

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: [www.vet.mut.ac.th/journal\\_jmvm](http://www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm)

## เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ในผิวหนังสุนัข: การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค

อารยา สืบขำเพชร<sup>1, #</sup><sup>1</sup>ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

**บทคัดย่อ:** Mast cell tumor เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยในผิวหนังของสุนัข ลักษณะที่ปรากฏและพฤติกรรมของเนื้องอกมีความแปรผันจึงทำให้ยากต่อการรักษา การวินิจฉัย mast cell tumor ด้วยการตรวจเซลล์และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยานั้นทำได้โดยการตรวจดูลักษณะรูปร่างและการติดสีของเซลล์เป็นหลัก นอกจากนี้การย้อมเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคฮีสโตเคมีชนิดต่างๆ ยังสามารถให้ข้อมูลในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มขึ้นด้วย โดยย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีพิเศษและการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีของเอ็นไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามเนื้องอกที่มีพัฒนาการของเซลล์น้อยมากนั้นยังยากต่อการจำแนกชนิดของเซลล์ และมักทำให้เกิดความสับสนกับเนื้องอกในกลุ่ม round cell tumor ชนิดอื่นที่มีรูปร่างคล้ายกัน การวินิจฉัยจึงอาจผิดพลาดได้ เทคนิคทางอิมมูโนฮีสโตเคมีซึ่งใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์หรือตัวบ่งชี้ต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบจึงถูกนำมาใช้เพื่อประกอบการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคเนื้องอก บทความนี้ทบทวนลักษณะ mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข รวมทั้งการย้อมเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคฮีสโตเคมีและอิมมูโนฮีสโตเคมีชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค ซึ่งเมื่อนำมาประกอบกับข้อมูลทางคลินิกและตัวบ่งชี้อื่นๆ จะช่วยให้การวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมีความแม่นยำมากขึ้น ส่งผลต่อการวางแผนการรักษาและการเฝ้าระวังโรคที่มีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ:** เนื้องอกชนิดมาสต์เซลล์ ฮีสโตเคมี อิมมูโนฮีสโตเคมี การวินิจฉัยโรค ตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรค สุนัข

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2559. 11(2): 159-176.

E-mail address: [saraya@mut.ac.th](mailto:saraya@mut.ac.th)

## Canine cutaneous mast cell tumor: diagnosis and prognosis

Araya Suebkhampet<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,  
Bangkok 10530, THAILAND

**Abstract:** Mast cell tumors are the most common skin tumors of dog. Their appearance and biological behavior are variable, leading to frequent failure in treatment. Most mast cell tumors are routinely diagnosed by cytological and histological examination base on their morphological and staining characteristics. Others histochemical staining can give more information about their specific staining and enzyme activity. However, poorly differentiated mast cell tumors can be confused with other round cell tumors. Misdiagnosis and failure to identify the tumors might be circumstance. Immunohistochemistry has been used as an adjunct in the diagnosis and prognosis of neoplasms, including mast cell tumors. This article reviews the features of canine cutaneous mast cell tumors, as well as various histochemical and immunohistochemical stains used for their capability to diagnosis and prognosis. Together with clinical information and other prognostic indicators, these will support treatment planning and tumor monitoring properly.

**Keywords:** Mast cell tumor, Histochemistry, Immunohistochemistry, Diagnosis, Prognostic indicator, Canine

#Corresponding author

*J. Mahanakorn Vet. Med.* 2016. 11(2): 159-176.

E-mail address: [saraya@mut.ac.th](mailto:saraya@mut.ac.th)

### บทนำ

Mast cell จัดเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในร่างกายโดยเฉพาะบริเวณรอบๆ หลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท ระบบขับถ่ายปัสสาวะและสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และผิวหนัง ซึ่งเป็นบริเวณรอยต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย

(Abraham and Malaviya, 1997; Metcalfe, 1997)

ในสุนัขพบมากในผิวหนัง ปอด ระบบทางเดินอาหาร และตับ (O' Keefe, 1990) mast cell กำเนิดมาจาก CD34 progenitor cells ในไขกระดูก เมื่อถูกปล่อยจากไขกระดูกออกมาสู่เนื้อเยื่อแล้วจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มวัย (Kitamura and Fujita, 1989) เซลล์มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการ

อีกเสบ กลไกการป้องกันตัวของร่างกายโดยเฉพาะ การแพ้ (allergy) และภาวะภูมิแพ้ (anaphylaxis) ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดจากฤทธิ์ของสารที่บรรจุอยู่ใน แกรนูลของ mast cell ได้แก่ ฮีสตามีน เฮปาริน ซีโร โทนิ น proteases ไฮโดรโคโค น์ eosinophilic chemotactic factor และ เมตาโบไลต์ ของ arachidonic acid (Prussin and Metcalfe, 2003) เซลล์จะถูกกระตุ้นให้หลั่งสารจากปัจจัยต่างๆ อาทิ ความร้อน บาดแผล สารพิษ หรือกลไกในระบบ ภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น การจับกันระหว่าง antigen-specific IgE กับ IgE receptor ที่ผิวของ mast cell เป็นต้น (Beaven and Metzger, 1993) เมื่อย้อม mast cell ด้วยสี Romanowsky หรือ Toluidine blue แกรนูลของเซลล์จะติดสีม่วง (metachromasia) เนื่องจากปฏิกิริยาของสีที่เข้าไป จับกับเฮปารินซึ่งเป็น proteoglycan ที่พบมากใน แกรนูลของ mast cell (Huntley, 1992; Bancroft and Gamble, 2008) mast cell ในสุนัขแบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย ตามเอ็นไซม์ chymase และ tryptase ซึ่ง พบจำเพาะในแกรนูลของ mast cell เท่านั้น ได้แก่ ชนิดที่แกรนูลบรรจุ chymase เพียงอย่างเดียว ชนิด ที่แกรนูลบรรจุ tryptase เพียงอย่างเดียว และชนิดที่ แกรนูลบรรจุทั้ง chymase และ tryptase ซึ่ง mast cell ชนิดสุดท้ายนั้นพบบ่อยที่สุดในผิวหนังสุนัข (Kube et al., 1998) โดยบทบาทของ chymase และ tryptase นั้นเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิด การสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) ของเนื้องอก (de Souza Junior, 2015) ซึ่งมีผลต่อการเติบโตและการ พัฒนาของเนื้องอก

