerase chain reaction and immunohistochemistry freguently detect occult melanoma cells in regional lymph nodes of melanoma patients. J. Clin. Pathol. 51: 597-601.

24. Head, K.W., Else, R.W. and Dubielzig, R.R. 2002. Malignant melanoma in dogs. In: Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Ames: Iowa State Univ Press. 427-431.

25. Hofbauer, G.F., Kamarashev, J., Geertsen, R., Boni, R. and Dummer, R. 1998. Melan-A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. Melanoma. Res. 8(4): 337-343.

26. Hoyt, R.F. and Withrow, S.J. 1984. Oral malignancy in the dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 20: 83-92.

27. James, W.C., Meliton, N.N. and William, J.G. 1980. Metastasis of a malignant amelanotic lingual melanoma in a dog. J. Am. Ani. Hosp. Assoc.16: 685-689.

28. Kawahira, K. 1999. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. Arch. Dermatol. Res. 291(7-8): 413-418.

29. Kenneth, M.R., David, M.R., Susan, M.C., Renee, A., David, S.B., Rance, M.D., Karelle, A.M. and Antony, S.M. 2001. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases(1989-2000). J. Am. Vet. Med. Assoc. 218(9): 1444-1448

30. Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R. and Modiano, J.F. 2001. Expression of s100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. Vet. Pathol. 38(4): 427-435.

31. Kravis, L.D., Vail, D.M., Kisseberth, W.C., Ogilvie, G.K. and Volk, L.M. 1996. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirate and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 209: 1418-1420.

32. Laprie, C.. Abadie, J., Amardeilh, M.F., Net, J.L., Lagadic, M. and Delverdier, M. 2001. MIB-1 immunoreactivity correlates with biological behaviour in canine cutaneous melanoma. Vet. Dermatol. 12(3): 139-147.

33. Lohr, C.V., Teifke, J.G., Failing, K. and Weiss, E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. Vet. Pathol. 34: 212-221.

34. Masson, P.: Amer. J. Path. 4: 181-211, 1928 อ้างโดย Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 1968: 104-105.

35. Masson, P.J.: J. Techn. Methods 12: 75-90, 1929. อ้างโดย Mannual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 1968: 104-105.

36. Nakhleh, R.E., Wick, M.R. and Rocamora, A. 1990. Morphologic diversity in malignant melanomas. Am. J. Clin. Pathol. 93: 731-740.

37. Nyska, A., Zusman, I., Klein, T., Sheila, N., Weis, O., Madar, Z. and Klein, B. 1995. Assessment of the nucleolar organizer regions by automated image analysis in benign and malignant colonic tumors and adjacent tissues in rats. J. Comp. Path. 113: 45-50.

38. Oliver, J.L. and Wolfe, L.G. 1992. Antigen expression in canine tissues, recognized by a monoclonal antibody generated against canine melanoma cells. Am. Vet. Res. 53(1): 123-128.

39. Owen, L.N. 1980. World health organization TNM classification of tumors in domestic animals. In: Clinical Veterinary Oncology. J.J. Withrow and E.G. MacEwen (eds.) Philadelphia: J.B. Lippincott. 454-457.

40. Orosz, Z., 1999. Melan-A/ MART-1 expression in various melanocytic lesions and in non melanocytic soft tissue tumours. Histopathology 34(6): 517-525.

41. Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J.J. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem. J. 18: 5-14.

42. Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A. and Kottler, S.J. 2000. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. Vet. Pathol. 37(6): 597-608.

43. Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., Johnson, G.C., Turnquist, S.E., Kreeger, J.M. and Watson, G.L. 2002. Melan-A and S-100 protein immunohistochemistry in feline melanoma: 48 cases. Vet. Pathol. 39: 127-132.

44. Reddy, V.B., Gattuso, P., Aranha, G. and Carson, H.J. 1995. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. J. Cutan. Pathol. 22(3): 248-251.

45. Risio, M. and Rossini, F.P. 1993. Cell proliferation in colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Anticancer Res. 13: 43-48.

46. Robert, B.W. and Heidi, B.L. 1997. Veterinary Dentistry Principles. America: Maple Press. 133-136.

47. Roel, S., Tilmant, K. and Ducatelle, R. 1999. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. J. Comp. Pathol. 121(1): 13-24.

48. Rungsipipat A., Sunyasootcharee B., Ousawaphlangchai L., Puangchompoo S., Sailasuta A. and Thanawongnuwech R. 2003. Neoplasms of dogs in Bangkok. Thai. J. Vet. Med. 33: 59-66.

49. Ruschoff, J., Plate, K., Contractor, H., Kern, S., Zimmermann, R. and Thomas, C. 1990b. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. J. Pathol. 161: 113-118.

50. Sandusky, G.E., Carlton, W.W. and Wightman, K.A. 1985. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. Vet. Pathol. 22(6): 577-581

51. Sae-Ngow, S., Pattanathaiyanon, N., Lertrattanachaikul, P., Pongpech, K., Kulprawit, C. and Rungsipipat, A., 2002. Study on the relationship between histopathological appearance and AgNORs index of canine oral melanoma. Proc. of the 28th TVMA annual conference, 9-11 Oct. CD-ROM.

52. Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1980. Pigments and minerals. In: Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., D.C. Sheehan and B.B. Hrapchak. (ed.) St. Louis: CV Mosby. 214-232.

53. Silliphant, W. M. 1960. Preparation of tissue. In: Manual of Histologic and Special Staining Techniques. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 15-25.

54. Simoes. J.P.C., Schoning. P. and Butine. M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. Vet. Pathol. 31: 637-647.

55. Smith, S.H., Goldschmidt, M.H. and McManus, P.M. 2002. A comparative review of melanocytic neoplasms. Vet. Pathol. 39: 651-678.

56. Synder, M.L. and Paulino, A.F. 2002. Melan-A as a useful diagnosis immunohistochemical stain for the diagnosis of primary sinonasal melanomas. Head Neck 24(1): 52-55.

57. Stannard, A.A. and Pulley, L.T. 1990. Melanotic tumor. In: Tumors in Domestic Animals. 3rd ed., J.E. Moulton. (ed.) Los Angeles: University of California Press. 75-82.

58. Steven, E.H. 2000. Veterinary Dentistry for the Technician and Office Staff. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 55.

59. Withrow, S.J. 1996. Tumors of the gastrointestinal tract. A. Cancer of the oral cavity. In: Small Animal Oncology. 2nd ed., S.J. Withrow and E.G. MacEwan.(ed.) Philadelphia: W.B. Saunders. 227-240.

60. Withrow, S.J. and MacEwan, E.G. 1989. World health organization TNM classification of tumors in domestic animals. In: Clinical Veterinary Oncology. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 463-464.

61. Zusman, I., Kozlenko, M. and Zimber, A. 1991. Nucleolar polymorphism and nuclear size in precarcinomatous and carcinomatous lesions in rat colon and liver. Cytometry. 12: 302-307.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย