

การวินิจฉัยแยกเกรดและพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข

สารัช จรรยาแพทย์* อภิชาติ ศรีฟ้าวัฒนา* สหพล รัตนตันท์*
อนุเทพ รังสีพิพัฒน์** สมพร เตชะงามสุวรรณ** รุ่งโรจน์ ชนาวงษ์นุเวช**

Abstract

Saroj Chanyapat* Apichart Srifawattana* Sahaphon Rattananat*

Anudep Rungsipipat** Somporn Techangamsuwan** Roongroje Thanawongnuwech**

THE GRADING, DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF CANINE MAST CELL TUMORS

Forty-seven cutaneous mast cell tumors from dogs were pathologically classified into three grades numbered grade 1 to 3. Age, sex, breed, tumor location, and their histologic grading were tabulated. Luna's method, Unna's method, Giemsa, toluidine blue, and alcian blue/safranin stainings were applied in order to compare the diagnosis and prognosis of the tumors. The staining was positive for mast cell tumors by the different methods 64% (30/47), 68% (32/47), 70% (33/47), 72% (34/47), and 81% (38/47), respectively. The accuracy of the staining decreased when the mast cells became poorly differentiated. The alcian blue/safranin stain yielded the greatest number of positives: 70% (7/10) for grade I (well differentiated) tumors, 85% (29/34) for grade II (moderately differentiated) tumors, and 67% (2/3) for grade III (poorly differentiated) tumors. However, these results did not difference significantly from the others ($p > 0.05$). The study suggested that alcian blue/safranin staining should be considered as a suitable staining method for the grading and diagnosis of canine mast cell tumors.

Argyrophilic, nucleolar, organizer regions, histochemical staining (AgNORs) and immunohistochemical staining for anti-proliferating cell nuclear antigens (PCNA) were also evaluated. The mean standard deviation (SD) of AgNORs and PCNA for the three grades were 1.54 ± 0.42 , 2.14 ± 0.53 , and 2.33 ± 0.72 and 15 ± 16.9 , 251 ± 354.0 , and 215 ± 114.1 , respectively. The means of AgNORs and PCNA for grade I tumor were significantly different from those of grade II and III tumors ($p < 0.05$), but no differences were seen between those of grade II and grade III. An increase in the numbers of AgNORs and PCNA-positive cells correlated with the malignancy of the canine mast cell tumors. The study indicated that AgNORs and PCNA staining can be used to provide a prognosis for canine mast cell tumors cases.

Keywords : mast cell tumor, dog, dye staining, PCNA, AgNORs,

*Small Animal Hospital, **Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Bangkok 10330

*โรงพยาบาลสัตว์เล็ก **ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

สาโรช จรรยาแพทย์* อภิชาติ ศรีฟ้าวัฒนา* สหพล รัตนคันท *

อนุเทพ รังสีพิพัฒน์** สมพร เตชะงามสุวรรณ** รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช**

การวินิจฉัยแยกเกรดและพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข

ศึกษาการแบ่งระดับความรุนแรงของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัขจำนวน 47 ตัวอย่างตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา(เกรด 1-3) รวมทั้งการประเมินถึงอายุ เพศ พันธุ์ และตำแหน่งของรอยโรค โดยทำการย้อมสีด้วยวิธี Luna, Unna, Giemsa, toluidine blue และ alcian blue/safranin เพื่อเปรียบเทียบการวินิจฉัยกับการพยากรณ์เนื้องอก ชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข ผลต่อการย้อมสีชนิดต่างๆ คิดเป็น 64%(30/47), 68%(32/47), 70%(33/47), 72%(34/47) และ 81%(38/47) ตามลำดับ พบว่าเกรด 3 ให้ผลบวกต่อการย้อมสีชนิดต่างๆลดลง และในแต่ละเกรดให้ ผลบวกต่อการย้อมสี alcian blue/safranin ซึ่งเป็นสีที่ให้ค่าบวกมากที่สุดในการศึกษารังสีนี้แตกต่างกัน คือ เกรด 1 เท่ากับ 70%(7/10) เกรด 2 เท่ากับ 85%(29/34) เกรด 3 เท่ากับ 67%(2/3) อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) สรุปได้ว่าการเลือกใช้สีย้อมชนิดต่างๆ เพื่อวินิจฉัยเนื้องอก ชนิดมาสต์เซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีข้อสังเกตว่าสี alcian blue/safranin มีแนวโน้มให้ผลบวกต่อการวินิจฉัยแบ่งเกรดเนื้องอกดีที่สุด

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาต่อการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ด้วยสีฮิสโตเคมีชนิด Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) และอิมมูโนฮิสโตเคมีที่จำเพาะต่อ Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ในแต่ละเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ ในสุนัขจำนวน 47 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบจำนวน AgNORs และ PCNA ในแต่ละเกรดของเซลล์เนื้องอกมาสต์เซลล์ ในเกรด 1 เกรด 2 และเกรด 3 มีค่าเท่ากับ 1.54 ± 0.42 , 2.14 ± 0.53 และ 2.33 ± 0.72 , 15 ± 16.9 และ 251 ± 354.0 , 215 ± 114.1 ตามลำดับ โดยพบว่าในเกรด 1 มีความแตกต่างจากเกรด 2 และเกรด 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเกรด 2 และเกรด 3 จากการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าค่า AgNORs และ PCNA มีแนวโน้มแปรตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ โดยจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเนื้องอกมีความร้ายแรง (malignancy) สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ได้

คำสำคัญ : เนื้องอกมาสต์เซลล์ สุนัข สีย้อม ฟิซีเอ็นเอ เอจีเอ็นโออาร์

บทนำ

เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์พบอุบัติการณ์ประมาณ 16% ของเนื้องอกผิวหนังทั้งหมด (Rothwell et al., 1987; Er and Sutton, 1989) และมักพบการเกิดเนื้องอกซ้ำอีก ณ ตำแหน่งเดิมหรือมีการแพร่กระจายทั่วร่างกาย ทั้งที่ผิวหนังและอวัยวะภายในภายหลังการรักษา เป็นสาเหตุของการตายในสุนัข (Lester et al., 1981; Simoes et al., 1994; Takahashi et al., 2000) สุนัขที่เกิดเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์จะมีอายุโดยเฉลี่ย 8.5 ปี ซึ่งพบได้ตั้งแต่ช่วงอายุ 3 สัปดาห์จนถึงอายุ 17 ปี (Bostock, 1973; Davis et al., 1992) และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ (Patnaik et al., 1984) ตำแหน่งของรอยโรคที่มักเกิดคือบริเวณหน้าอก ท้อง ลำตัว ขาหน้า และขาหลัง (Jaffe et al., 2000)

การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ทางจุลพยาธิวิทยา แบ่งเป็น 3 เกรดตามระดับความรุนแรง คือเกรด 1 (well differentiated) เกรด 2 (moderately differentiated) และเกรด 3 (poorly differentiated) โดยพบว่าช่วงเวลาที่ยาวขึ้นมีชีวิตรอด (survival time) จะมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกที่พบ (Patnaik et al., 1984) การวินิจฉัยสุนัขที่เป็นโรคในเกรด 3 นั้นอาจเกิดความสับสนกับกลุ่ม round cell tumors ชนิดอื่น ซึ่งประกอบด้วย histiocytoma, lymphosarcoma และ transmissible venereal tumor และ melanoma (Duncan and Prasse, 1979; Lester et al., 1981; Sandusky et al., 1987) ซึ่งส่งผลต่อการวางแผนการรักษาและพยากรณ์โรค

มีรายงานการนำสีย้อมชนิดต่างๆมาใช้ในการวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ เช่น toluidine blue (TB), alcian blue pH 2.5, safranin O, Unna's method, Luna's method, Torren's method, Giemsa, periodic acid-Schiff (PAS) และ chloroacetate esterase โดยอาศัยหลักการ

คิดสีจากปฏิกิริยาระหว่างสารจำพวก biological vasoactive ที่อยู่ในแกรนูลของมาสต์เซลล์ เช่น biogenic amines และ heparin กับสีย้อมชนิดต่างๆ ซึ่งจะให้ผลต่อการวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ที่แตกต่างกัน (Luna, 1968; Simoes and Schoning, 1994; Bancroft and Stevens, 1996)

การพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์นั้นอาศัยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ระยะการเจริญของเนื้องอก (TNM system) (Owen, 1980) ตำแหน่งและระยะเวลาในการขยายตัวของเนื้องอก และระยะเวลาที่เกิดเนื้องอกภายหลังการผ่าตัด แต่ก็อาจจะไม่เพียงพอในการพยากรณ์ได้อย่างแม่นยำ

Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) คือ loop ของ DNA ในนิวคลีโอลัส ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการคัดลอก (transcription) ของ ribosomal RNA โดยจะพบมากในระยะ S phase (DNA synthetic phase) ซึ่งสามารถตรวจพบได้เป็นจุดสีดำอยู่ในนิวคลีโอลัส ซึ่งเกิดจากการที่ silver nitrate เข้าไปจับกับ nucleolar organizer regions (NORs) ที่อยู่บน acrocentric chromosomes โดยเนื้องอกชนิดที่มีความร้ายแรง (malignancy) มีจำนวนของ AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นกว่าเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign) ในเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์พบว่าจำนวน AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์ผกผันกับระยะเวลาที่สุนัขมีชีวิตรอด และพบจำนวน AgNORs สูงขึ้นในเนื้องอกที่เกิดขึ้นอีกภายหลังการรักษาหรือมีการแพร่กระจาย จึงมีการนำ AgNORs มาใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของเนื้องอกชนิดต่างๆในคนและสัตว์ เช่น canine mammary gland tumor และ ovarian carcinoma ทำให้การพยากรณ์โรคมีความแม่นยำมากขึ้น และช่วยในการวางแผนการรักษา (Bostock et al., 1989; Crocker et al., 1989; Kravis et al., 1996; Ghazizadeh et al., 1997; Lohr et al., 1997)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) มีมวลโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน และเป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น auxiliary protein ของ DNA polymerase- δ ซึ่งช่วยให้มีการสังเคราะห์และซ่อมแซม DNA โดยมีการสังเคราะห์ PCNA เพิ่มขึ้นในระยะ S phase ซึ่งเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (proliferative stage) PCNA นี้สามารถตรวจพบได้โดยอาศัยการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ PCNA จึงใช้เป็น proliferating marker ที่ดีในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดต่างๆ ในปัจจุบันเช่น canine mammary gland tumor, canine mast cell tumor และ lymphosarcoma (Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987; Kamel et al., 1991; Simoes et al., 1994; Lohr et al., 1997)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบการย้อมสีชนิดต่างๆ ได้แก่ Unna's method, Luna's method, Giemsa, toluidine blue และ alcian blue/safranin โดยเปรียบเทียบกับผลการจำแนกเกรดตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในสุนัข และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยากับการพยากรณ์ของเนื้องอกชนิดนี้จากการย้อมฮิสโตเคมี AgNORs และการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีของ PCNA ในเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคและวางแผนการรักษาในทางคลินิก

วัสดุและวิธีการ

เนื้องอก ทำการศึกษาเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ย้อนหลัง (retrospective study) จำนวน 47 ตัวอย่างจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541-2543 โดยทำการเก็บรวบรวมข้อมูลประวัติ เพศ พันธุ์ อายุ อาการทางคลินิก

และประวัติการเกิดเนื้องอกและการติดตามผลภายหลังการรักษาสุนัขที่มีเนื้องอกดังกล่าว 10 ตัว ระยะเวลาที่เนื้องอกเกิดขึ้นภายหลังการผ่าตัด (recurrent time) การกระจาย และระยะเวลาตั้งแต่ตรวจพบเนื้องอกจนกระทั่งสุนัขตาย (survival time)

ตัวอย่างชิ้นเนื้อถูกเก็บรักษาสภาพในน้ำยาฟอรัลลิน 10% ผ่านขั้นตอนทางฮิสโตเทคนิค และฝังในพาราฟิน ตัดให้มีความหนา 5 ไมครอน แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin & eosin (H&E) และทำการวินิจฉัยแบ่งเกรดของเนื้องอกตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (Patnaik et al., 1984) โดยพิจารณาจากระดับการกระจายของเซลล์เนื้องอกที่ชั้นผิวหนัง รูปแบบการเรียงตัว ขนาดและรูปร่างของเซลล์ ขอบเขตส่วนประกอบและการติดสีของไซโตพลาสซึม ขนาดและรูปร่างของนิวเคลียส ลักษณะของโครมาตินภายในนิวเคลียส จำนวนของนิวคลีโอไลต์ mitotic cell, stroma vascular change จำนวนของเซลล์ eosinophils การแทรกตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การบวม น้ำ เลือดออก และการเกิดเนื้อตาย

สีย้อม ใช้ชิ้นเนื้อที่ผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินและเติมน้ำเข้าไปในเซลล์ โดยใช้ชิ้นเนื้อของผิวหนังสุนัขที่เกิดเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์เกรด 1 เป็นสไลด์ควบคุม (positive control) และย้อมด้วยสีชนิดต่างๆ ดังนี้ (Luna, 1968; Bancroft and Stevens, 1996)

1. การย้อมสี Unna's method ทำโดยการย้อมสไลด์ในสี polychrome methylene blue นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและจุ่มสไลด์ใน glycerine-ether (เจือจาง 1:10) นาน 30 วินาที

2. การย้อมสี Luna's method ทำโดยการย้อมสไลด์ในสี aldehyde fuchsin นาน 30 นาที และแช่ในแอลกอฮอล์ 95% นาน 2 นาที ย้อมทับด้วยสี Weigert's iron hematoxylin 1 นาที ล้างด้วย hydrochloric acid 0.25% ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 2 นาที และย้อมทับด้วยสี methyl orange นาน 5 นาที

3. การย้อมสี Giemsa ทำโดยการย้อมสไลด์ในสี Giemsa ที่อุณหภูมิ 56°C. นาน 20 นาที จุ่มสไลด์ในกรดอะซิติก 1% (เจือจาง 1:100) นาน 30 วินาที 3 ครั้ง

4. การย้อมสี toluidine blue (pH 3.87) ทำโดยการย้อมสไลด์ในสี toluidine blue นาน 2 นาที

5. การย้อมสี alcian blue/safranin ทำโดยการย้อมสไลด์ในสี alcian blue/safranin นาน 15 นาที แล้วย้อมทับในสี nuclear fast red นาน 3 นาที

การแปลผลสีย้อม พิจารณาการติดสีในแกรนูลที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของมาสต์เซลล์โดยพิจารณาถึงความจำเพาะ (specificity) และความเข้มของสี (intensity) เปรียบเทียบการย้อมสีชนิดต่างๆ ด้วยไคสแควร์ (chi-square test) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ จากโปรแกรมทางสถิติ Primer V. 3.02 (McGrow-Hill, Inc.)

วิธีการย้อมสีฮิสโตเคมีชนิด AgNORs

ใช้ชุดย้อมสีฮิสโตเคมี AgNORs (Bio-Optica Milano S.p.a., Italy) โดยใช้ชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน และเติมน้ำเข้าชิ้นเนื้อ ผสม gelatin aqueous solution 0.8 มล. กับ silver nitrate concentrate solution 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน หยดสารละลายลงบนสไลด์ให้ท่วมชิ้นเนื้อเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในห้องมืด หยดสารละลาย fixing solution แล้วดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ ศึกษาการติดสีในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสงสว่าง นับจำนวน AgNORs ในนิวเคลียสหรือที่กระจายอยู่ในนิวเคลียสโดยนับจากมาสต์เซลล์จำนวน 100 เซลล์ ภายใต้กำลังขยาย 100X และใช้ green filter ด้วยการสุ่มอย่างไม่เฉพาะเจาะจง (non randomize sampling) (Crocker et al., 1989)

วิธีการย้อมฮิสโตเคมีของ PCNA

การย้อมฮิสโตเคมีโดยวิธี Avidin-biotin peroxidase complex (ABC) (Simoes et al., 1994) ใช้

ชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการละลายพาราฟินให้ความร้อนที่ 170-180°C. นาน 3 นาที ทำการ block non-specific endogenous peroxidase ด้วย H_2O_2 3% ใน absolute methanol (W/W) 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและ block non-specific binding ด้วย bovine serum albumin 10% (Fluka, Switzerland) (W/V) ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 30 นาที ทำปฏิกิริยาต่อกับ monoclonal mouse anti-PCNA antibody (Dako, Denmark) (ความเข้มข้น 1:200) ที่อุณหภูมิ 4°C. 12-14 ชั่วโมงและนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (ความเข้มข้น 1:400) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีและนำมาทำปฏิกิริยา conjugation ด้วย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วจึงทำให้เกิดสีด้วย DAB 0.05% (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6) (Sigma, USA) แล้วจึงย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างโดยนับที่กำลังขยาย 40X (HPF) จำนวน 5 บริเวณรวมกัน โดยเปรียบเทียบ กับแผ่นสไลด์ควบคุมบวก (positive control) ของเนื้อเยื่อเดือ้นมสุนัข

การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ (เกรด 1-3) และจำนวน AgNORs ด้วย one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย LSD (least significant difference) จาก F-test ด้วยโปรแกรม SPSS (statistical package for the social sciences) และการหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกกับจำนวน PCNA โดยใช้วิธีการทดสอบแบบไครพารามิเตอร์ ด้วยวิธี Kruskal-Wallis one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ จากโปรแกรมทางสถิติ Primer V. 3.02 (McGrow-Hill, Inc.)

ผล

ผลทางคลินิก ผลของการศึกษาเนื้องอกชนิดมาสท์เซลล์จำนวน 47 ตัวอย่าง พบว่าสุนัขมีอายุโดยเฉลี่ยประมาณ 8 ปี (ตั้งแต่ 6 เดือนจนถึง 16 ปี) และไม่มี ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (เพศผู้ 49% และเพศเมีย 51%) พบอุบัติการณ์ในสุนัขพันธุ์ผสม 77%(36/47) และพันธุ์แท้ 23%(11/47) สำหรับตำแหน่งของการเกิดเนื้องอกบนตัวสุนัขนั้นจะพบที่ ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย(solitary) 74%(35/47) (รูปที่ 1) และพบว่ามี การแพร่กระจายทั่วตัว (multiple) 26%(12/47) (รูปที่ 2-4) โดยบริเวณที่พบได้แก่ บริเวณท้องและขาหลังรวมทั้งหน้าอก และขาหน้า ซึ่ง จะพบการกระจายของเนื้องอกมากที่สุดบริเวณท้องและ ขาหลัง 44.7%(21/47) ส่วนที่หัวและคอ อวัยวะ สืบพันธุ์และทวารหนัก และที่หน้าอกและขาหน้า คิดเป็น 8.5%(4/47) 10.6%(5/47) และ 36.2%(17/47) ตามลำดับ และก้อนเนื้องอก มีขนาดตั้งแต่ 1-14 ซม. (ค่าเฉลี่ย 5.4 ± 3.1 ซม.)

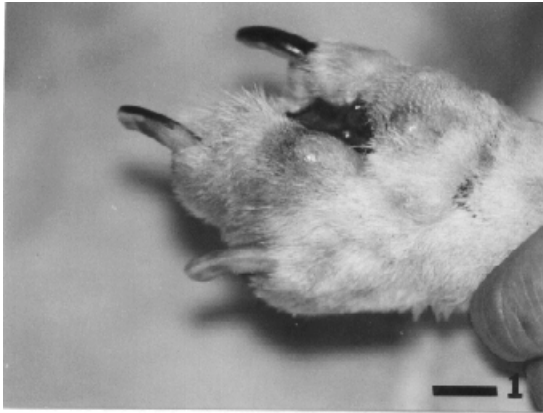
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบเนื้องอกเกรด 2 จำนวนมากที่สุด 72.3%(34/47) เกรด 1 21.3% (10/47) และเกรด 3 6.4%(3/47) โดยลักษณะทางจุล พยาธิวิทยาของเนื้องอกในเกรด 1 นั้นพบว่ามาสท์ เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นแถวหรือกลุ่มเล็กๆ และมี เส้นใยคอลลาเจนแทรกตัวอยู่ระหว่างแถว เซลล์มี ลักษณะกลมและ monomorphic โดยจะมีขอบเขตของ ไซโตพลาสซึมชัดเจน ภายในไซโตพลาสซึมจะพบแกรนูล นิวเคลียสมีรูปร่างกลมจนถึงรี ไม่พบนิวคลีโอลัสและ mitotic cell และพบการแทรกตัวของเซลล์ eosinophil (รูปที่ 5) สำหรับเกรด 2 มีจำนวนมาสท์เซลล์เพิ่ม มากขึ้น และรูปร่างของเซลล์มีความเป็น pleomorphic เพิ่ม มากขึ้นโดยเซลล์มีรูปร่างกลมจนถึงรี ภายใน 1 เซลล์ อาจมี 2 นิวเคลียส พบลักษณะ vesicular nuclei และ นิวคลีโอลัสเด่นชัด สังเกตพบ fibrovascular stroma

และพบ mitotic cell 0-4 cell/HPF พบเนื้อตายภายใน ก้อนเนื้องอก (รูปที่ 6) ส่วนในเกรด 3 มาสท์เซลล์มี การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ขนาดไม่แน่นอน (highly pleomorphic) เซลล์รูปร่างกลม รีหรือรูปกระสวย เรียง ตัวอัดกันแน่น ขอบเขตของไซโตพลาสซึมไม่ชัดเจน และมักไม่พบแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมรวมทั้งมักพบ binucleated และ multinucleated ได้ พบนิวคลีโอลัส เด่นชัดและมี mitotic cell 4-8 cell/HPF (รูปที่ 7)

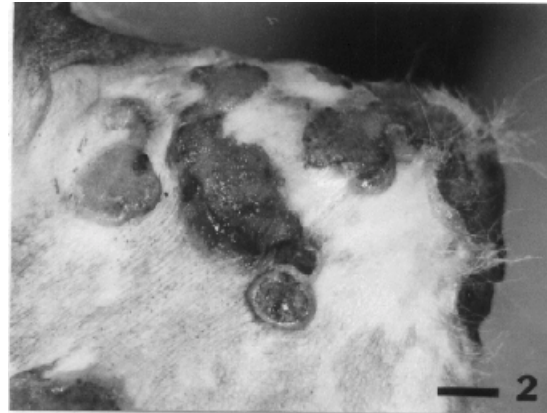
ผลการย้อมสีชนิดต่างๆ การติดสีย้อมชนิดต่างๆ ของแกรนูลที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของมาสท์เซลล์ โดยย้อมด้วย สี Luna พบแกรนูลติดสีม่วงแดง นิวเคลียสและเนื้อเยื่ออื่นๆติดสีเหลือง (รูปที่ 8) สี Unna พบแกรนูลติดสีม่วงเข้มและนิวเคลียสติดสีฟ้าเข้ม เนื้อเยื่ออื่นๆติดสีฟ้า (รูปที่ 9) สี Giemsa การติดสีของ แกรนูลเป็นสีม่วงและนิวเคลียสติดสีฟ้าอ่อน เนื้อเยื่อ อื่นๆติดสีน้ำเงินอ่อนหรือไม่ติดสี (รูปที่ 10) สี toluidine blue การติดสีของแกรนูลเป็นสีม่วงเข้ม นิวเคลียสและ เนื้อเยื่ออื่นๆติดสีฟ้า (รูปที่ 11) สี alcian blue/safranin พบแกรนูลติดสีฟ้า น้ำเงินและนิวเคลียสติดสีชมพูเข้ม เนื้อเยื่ออื่นๆติดสีชมพูอ่อน (รูปที่ 12)

เปรียบเทียบผลบวกต่อการย้อมสีชนิดต่างๆ ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่าสี alcian blue/safranin ให้ ผลบวกมากที่สุด คิดเป็น 81%(38/47) สี Luna, Unna, Giemsa และ toluidine blue คิดเป็น 64%(30/47), 68%(32/47), 70%(33/47) และ 72%(34/47) ตาม ลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1)

สีย้อมที่ช่วยในการวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสท์ เซลล์ได้ดีในเกรด 3 คือสี alcian blue/safranin และสี Unna โดยให้ผลบวกคิดเป็น 67%(2/3) และสี alcian blue/safranin ที่ให้ผลบวกมากที่สุดทุกเกรด ดังนี้ เกรด 1 เกรด 2 และเกรด 3 จำนวน 70%(7/10) 85% (29/34) และ 67%(2/3) ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ที่ปลายขาหน้าซ้าย โดยมีลักษณะเป็นก้อนบวมแดงและมีแผลเปิด (bar=1.2 cm)



รูปที่ 2 แสดงเนื้องอกที่บริเวณขาหลังซ้ายที่มีลักษณะเป็นแผลขอบนูน กระจายเป็นแนวกว้างร่วมกับเนื้อตายบริเวณขอบ (bar=1.5 cm)



รูปที่ 3 แสดงก้อนเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ที่มีการแพร่กระจายทั่วตัว (bar=12.5 cm)



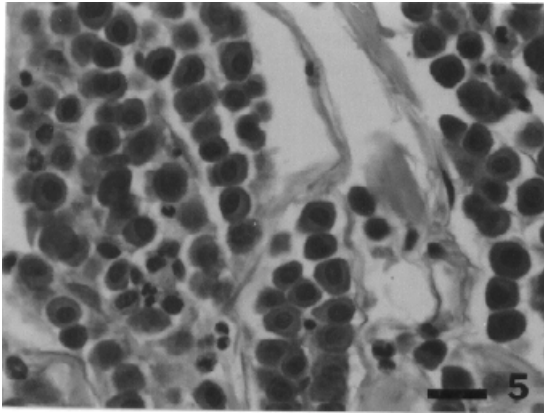
รูปที่ 4 แสดงเนื้องอกเป็นก้อนนูนแดงและไม่พบแผลเปิดบริเวณลำตัว จากรูปที่ 3 (bar=2 cm)

การติดตามผลภายหลังจากการผ่าตัดเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ของสุนัข จำนวนทั้งสิ้น 10 ตัว ประกอบด้วย ข้อมูลทางคลินิก การแบ่งเกรดตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา จำนวน AgNORs และ PCNA รวมทั้ง recurrent และ survival time ของเนื้องอก (ตารางที่ 2)

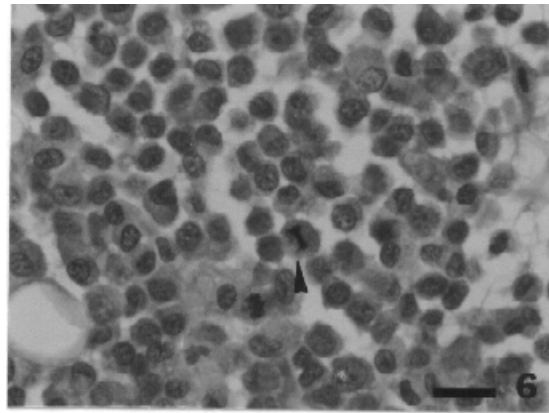
ในการนับจำนวน AgNORs จะมองเห็นเป็นจุดสีดาซึ่งพบอยู่ในนิวคลีโอลัสหรือกระจายอยู่ในนิวเคลียสของมาสต์เซลล์ (รูปที่ 13-14) สำหรับจำนวน AgNORs ในเกรด 1 เกรด 2 และเกรด 3 มีค่าเท่ากับ 1.54 ± 0.42 ,

2.14 ± 0.53 และ 2.33 ± 0.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และพบว่าในเกรด 1 ของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์มีความแตกต่างจากเกรด 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเกรด 2 และ 3

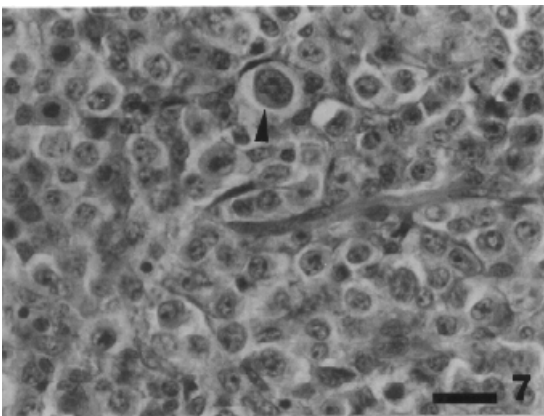
มาสต์เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ anti-PCNA จะพบการติดสีน้ำตาลแดงภายในนิวเคลียส (รูปที่ 15-16) สำหรับจำนวนของ PCNA ในแต่ละเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ นั้นพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัย



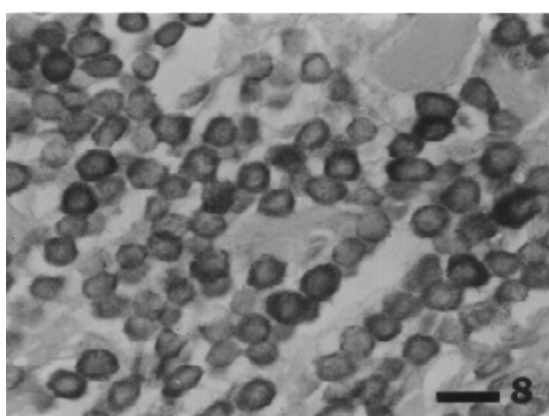
รูปที่ 5 Well differentiated mast cell tumor พบมาสต์เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นแถวตามแนวเส้นใยคอลลาเจน ลักษณะ monomorphic และพบการแทรกตัวของเซลล์ eosinophil, H&E (bar=25 μ m)



รูปที่ 6 Moderately differentiated mast cell tumor; pleomorphic มาสต์เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยพบลักษณะ vesicular nuclei ร่วมกับ นิวคลีโอลัสเด่นชัด และพบ mitotic cell (ลูกศร) H&E (bar=25 μ m)



รูปที่ 7 Poorly differentiated mast cell tumor; highly pleomorphic มาสต์เซลล์ และพบ tumor giant cell (ลูกศร) ร่วมกับ mitotic cell จำนวนมาก, H&E (bar=25 μ m)



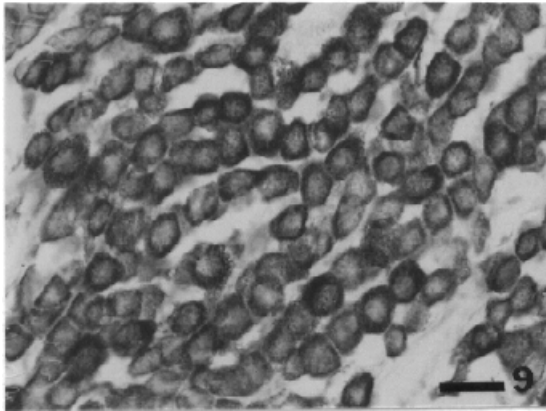
รูปที่ 8 เนื้อออกซนิคมาสต์เซลล์ พบแกรนูลดิสสีม่วง-แดง Luna's method (bar=25 μ m)

สำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการย้อมฮิสโตเคมีชนิด AgNORs ของเนื้องอกเกรด 1 เกรด 2 และเกรด 3 โดยมีค่าเท่ากับ 15 ± 16.9 , 251 ± 354.0 และ 215 ± 114.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

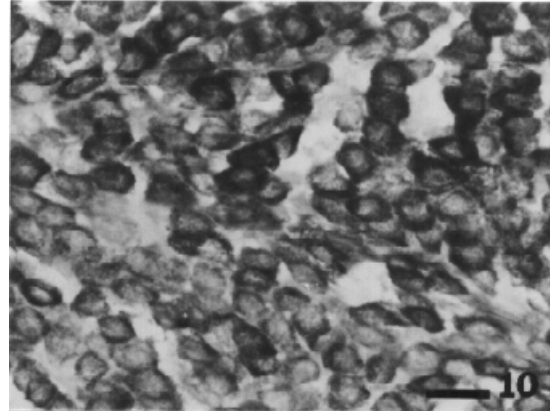
วิจารณ์

การแบ่งเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาสามารถนำมาใช้ในการ

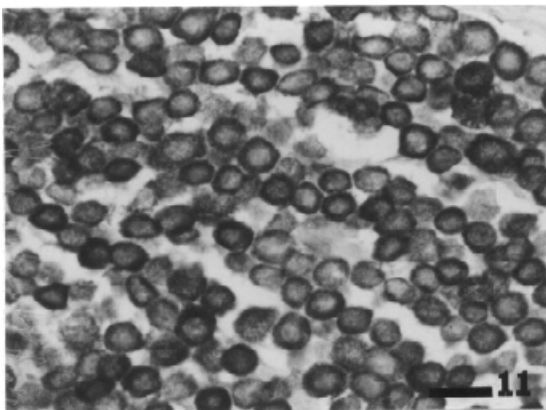
พยากรณ์โรคได้ โดยพบว่าระยะการมีชีวิตรอดของสุนัขในเกรด 3 จะน้อยลงในเกรด 1 และ 2 (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Ginn et al., 2000) สำหรับอายุ พันธุ์ และเพศพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ โดยตำแหน่งที่มักพบเนื้องอก คือ บริเวณลำตัวและขา พบน้อยที่บริเวณหัวและคอ และอาจพบได้ที่เยื่อตาขาวและกล่องเสียง (Simoes et al., 1994) ในลูกสุนัขที่เกิดเนื้องอกชนิด



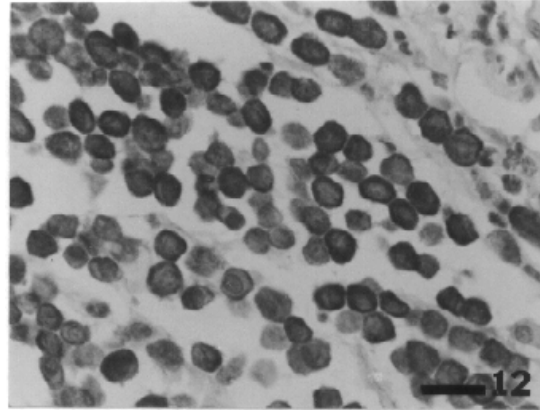
รูปที่ 9 เนื้อออกซินดมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีม่วงเข้ม Unna's method (bar=25 μ m)



รูปที่ 10 เนื้อออกซินดมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีม่วง Giemsa staining (bar=25 μ m)



รูปที่ 11 เนื้อออกซินดมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีม่วงเข้ม, toluidine blue staining (bar=25 μ m)

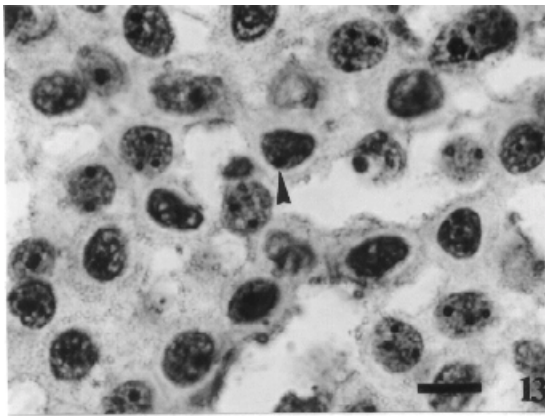


รูปที่ 12 เนื้อออกซินดมาสต์เซลล์ พบแกรนูลติดสีฟ้า-น้ำเงิน alcian blue/safranin staining (bar=25 μ m)

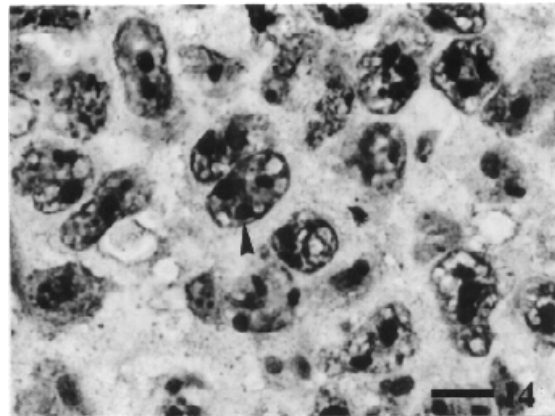
มาสต์เซลล์ ก้อนเนื้ออกมีพฤติกรรมเชิงชีวภาพที่ต่างจากในสุนัขโต โดยก้อนเนื้ออกอาจยุบหายได้ (Davis et al., 1992)

สีย้อมชนิดต่างๆ สามารถใช้ในการวินิจฉัยเนื้อออกซินดมาสต์เซลล์ได้ดีในเกรด 1 และ 2 เพราะเซลล์ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปมากและมีแกรนูลอยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนเกรด 3 จำนวนมาสต์เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมสีจะลดลงอย่างมาก เนื่องจากมาสต์เซลล์มี

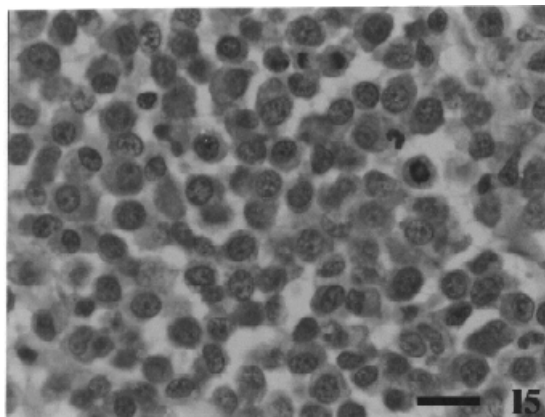
ความเข้มข้นของสารจำพวก biogenic amines ลดลงและการติดสีมีความจำเพาะต่อสารจำพวก biogenic amines และ heparin ที่อยู่ภายในแกรนูลของมาสต์เซลล์ การศึกษาถึงระดับ pH ของสีย้อมชนิด toluidine blue พบว่าในทางการแพทย์อาจช่วยในการพยากรณ์ความรุนแรงได้ โดยพบว่ารอยโรคที่มีความรุนแรงมีการติดสีดีขึ้นเมื่อ pH มากกว่า 3.5 ส่วนรอยโรคที่ไม่รุนแรงจะติดสีที่ pH ต่ำกว่านี้ได้ แต่ในสุนัขไม่พบความแตกต่าง



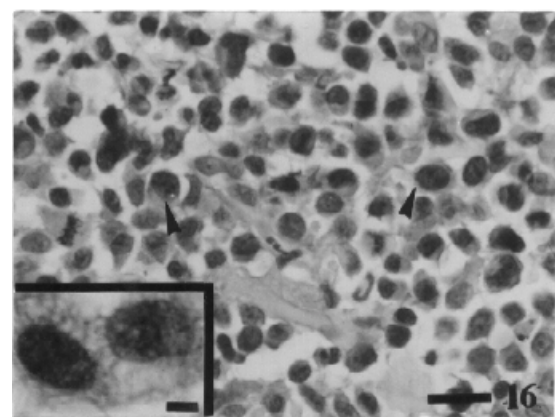
รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งของ AgNORs ที่อยู่ภายในนิวเคลียสของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ (ลูกศร) จาก moderately differentiated mast cell tumor, AgNORs (bar=10 μ m)



รูปที่ 14 แสดงตำแหน่งของ AgNORs ที่อยู่ภายในนิวเคลียสของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ (ลูกศร) จาก poorly differentiated mast cell tumor, AgNORs (bar=10 μ m)



รูปที่ 15 Moderately differentiated mast cell tumor, H&E (bar=25 μ m)



รูปที่ 16 แสดงการติดสีน้ำตาลส้ภายในนิวเคลียสของมาสต์เซลล์ (ลูกศร) และรูปขยายมาสต์เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ anti-PCNA (bar=5 μ m), ABC method, ย้อมทับด้วยสี Mayer's hematoxylin

เพราะผลบวกของการติดสี toluidine blue ที่ pH ต่างกันมีค่าเท่ากัน สำหรับวิธีอื่นๆที่นำมาใช้เพื่อช่วยในการวินิจฉัยเช่นการย้อมอิมมูโนโนฮิสโตเคมีที่จำเพาะต่อ avidin peroxidase และ Kappa chain 1 เพื่อวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ พบว่าไม่มีความแตกต่างจากสีย้อมในการศึกษาครั้งนี้ (Klatt et al., 1983; Bolon and Mays Calderwood, 1988; Simoes and Schoning, 1994) อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สีย้อมแต่ละชนิดเพื่อวินิจฉัยเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ไม่มีความแตกต่างกันทั้งความ

จำเพาะและความเข้มของการติดสี แต่มีข้อสังเกตว่าสี alcian blue/safranin อาจใช้ในการแบ่งเกรดของเนื้องอกได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามการพยากรณ์โรคควรพิจารณาพร้อมกับข้อมูลทางคลินิกและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

จากการศึกษาพบว่าจำนวน AgNORs และ PCNA ของเซลล์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในเกรด 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานกว้างและจำนวนตัวอย่างเนื้องอกที่ศึกษาน้อย แต่ถ้าจำนวน

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลบวกต่อการย้อมสีชนิดต่างๆ ในแต่ละเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์

สีย้อม	เกรดทางจุลพยาธิวิทยา			
	เกรด 1	เกรด 2	เกรด 3	รวม
Luna	70%(7/10)	65%(22/34)	33%(1/3)	64%(30/47)
Unna	70%(7/10)	68%(23/34)	67%(2/3)	68%(32/47)
Giemsa	70%(7/10)	74%(25/34)	33%(1/3)	70%(33/47)
Toluidine blue	70%(7/10)	76%(26/34)	33%(1/3)	72%(34/47)
Alcian blue/safranin	70%(7/10)	85%(29/34)	67%(2/3)	81%(38/47)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวน AgNORs และ PCNA ในแต่ละเกรดของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์จำนวน 47 ตัวอย่าง

	เกรดทางจุลพยาธิวิทยา		
	เกรด 1(n=10)	เกรด 2(n=34)	เกรด 3(n=3)
AgNORs	1.54 ± 0.42 ^a	2.14±0.53 ^b	2.33±0.72 ^b
PCNA	15±16.9 ^a	251±354.0 ^b	215±114.1 ^b

^{a, b} ข้อมูลในบรรทัดเดียวกันที่มีตัวกไม่เหมือนกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p< 0.05)

ตัวอย่างที่ศึกษาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในเกรด 3 จำนวน AgNORs และ PCNA ในเกรด 2 และ 3 ของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์น่าจะมีแนวโน้มที่มีความแตกต่างกัน (Bostock et al., 1989; Simoes et al., 1994; Kravis et al., 1996)

AgNORs สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์ความร้ายแรงของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ และยังช่วยในการพยากรณ์โรคได้แม่นยำกว่าลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเนื่องจากจำนวนของ AgNORs มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในเนื้องอกที่มีความร้ายแรง เพราะการติดสีของ AgNORs แสดงถึงเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์ DNA เพื่อการแบ่งตัว และมีรายงานพบจำนวนของ AgNORs

เพิ่มสูงขึ้นในนิวเคลียสของมาสต์เซลล์ที่พบว่าเกิดเนื้องอกขึ้นอีกภายหลังการผ่าตัดรวมทั้งมีการกระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย และสุนัขมีชีวิตรอดน้อยลงรวมทั้งมีการศึกษาถึงการนับจำนวน AgNORs ของมาสต์เซลล์ที่ได้จากการทำ fine-needle aspiration biopsy พบว่าจำนวนของ AgNORs มีความผันแปรตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอก ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกได้และยังเป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย (Bostock et al., 1989; Simoes et al., 1994; Kravis et al., 1996) และการนำ AgNORs มาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์พบว่าจำนวน AgNORs ที่เพิ่มมากขึ้นมีความ

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลทางคลินิก histologic grade จำนวน AgNORs และ PCNA รวมทั้ง recurrent และ survival time ของเนื้องอกชนิดมาส์เซลล์

Dog No.	Breed	Sex	Age (yrs.)	Distribution	Histologic grade	AgNORs (dot/cell)	PCNA (cells/5HPF)	Treatment	Alive/Dead	Recurrent time (days)	Survival time (days)
1	Mixed	M	14	Solitary	I	1.69	22	-	Alive	150	540
2	Mixed	M	9	Solitary	I	1.20	54	-	Alive	-	510
3	Mixed	F	12	Multiple	I	1.22	7	-	Alive	-	660
4	Mixed	F	11	Multiple	II	2.73	24	T ₁	Dead	90	120
5	Shar Pei	F	7	Multiple	II	2.64	101	T ₁	Dead	60	120
6	Mixed	M	13	Multiple	II	2.41	585	T ₂	Dead	21	120
7	Mixed	F	9	Solitary	II	1.77	1287	T ₁	Dead	120	210
8	Mixed	F	11	Multiple	II	2.14	27	-	Dead	120	240
9	Mixed	F	<10	Multiple	III	1.51	84	-	Dead	180	360
10	Mixed	F	7	Multiple	III	2.87	293	-	Dead	-	7

หมายเหตุ : M: male, F: female, I: well differentiated, II: moderately differentiated, III: poorly differentiated