Mast cell tumor หรือ mastocytoma จัด อยู่ในกลุ่มของ round cell tumor เป็นเนื้องอกที่พบ ได้ ประมาณร้อยละ 7-25 ของเนื้องอกผิวหนังสุนัข

และพบได้ทุกตำแหน่งของผิวหนัง อย่างไรก็ตาม สามารถพบเนื้องอกชนิดนี้ได้ในลำไส้ ตับ และม้าม ด้วย แต่มีอุบัติการณ์ที่น้อยกว่า อีกชนิดหนึ่งคือ mast cell leukemia ซึ่งเป็นกรณีที่พบเกิดขึ้นน้อยมาก (Dorn et al., 1968; Pakhrin et al., 2007) โดย ความเสี่ยงของการเกิดเนื้องอกจะเพิ่มขึ้นในสุนัข สูงอายุเฉลี่ยประมาณ 8 ปี นอกจากนี้พันธุ์สุนัขยังเป็น ปัจจัยโน้มนำให้เกิดอุบัติการณ์ของเนื้องอกเพิ่มขึ้น ด้วย ซึ่งพบได้บ่อยในพันธุ์บ็อกเซอร์ บอสตันเทอร์เรีย บลูต็อก ลาบราดอร์ โกลเด้นรีทรีฟเวอร์ ชาไป่ ปีก อย่างไรก็ตามเพศของสุนัขไม่มีความเกี่ยวข้องกับ อุบัติการณ์ของการเกิดเนื้องอก (Goldschmidt and Shofer, 1992) ลักษณะทางชีววิทยาของโรคเนื้องอก mast cell มีความแปรผันค่อนข้างสูง รวร้อยละ 50 เป็นชนิดเนื้อร้าย ซึ่งอัตราการกลับมาเป็นซ้ำ และ/ หรือแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง สูงถึงร้อยละ 80 (Simoes et al., 1994) mast cell tumor อาจเป็นสาเหตุให้สัตว์เสียชีวิตได้เนื่องจาก ความผิดปกติอันเป็นผลกระทบบจากปฏิกิริยาของเนื้องอก (paraneoplastic disorder) ได้แก่ ภาวะภูมิแพ้ แบบ anaphylaxis หรือเกิดแผลหลุมและแผลทะลุ ในกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งผลต่อระบบทางเดิน อาหารพบได้ถึงร้อยละ 80 ของสุนัขที่เป็น mast cell tumor ซึ่งเกิดจากฤทธิ์ของฮีสตามีนที่หลั่งมาจาก เซลล์เนื้องอก (Howard et al., 1969) อย่างไรก็ตาม อาการรุนแรงที่อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตนั้นมักพบในรายที่เป็นเนื้อร้าย ลักษณะของ mast cell tumor ที่ ผิวหนังเริ่มต้นมักพบเป็นก้อนเดี่ยว ค่อนข้างนุ่ม มัก ไม่แข็งเป็นไตและยึดติดแน่น low-grade tumor มีการเจริญเติบโตช้า หากทิ้งไว้นานอาจพัฒนาเป็นเนื้องอกที่มีความร้ายแรงมากขึ้น อาจพบแผลหลุมร่วมกับการอักเสบวมแดงของเนื้องอกและเนื้อเยื่อบริเวณ

รอบๆ หากเป็นระยะที่มีแพร่กระจายแล้ว ก้อนเนื้องอกจะโตเร็วและขนาดใหญ่ขึ้น มีขอบเขตไม่ชัดเจน อาจพบตุ่มเล็กๆ กระจายที่ผิวหนังรอบๆ ก้อนเนื้องอกขนาดใหญ่ บางรายพบมีเลือดไหลออกมาจากก้อนเนื้อเหล่านั้น (Dobson and Scase, 2007) การรักษาโดยการผ่าตัดโดยทั่วไปจะต้องตัดห่างจากก้อนเนื้ออย่างน้อย 3 เซนติเมตร และพิจารณารักษาด้วยเคมีบำบัด หรือฉายรังสีร่วมด้วย ในกรณีที่การพยากรณ์โรคไม่ดี (Misdrop, 2004)

การวินิจฉัย mast cell tumor ที่ผิวหนังสุนัขนั้นนอกจากการตรวจร่างกายทางคลินิกแล้ว ยังต้องอาศัยการตรวจเซลล์หรือเนื้อเยื่อทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย เพื่อวินิจฉัยแยกจากเนื้องอกผิวหนังชนิดอื่น โดยเฉพาะเนื้องอกในกลุ่ม round cell tumor อาทิ lymphoma, plasmacytoma, melanoma, histiocytoma และ transmission venereal tumor (TVT) ซึ่งมีรูปร่างของเซลล์คล้ายคลึงกัน (Duncan and Prasse, 1979) และช่วยในการแยกกลุ่มของเนื้องอกว่าเป็นเนื้องอกธรรมดา (benign tumor) หรือเนื้องอกร้าย (malignant tumor) ซึ่งเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ามะเร็ง (cancer) ผลการตรวจดังกล่าวมีความสำคัญต่อการวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรค เพื่อประกอบการตัดสินใจของนายสัตวแพทย์ผู้ทำการรักษาในการเลือกแนวทางการรักษาที่เหมาะสม การตรวจวินิจฉัยเซลล์หรือเนื้อเยื่อทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันมี 2 วิธี ได้แก่ การตรวจทางเซลล์วิทยา (cytological examination) และการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological examination) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน แต่วิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะให้ข้อมูลในการวินิจฉัยที่สมบูรณ์มากกว่า สามารถพยากรณ์โรคและตรวจการ

แพร่กระจายของเนื้องอกได้ อย่างไรก็ตามการตรวจวินิจฉัยโรคเนื้องอกต่างๆ โดยอาศัยการตรวจทั้ง 2 วิธีดังกล่าว รวมทั้งการย้อมสีพิเศษ (special stain) ในบางกรณีก็ไม่สามารถจำแนกชนิดของเซลล์ได้อย่างแน่ชัด เช่น เนื้องอกที่มีพัฒนาการต่ำ (poorly differentiated tumor) เป็นต้น จึงได้มีการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) มาช่วยในการตรวจวินิจฉัย โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เนื้องอก นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบตัวบ่งชี้ (indicator) ในการพยากรณ์โรคได้ด้วย บทความนี้ได้ทบทวนแนวทางการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขที่มีการใช้ในปัจจุบัน

#### พยาธิกำเนิดของ mast cell tumor

สาเหตุของการเกิด mast cell tumor ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากสาเหตุหลายอย่างร่วมกัน (multi-factorial) เช่นเดียวกับการเกิดเนื้องอกชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีข้อมูลสนับสนุนว่าพันธุกรรมมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด mast cell tumor (Dobson and Scase, 2007) จากการศึกษาโดย London *et al.* (1996) พบว่า stem cell factor receptor (KIT) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิด mast cell tumor ในสุนัข KIT จัดเป็น surface growth factor receptor ที่ปรากฏอยู่บน haematopoietic cell และ mast cell ซึ่งถอดรหัสมาจาก proto-oncogene *c-kit* (Galli *et al.*, 1994) โมเลกุลประกอบด้วย extracellular ligand-binding, transmembrane region และ cytoplasmic tail ซึ่งมี tyrosine kinase activity การกระตุ้น KIT signal transduction pathway ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวน การเจริญเต็มวัย

(maturation) การเคลื่อนตัว (migration) และการอยู่รอดของ haematopoietic stem cells และ mast cell (Linnekin *et al.*, 1997; Serve *et al.*, 1995) ลิแกนด์ของ KIT คือ stem cell factor เป็นที่รู้จักในนาม steel factor หรือ mast cell growth factor (Nocka *et al.*, 1990) จากการศึกษานักวิจัยหลายท่านพบการแสดงออก (expression) ของ KIT ทั้งใน mast cell ปกติและ mast cell tumor ของสุนัข แต่จะพบมากขึ้นใน mast cell tumor ชนิด poorly differentiated (London *et al.*, 1996; Morini *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 2006a; Kiupel *et al.*, 2004) การแสดงออกของ KIT ใน mast cell ปกติ และ mast cell tumor ในสุนัขที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* นั้นมีความแตกต่างกัน โดยจะพบการแสดงออกของ KIT บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และในไซโทพลาซึม ตามลำดับ โดยการแสดงออกของ KIT ในไซโทพลาซึมนั้นพบว่ามีสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคทางคลินิกต่ำ (Webster *et al.*, 2007) มีรายงานการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่า mast cell tumor ในสุนัขที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* พบประมาณร้อยละ 15 ถึง 40 และมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเป็นเนื้องอกที่มีความร้ายแรงมากขึ้น การกลายพันธุ์เกิดได้หลากหลายรูปแบบโดยเฉพาะที่ axon 11 รวมทั้ง point mutation ต่างๆ และ tandem duplication ในบริเวณ juxtamembrane coding region (Downing *et al.*, 2002; Zemke *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004; Riva *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2006b) แต่ไม่พบที่บริเวณอื่น ซึ่งต่างจากในเนื้องอก mast cell ในคนที่มักพบการกลายพันธุ์ที่ *c-kit* kinase region (Furitsu *et al.*, 1993) จากการศึกษาโดย Gleixner *et al.* (2007) ซึ่งทดสอบใช้

ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะต่อ KIT tyrosine receptor ต่อเซลล์ไลน์ของ mast cell tumor ของสุนัขและ mast cell จากเนื้องอก พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทดสอบได้ แม้ว่า mast cell tumor มากกว่าร้อยละ 60 ที่นำมาศึกษาดังกล่าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของ *c-kit* แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของ *c-kit* มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญหรือพัฒนาของเนื้องอก mast cell เพียงบางส่วน แต่การกลายพันธุ์ของยีนในส่วนอื่นๆ มีแนวโน้มว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเริ่มต้น (initiation) และการพัฒนาของ mast cell tumor ส่วนใหญ่ (Welle *et al.*, 2008)

#### การตรวจทางเซลล์วิทยา

การตรวจทางเซลล์วิทยาเป็นการตรวจวินิจฉัยในเบื้องต้น โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์จากก้อนเนื้องอกด้วยการเจาะดูด (fine-needle aspirates: FNAs) หรือกอดส่วนของก้อนเนื้องอกลงบนแผ่นสไลด์ นำมาตรึงสภาพและย้อมสีเพื่อตรวจทางเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด และมีความปลอดภัยสามารถวินิจฉัยเซลล์ที่มีเอกลักษณ์ได้ สีที่ใช้ย้อม mast cell มีหลายชนิด เช่น Toluidine blue สีในกลุ่ม Romanowsky-type stain หรือ New methylene blue