AgNORs: argyrophillic nucleolar organizer regions, PCNA: proliferating cell nuclear antigen

T₁: supportive treatment (prednisolone 2 mg/kg, orally)

T₂: chemotherapy treatment (vinblastine 2 mg/m², IV and lomustine 90 mg/m², orally combination with prednisolone 2 mg/kg, orally)

สัมพันธ์ผกผันกับระยะเวลาที่สุนัขมีชีวิตรอด (Thamm et al., 1999)

การย้อมimmunohistoเคมีที่จำเพาะต่อ PCNA สามารถช่วยในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ได้ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเนื้องอกเกรด 1 กับ 2 และ 3 และมีแนวโน้มสูงขึ้นตามเกรดของเนื้องอก เนื่องจากมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน PCNA ที่เพิ่มมากขึ้นต่อการเกิดเนื้องอกภายหลังการผ่าตัด การแพร่กระจาย และการมีชีวิตรอดของสุนัขที่เกิดเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ และเซลล์เนื้องอกที่ให้ผลบวกต่อ anti-PCNA เป็นเซลล์ที่อยู่ในช่วงกำลังแบ่งตัวหรือมีการซ่อมแซม DNA โดยจำนวน PCNA และ mitotic cell มีความสัมพันธ์กัน (McCormick and Hall, 1992; Simoes et al., 1994) จากการศึกษาครั้งนี้นักกล่าวได้ว่าค่า AgNORs และ PCNA มีแนวโน้มแปรตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ โดยมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเนื้องอกมีความร้ายแรง (malignancy) สามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามควรอาศัยข้อมูลทางคลินิกมาประกอบการพยากรณ์ด้วย เช่น ข้อมูลระยะเวลาในการเพิ่มขนาดระยะการเจริญของเนื้องอก ระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบและให้การรักษา และการเกิดเนื้องอกภายหลังการผ่าตัด รวมทั้งลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชเพื่อสนับสนุนทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ ปี พ.ศ. 2543 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมทักษะวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ ปีการศึกษา 2543 และ Central Laboratory ที่สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการศึกษาในครั้งนี้ ผศ. น. สพ. ดร. กฤษ อังคนาพร สำหรับงานทางด้านสถิติ ผศ. สพ. ญ. ดร.

มีนา สาริกะภูติ ให้คำแนะนำ ผศ. น. สพ. ดร. วิจิตร บรรณาราช ให้ความอนุเคราะห์ PCNA แอนติบอดี และคุณอมรรัตน์ ทศนกิจ ช่วยเหลืองานด้านห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Bancroft, J.D. and Stevens, A. 1996. Cytoplasmic granules, organelles and special tissues. In: Theory and Practice of Histological Techniques. J.D Bancroft., A. Stevens and D.R Turner (eds.) New York: Churchill Livingstone. 384-385.
- Bolon, B. and Mays Calderwood, M.B. 1988. Conjugated avidin-peroxidase as a stain for mast cell tumors. Vet. Pathol. 25: 523-525.
- Bostock, D.E. 1973. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. J. Small Anim. Pract. 14: 27-40.
- Bostock, D.E., Crocker, J., Harris, K. and Smith, P. 1989. Nuclear organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. Br. J. Cancer. 59: 915-918.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. and Macdonald-Bravo, H. 1987. Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase- δ . Nature. 326: 515-517.
- Crocker, J., Boldy, D.A.R. and Egan, M.J. 1989. How should we count AgNORs? proposals for a standardized approach. J. Pathol. 158: 185-185.
- Davis, B.J., Page, R., Sannes, P.L. and Meuten, D.J. 1992. Cutaneous mastocytosis in a dog. Vet. Pathol. 29: 363-365.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. 1979. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Vet. Pathol. 16: 673-679.

- Er, J.C. and Sutton, R.H. 1989. A survey of skin neoplasms in dogs from the Brisbane region. *Aust. Vet. J.* 66: 225-227.
- 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.
- Ginn, P.E., Fox, L.E., Brower, J.C., Gaskin, A., Kurzman, I.D. and Kubitlis, P.S. 2000. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 37: 33-39.
- Jaffe, M.H., Hosgood, G., Taylor, H.W., Kerwin, S.C., Hedlund, C.S., Lopez, M.K., Davidson, J.R., Miller, D.M. and Paranjpe, M. 2000. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 37: 40-46.
- Kamel, O.W., Lebrun, D.P., Davis, R.E., Berry, G.J. and Warnke, R.A. 1991. Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am. J. Pathol.* 138: 1471-1477.
- Klatt, E.C., Lukes, R.J. and Meyer, P.R. 1983. Benign and malignant mast cell proliferations: diagnosis and separation using a pH-dependent toluidine blue stain in tissue section. *Cancer.* 51: 1119-1124.
- 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 aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 1418-1420.
- Lester, S.J., McGonigle, L.F. and McDonald, G.K. 1981. Disseminated anaplastic mastocytoma with terminal mastocythemia in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17: 355-360.
- Lohr, C.V., Teifke, J.G., Failing, K. and Weiss, E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with post fixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.* 34: 212-221.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (3ed.) New York: McGraw-Hill. 114-117, 162-163.
- McCormick, D. and Hall, P.A. 1992. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology.* 21: 591-594.
- Owen, L.N. 1980. World Health Organization TNM Classification of Tumors in Domestic animals. In: *Clinical Veterinary Oncology.* Withrow S.J. and MacEwen E.G. (eds.) Philadelphia: J.B. Lippincott. 454-457.
- Patnaik, A.K., Ehler, W.J. and MacEwen, E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21: 469-474.
- Prelich, G., Tan, C-K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M. and Stillman, B. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature.* 326: 517-520.

- Rothwell, T.L.W., Howlett, C.R., Middleton, D.J., Griffiths, D.A. and Duff, B.C. 1987. Skin neoplasms of dogs in Sydney. Aust. Vet. J. 64: 161-164.
- Sandusky, G.E., Carlton, W.W. and Wightman, K.A. 1987. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. Vet. Pathol. 24: 495-499.
- Simoes, J.P.C. and Schoning, P. 1994. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 458-465.
- 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.
- Takahashi, T., Kadosawa, T., Nagase, M., Matsunaga, S., Mochizuki, M., Nishimura, R. and Sasaki, N. 2000. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). J. Am. Vet. Med. Assoc. 216: 222-226.
- Thamm, D.H., Mauldin, E.A. and Vail, D.M. 1999. Prednisolone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor-41 cases (1992-1997). J. Vet. Intern. Med. 13: 491-497.