Toluidine blue เป็นสีย้อมในกลุ่ม thiazine ซึ่งมีคุณสมบัติไปจับเฉพาะกับส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่เป็นกรด ได้แก่ ซัลเฟต คาร์บอกซิเลท phosphate radical ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ (Epstein *et al.*, 1992) จัดเป็นสีที่เป็นตัวเลือกที่ดีในการตรวจวินิจฉัย mast cell โดยแกรนูลของ mast cell ย้อมติดสีน้ำเงินในเนื้องอกที่มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ (well-differentiated

tumor) ส่วนแกรนูลขนาดเล็กละเอียดซึ่งมักพบในเซลล์ของ mast cell tumor ในเกรดที่สูงขึ้นย้อมติดสีม่วง (Simoes and Schoning, 1994) มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบการย้อมสี 4 ชนิดเพื่อตรวจหา mast cell ซึ่งเก็บจาก bronchoalveolar lavage fluid ของม้าซึ่งเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ พบว่าบางครั้งสี toluidine blue ย้อมติดสีม่วงในส่วนของแกรนูลในแมคโครฟาจได้ด้วยซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามสามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ได้โดยแกรนูลของเซลล์แมคโครฟาจจะมีขนาดใหญ่กว่าและพบแวคิวโอลในไซโทพลาซึม (Leclere *et al.*, 2006)

สีย้อมในกลุ่ม Romanowsky-type stain มีหลายชนิด ได้แก่ Wright's stain, Giemsa's stain, Wright-Giemsa stain, Wright-Leishman stain, May-Grünwald Giemsa stain และ Diff-Quick เป็นต้น ซึ่งจะย้อมติดแกรนูลของ mast cell เป็นม่วงน้ำเงินหรือม่วง (O'Keefe, 1990) mast cell ที่ตรวจทางเซลล์วิทยาส่วนใหญ่สามารถวินิจฉัยได้ไม่ยากนัก โดยเซลล์มีรูปร่างกลม ไซโทพลาซึมปริมาณปานกลาง แกรนูลที่ย้อมติดสีมีจำนวนและขนาดต่างๆ กัน นิวเคลียสกลม บางครั้งนิวเคลียสอาจถูกบดบังด้วยแกรนูลซึ่งติดสีเข้ม อาจพบเซลล์ชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น อีโอซิโนฟิล นิวโทรฟิล ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์รูปกระสวยซึ่งอาจเป็นไฟโบรบลาสต์ อย่างไรก็ตามพบว่า mast cell บางส่วนที่แกรนูลย้อมไม่ติดสี Diff-Quick ซึ่งอาจพบได้ในการย้อมเซลล์เนื้องอกที่มีพัฒนาการต่ำ เซลล์มีแกรนูลปริมาณไม่มาก กรณีนี้ควรเพิ่มเวลาในการตรึงสภาพเซลล์ หรือใช้สี Giemsa, Wright-Giemsa stain หรือ Toluidine blue ในการย้อมเซลล์แทนซึ่งให้ผลการย้อมแกรนูลที่เห็นได้ชัดเจนมากขึ้น (London and Segun, 2003)

นอกจากสีดังกล่าวแล้วยังมีสีชนิดอื่นๆ เช่น Panoptic stain ซึ่งมีส่วนผสมของ Romanowsky stain (azure B) กับสีย้อมตัวอื่น ได้แก่ hematoxylin และ phloxine B ซึ่งช่วยปรับปรุงการติดสีแกรนูลในไซโทพลาซึมและส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ให้ดีขึ้น มีวิธีการย้อมที่ทำได้รวดเร็วและราคาถูก (Kurz and Wittekind, 2001) แกรนูลของ mast cell ย้อมติดสีม่วง (metachromasia) เมื่อย้อมด้วยสีชนิดนี้ (Strefezzi *et al.*, 2009) การใช้สีในกลุ่ม Romanowsky-type stain มีข้อได้เปรียบตรงที่สีย้อมติดเซลล์เม็ดเลือดในตัวอย่างด้วยซึ่งจะช่วยในการแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดเพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการตรวจวินิจฉัย นอกจากนี้ยังมีสีและวิธีการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทางฮิสโตเคมีอีกหลายชนิด ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำสอบได้ การติดสีส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับปริมาณเฮปารินหรือสารประกอบ glycosaminoglycans (GAGs) ชนิดอื่นๆ (Walls *et al.*, 1990) รวมทั้ง esterase เอ็นไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในแกรนูลของ mast cell (Leader, 1979) จากการศึกษาโดย Simoes and Schoning (1994) พบว่าการย้อมเนื้อเยื่อ mast cell tumor ด้วย toluidine blue, Luna's method, alcian blue, Safarin O, Unna's method และ Geimsa ให้ผลการติดสีดีใน mast cell ปกติและ mast cell ที่มีพัฒนาการใกล้เคียงเซลล์ปกติ

การตรวจวินิจฉัยเนื้องอกทางเซลล์วิทยานั้น หากไม่พบเซลล์เนื้องอกก็ไม่อาจสรุปว่าสัตว์ป่วยไม่เป็นเนื้องอกเพราะตัวอย่างเซลล์ที่เก็บมานั้นอาจไม่ได้เก็บเซลล์ที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งขึ้นกับตำแหน่งและวิธีการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ต้องใช้ความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ตรวจในการจำแนกชนิดของเซลล์ด้วย การตรวจทางเซลล์วิทยาส่วนใหญ่สามารถ

วินิจฉัยโรค mast cell tumor ในสุนัขได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการประเมินการรักษาในเบื้องต้น จากการศึกษาย้อนหลังโดย Duncan and Prasse (1979) พบว่าผลการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor ด้วยเซลล์วิทยาและจุลพยาธิวิทยานั้นมีความสอดคล้องกันค่อนข้างมากคิดเป็นร้อยละ 94 ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา การตรวจทางเซลล์วิทยานั้นควรทำก่อนการผ่าตัดเนื้องอกผิวหนังในครั้งแรก เพื่อช่วยในการ

ประเมินความกว้างของแผลผ่าตัดให้เหมาะสมกับเกรดของเนื้องอกในเบื้องต้น แม้ว่าในบางกรณีวิธีนี้จะสามารถระบุ degree of differentiation ของเนื้องอกได้ แต่ไม่สามารถบอกความรุนแรงหรือเกรดของมะเร็งได้ครอบคลุม ดังนั้นควรส่งตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาควบคู่ไปด้วย (Dobson and Scase, 2007)

### ตารางที่ 1 ชนิดสีย้อม mast cell และผลการติดสีแกรนูล

สีย้อมหรือปฏิกิริยาเคมี	ผลลัพธ์
Toluidine blue	สีน้ำเงินหรือสีม่วง
Romanowsky-type stain (Wright's stain, Giemsa's stain, Wright-Giemsa stain, Wright-Leishman stain, May-Grünwald Giemsa stain และ Diff-Quick)	สีน้ำเงิน-ม่วงน้ำเงิน-ม่วง
Alcian blue	เขียวอมน้ำเงิน (bluish-green)
Azure A	สีแดง
Panoptic stain	สีม่วง
Thionine	สีน้ำเงินหรือสีแดง
Csaba's alcian blue safranin	สีม่วง-แดง
Aldehyde fuchsin	สีเหลือง-น้ำตาล
PAS	ไม่แน่นอน (variable)
Luna's method	สีม่วง
Unna's method	สีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วงเข้ม
Safranin O	สีน้ำตาลแดง (brick red)
Chloracetate esterase reaction (fast blue RR)	สีน้ำเงินเข้ม
Chloracetate esterase reaction (pararosanilin)	สีชมพูเข้ม-แดง
Avidin peroxidase	สีส้มแดง
WGA, Con-A	สีแดง-ส้ม

ที่มา: Bancroft and Gamble, 2008; Kurz and Wittekind, 2001; Simoes and Schoning, 1994.

### การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเป็นวิธีที่สามารถบอกระดับความรุนแรงของเนื้องอกได้โดยดูจากพัฒนาการของเซลล์ (cellular differentiation) การวินิจฉัย mast cell tumor ทางจุลพยาธิวิทยาในผิวหนังสุนัขส่วนใหญ่มักไม่ซับซ้อน เนื้องอกเป็นชนิดที่ไม่มีแคปซูลหุ้มแทรกอยู่ในชั้นหนังแท้ (dermis) หรือชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) รูปร่างของเซลล์เนื้องอกขึ้นกับระดับพัฒนาการของเซลล์ อย่างไรก็ตามเซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มีขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ แต่ละเซลล์บรรจุแกรนูลในปริมาณที่แตกต่างกัน เซลล์ที่มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติพบว่าแกรนูลติดสีม่วง (basophilic) ส่วนเซลล์ในระยะ intermediate หรือ มีพัฒนาการน้อยแกรนูลจะติดสีจางลง เมื่อย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (Simoes and Schoning, 1994) เมื่อย้อมด้วย toluidine blue จะติดสีคล้ายกับที่ได้กล่าวมาแล้วในการย้อมด้วยวิธีเซลล์วินิจฉัย อาจพบเส้นใยคอลลาเจนในสโตรมา (stroma) ปริมาณน้อยจนถึงมาก บางครั้งอาจพบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน จำนวนฮีโอซิโนฟิลที่พบผันแปรในแต่ละเนื้องอกซึ่งอาจพบกระจายทั่วไปหรืออยู่รวมกลุ่ม การจำแนก mast cell tumor ตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al.* (1984) ได้แก่ เกรด I (well-differentiated tumor) เซลล์มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ เกรด II (moderately-differentiated tumor) เซลล์มีพัฒนาการบางส่วนต่างจากเซลล์ปกติ และ เกรด III (poorly-differentiated tumor) เซลล์ส่วนใหญ่มีพัฒนาการ

ต่ำ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถใช้เกณฑ์นี้เป็นบรรทัดฐานในการแบ่งระยะของ mast cell tumor ทางจุลพยาธิวิทยาได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากการแบ่งเกรดเนื้องอกตามเกณฑ์ดังกล่าวมาจากการศึกษาย้อนหลังซึ่งมีจำนวนกลุ่มตัวอย่างไม่มากนัก นอกจากนี้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่านักพยาธิวิทยาอาจให้การวินิจฉัยที่แตกต่างกันจากการตรวจเนื้องอกเดียวกันด้วยเกณฑ์เดียวกันขึ้นกับประสบการณ์ของแต่ละบุคคลซึ่งมักเกิดในกรณีวินิจฉัยเนื้องอกเกรด II (Northrup *et al.*, 2005; Strefezzi *et al.*, 2003; Kiupel *et al.*, 2005) นอกจากนี้ mast cell tumor เกรด III ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดของเซลล์ หรือการตรึงสภาพเนื้อเยื่อที่ไม่ดีพออาจทำให้เกิดความสับสนต่อการวินิจฉัยแยกจาก round cell tumor ชนิดอื่น (Jackson, 1994) การย้อมเนื้อเยื่อ mast cell tumor ด้วยสีย้อมพิเศษให้ผลการย้อมที่ชัดเจนในกลุ่มเซลล์มีพัฒนาการใกล้เคียงกับเซลล์ปกติแต่ไม่สามารถใช้ได้กรณีที่เซลล์ส่วนใหญ่มีพัฒนาการต่ำซึ่งผลการย้อมมักติดสีจางลงหรือไม่ติดสีเลย (Simoes and Schoning, 1994) เนื่องจากเนื้องอกดังกล่าวมีสารในแกรนูลปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย สารที่เป็นองค์ประกอบหลักในแกรนูลคือเฮปารินซึ่งมักเป็นตัวทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสีย้อมโดยส่วนใหญ่ (Walls *et al.*, 1990) จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการใช้เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเข้ามาประกอบในการยืนยันการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor รวมถึงการพยากรณ์โรค แนวโน้มการตอบสนองต่อการรักษา และ พฤติกรรมของเนื้องอก (Fernandez *et al.*, 2005)



ตารางที่ 2 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ mast cell tumor ตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al.* (1984)

ลักษณะที่พบ	เกรด I	เกรด II	เกรด III
ตำแหน่งที่พบ	ชั้นหนังแท้	ชั้นหนังแท้ และชั้นใต้ผิวหนัง	ชั้นหนังแท้ ชั้นใต้ผิวหนัง และเนื้อเยื่อข้างเคียง
ความหนาแน่น	น้อย	ปานกลาง – มาก	มาก
การกระจายตัวของเซลล์	เซลล์เรียงเป็นแถว หรือเป็นกลุ่มเล็กๆ อยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน ขอบเขตเนื้องอกค่อนข้างชัด	เซลล์รวมเป็นกลุ่มอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน ขอบเขตเนื้องอกไม่ค่อยชัดเจน อาจพบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน	เซลล์เรียงเป็นแผ่นอยู่รวมกันจำนวนมาก ขอบเขตเนื้องอกไม่ชัดเจน พบการบวมน้ำหรือ hyalinization ของคอลลาเจน พบการบวมน้ำเลือดออก และเซลล์ตาย อาจพบแผลหลุม
ภาวะหลากหลายรูป (pleomorphism)	ต่ำ	ปานกลาง	สูง
รูปร่างเซลล์	รูปร่างกลม เห็นขอบเซลล์ชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมมีขนาดกลาง เซลล์เนื้องอกส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบเดียวกัน	รูปร่างกลม หรือรี เซลล์ส่วนใหญ่ยังเห็นขอบเขตชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมเล็กละเอียด อาจไม่พบแกรนูลในบางเซลล์ เซลล์รูปกระสวย และ giant mast cell กระจาย	รูปร่างหลากหลาย มีขนาดกลาง เซลล์กลม รี รูปกระสวย และ giant mast cell เห็นขอบเซลล์ไม่ชัดเจน แกรนูลในไซโทพลาซึมเล็กละเอียดมีปริมาณน้อย หรือไม่พบแกรนูลเลย
นิวเคลียส และ นิวคลีโอลัส	นิวเคลียสกกลม มีโครมาตินอยู่กันแน่น ไม่พบนิวคลีโอลัส	นิวเคลียสกกลมหรือเป็นรอยหยัก โครมาตินกระจายตัว พบนิวคลีโอลัส 1 อัน บางเซลล์มี 2 นิวเคลียส	นิวเคลียสเป็นรอยหยัก ลักษณะใสคล้ายถุงน้ำ (vesiculated nuclei) โครมาตินกระจายตัว พบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน พบเซลล์ 2 นิวเคลียส หรือหลายนิวเคลียสกระจายในเนื้องอก
Giant mast cell	พบน้อยมากหรือไม่พบเลย	พบกระจาย	พบจำนวนมาก
การบวมน้ำและเนื้อตาย	พบน้อย	พบกระจาย	พบทั่วไป
Mitosis/HPF	ไม่พบ	0-2	3-6

### อิมมูโนฮิสโตเคมี

อิมมูโนฮิสโตเคมีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคเนื้องอกชนิดต่างๆ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน

แอนติเจนของเซลล์ หรือตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคเป็นตัวทดสอบ จากการศึกษาโดย Kiupel *et al.* (2004) พบว่า anti-KIT และ anti-tryptase หรือ anti-chymase ช่วยในการวินิจฉัย mast cell

tumor เกรด III ได้ สอดคล้องกับการศึกษาโดย Fernandez *et al.* (2005) ซึ่งรายงานว่าการศึกษาด้วย anti-tryptase และ chymase activity สามารถนำมาใช้ร่วมกันในการวินิจฉัย mast cell tumor โดยพบว่า mast cell tumor จะให้ผลบวกทั้ง tryptase antigen และ chymase activity ซึ่งบ่งบอกได้ว่าทั้ง 2 วิธีนี้มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน และผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในระดับดีถึงดีเยี่ยม (kappa 0.56-1.00 ที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95) กล่าวคือให้ผลบวกต่อการทดสอบ mast cell เกรด I, II และ III เท่ากับร้อยเปอร์เซ็นต์ (7/7) ร้อยละ 85.7 (6/7) และร้อยละ 42.9 (3/7) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมี mast cell tumor เกรด II และ III บางส่วนซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบนี้ ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากความผิดพลาดบางประการในการทดสอบหรือผลการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาที่นำมาเปรียบเทียบกับนี้อาจมีความคลาดเคลื่อน และเป็นไปได้ว่า mast cell ที่ให้ผลลบดังกล่าวอาจยังอยู่ในระยะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงจึงมีการสร้างสารดังกล่าวสะสมในแกรนูลในปริมาณไม่มากพอต่อการทดสอบ กรณีดังกล่าวจึงควรติดตามข้อมูลทางคลินิกพร้อมด้วยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัย นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวยังพบว่ามี mast cell tumor เกรด III จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผลลบต่อ tryptase antigen และ chymase activity แต่ให้บวกต่อการย้อม toluidine blue (จำเพาะต่อเฮปาริน) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถตัดเนื้องอกที่ให้ผลลบต่อการทดสอบด้วยวิธีทั้งสองนี้ออกไปได้ว่าไม่ใช่ mast cell tumor และควรพิจารณาผลการตรวจอื่นๆ มาประกอบกัน อาจต้องใช้แอนติบอดีหลายตัวในการทดสอบแล้วตัด

poorly differentiated ของ round cell tumor ชนิดอื่นออกไปซึ่งเป็นวิธีพิสูจน์ทางอ้อม

รายงานการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่า mast cell tumor ในสุนัขที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *c-kit* (proto-oncogene) มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเป็นเนื้องอกในเกรดที่สูงขึ้น (Downing *et al.*, 2002; Zemke *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2006b) และการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้การแสดงออกของ KIT ซึ่งเป็น stem cell factor receptor เบี่ยงเบนไป โดยใน mast cell ปกติพบการแสดงออกของ KIT บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ mast cell ของเนื้องอกที่กลายพันธุ์นั้นพบการแสดงออกของ KIT ในไซโทพลาซึม โดยเฉพาะบริเวณรอบๆ นิวเคลียส (Webster *et al.*, 2006a) เนื่องจากการการแบ่งเกรดเนื้องอกตามเกณฑ์ของ Patnaik *et al.* (1984) อาจมีความแตกต่างกันระหว่างนักพยาธิวิทยาแต่ละคนดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเกณฑ์ขึ้นใหม่โดย Kiupel *et al.* (2011) ซึ่งแบ่งประเภทการพยากรณ์โรค mast cell tumor ตามรูปแบบการแสดงออกของ KIT ที่ปรากฏใน mast cell เป็น 3 แบบ ได้แก่ พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ พบกระจายในไซโทพลาซึม และพบรวมกันในบางจุดในไซโทพลาซึม ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของ KIT นี้มีความสัมพันธ์กันกับความรุนแรงของเนื้องอก โดยเนื้องอกที่พบการกระจายตัวของ KIT ในไซโทพลาซึมมีการพยากรณ์โรคไม่ดี (Webster *et al.*, 2004) ดังนั้นการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาตรวจสอบการแสดงออกของ KIT ที่เบี่ยงเบนไปจากปกติจึงเป็นแนวทางเสริมในการวินิจฉัย mast cell tumor เกรด II และ III ได้

เนื่องจากเนื้องอกเกิดจากการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ จึงได้มีการทดสอบเพื่อประเมิน

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ แล้วนำข้อมูลมาใช้ในการพยากรณ์พฤติกรรมของเนื้องอกชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง (Welle *et al.*, 2008) ในทางสัตวแพทย์วิธีการทดสอบที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การย้อม argyrophilic nucleolar organizing region (AgNORs) การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีของ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki67 ซึ่งมีการศึกษาตัวบ่งชี้ดังกล่าวใน mast cell tumor ของสุนัขเช่นกัน (Welle *et al.*, 2008; Roels *et al.*, 1999)

AgNORs เป็นบริเวณในนิวเคลียสที่เป็นที่จับกับโปรตีน เช่น nucleolin และ nucleoplasmin ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถอดรหัสของ ribosomal RNA (Derenzini, 2003) มักใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับ tumor kinetic และ metabolic activity โดยบริเวณ AgNORs สามารถจับกับโมเลกุลของเงิน (silver) ซึ่งมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมเนื้อเยื่อด้วย silver-based histochemical stain จำนวนของ AgNORs ต่อนิวเคลียสเป็นสัดส่วนกับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Ogura *et al.*, 1992; Trere *et al.*, 1997) และจำนวนที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการตาย การกลับมาเกิดซ้ำ และการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่น (Simoes *et al.*, 1994; Scase *et al.*, 2006)

PCNA เป็นหน่วยย่อยของ DNA polymerase ซึ่งเป็นปัจจัยช่วยในขบวนการ replication และการซ่อมแซม DNA และใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรค การปรากฏของ PCNA มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของสุนัขที่เป็น mast cell tumor ที่ผิวหนัง (Simoes *et al.*, 1994; Scase *et al.*, 2006)

Ki67 เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่พบปรากฏในระหว่าง active phase ในวัฏจักรของเซลล์ Ki67 มี

ความสัมพันธ์อย่างสูงต่อการพยากรณ์โรค จัดเป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคที่ไม่ขึ้นกับเกรดของเนื้องอก (independent prognostic factor) จึงจัดเป็นตัวบ่งชี้ที่ไม่มีอคติ (objective prognosis) (Scase *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007) Ki67 เป็นตัวบ่งชี้เชิงปริมาณที่มีความแม่นยำในการพยากรณ์พฤติกรรมของ mast cell tumor สูงเช่นเดียวกับ AgNORs การแสดงออกของ KIT ในเซลล์ของ mast cell tumor ต่างไปจากเซลล์ปกติ มีความสัมพันธ์กันกับการแสดงออกของ AgNORs และ Ki67 ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของตัวบ่งชี้ทั้ง 3 จึงมีการพยากรณ์โรคไม่ตีผู้เขียนบางท่านใช้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในการแยก mast cell tumor เกรด II เป็น 2 กลุ่มย่อยซึ่งมีความแตกต่างของช่วงเวลารอดชีวิต (survival time) เป็นอย่างมาก (Webster *et al.*, 2007) จากข้อมูลที่ได้มีการศึกษากันมาอย่างต่อเนื่องจึงได้มีการแนะนำแนวทางในการวินิจฉัย mast cell tumor ในสัตว์ว่าให้พิจารณาวิเคราะห์โปรตีน Ki67 ร่วมกับตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคตัวอื่น อาทิ เกรดทางจุลพยาธิวิทยา และรูปแบบการแสดงออกของ KIT การประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้อิมมูโนฮิสโตเคมี สามารถนำมาสัมพันธ์กับความไวต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด เนื่องจากยาเคมีบำบัดมีผลต่อเซลล์ที่มีการแบ่งตัว (Webster *et al.*, 2007)

ความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็กในเนื้องอก (Intratumoral microvessel density: IMVD) เป็นตัวบ่งชี้เกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือด ซึ่งทดสอบได้โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ von Willebrand factor บนเซลล์เยื่อหลอดเลือด IMVD สามารถนำมาใช้เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขในช่วงหลังการผ่าตัด (Preziosi *et al.*, 2004.)

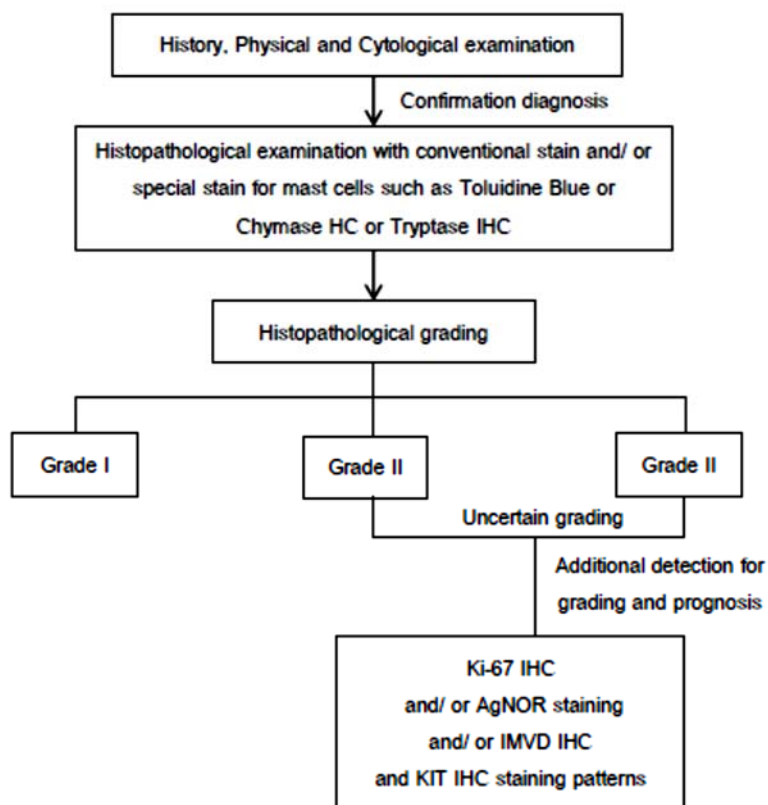
Dos Santos Costa Poggiani *et al.* (2012) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางคลินิก การเพิ่มจำนวนเซลล์ (ได้แก่ Ki67 expression และ mitotic index) IMVD และ apoptotic index กับ histological grade และรูปแบบการแสดงออกของ KIT (KIT pattern) ของ mast cell tumor ที่ผิวหนังสุนัข พบว่า histological grade มีความสัมพันธ์กับ IMVD การพบแผลหลุมและจำนวนของเนื้องอก ส่วนการเพิ่มการแสดงออกของ Ki67 และ mitotic index สัมพันธ์กับ KIT staining pattern ที่ปรากฏในไซโทพลาซึม และ histological grade มีความสัมพันธ์กับ mitotic index จากการศึกษาดังกล่าวผู้วิจัยได้เสนอว่าการตรวจวินิจฉัย mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขควรประเมินจากผลตรวจ histological grade ร่วมกับตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคตัวอื่นๆ เช่น รูปแบบการแสดงออกของ KIT ที่ปรากฏในไซโทพลาซึม IMVDA การเพิ่มจำนวนเซลล์ การพบแผลหลุมและจำนวนเนื้องอก การกลับมาเป็นซ้ำ และการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น การตรวจสอบตัวบ่งชี้ อาทิ Ki67 หรือ KIT staining pattern ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีอาจเป็นทางเลือกในการพยากรณ์โรคได้เร็วขึ้นในกรณีที่การวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาว่าเป็น mast cell tumor อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดบางประการเนื่องจากอาจไม่ได้เก็บส่วนของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายมาตรวจ

ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงซึ่งในทางปฏิบัติอาจไม่ได้ใช้วิธีนี้ตรวจสอบตัวบ่งชี้ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วได้ทั้งหมด จึงขึ้นกับดุลยพินิจของนายสัตวแพทย์ในการเลือกวิธีที่เหมาะสม โดยพิจารณาใช้ข้อมูลด้านอื่นประกอบ ได้แก่ ข้อมูลทางคลินิก (พันธุ์ อายุ ตำแหน่งที่พบ ขนาดและจำนวนของเนื้องอก การกลับมาเป็นซ้ำ) เกรดเนื้อ

นอกจากผลตรวจทางจุลพยาธิวิทยา mitotic index การแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ

### สรุป

Mast cell tumor ในผิวหนังสุนัขมีลักษณะและพฤติกรรมของเนื้องอกมีความผันแปรค่อนข้างสูง ทำให้ยากต่อการวินิจฉัยและการรักษา การตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคที่แม่นยำย่อมเป็นประโยชน์ต่อการเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสม การวินิจฉัยโดยทั่วไปใช้ข้อมูลประวัติ ผลการตรวจทางคลินิก และลักษณะทางกายภาพของก้อนเนื้องอก ร่วมกับการตรวจทางเซลล์วิทยาและจุลพยาธิวิทยาซึ่งจะทำให้ทราบชนิดและเกรดของเนื้องอก การตรวจเพิ่มเติมอื่นๆ เช่น Ki67 expression AgNORs count ค่า IMVD รวมทั้ง KIT และ tryptase staining pattern ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสัมพันธ์กับ mast cell tumor ที่มีพัฒนาการต่ำ สามารถช่วยวินิจฉัยและพยากรณ์โรคให้มีความแม่นยำมากขึ้น โดยใช้เทคนิคการย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และ/หรือฮิสโตเคมีมาใช้ในการทดสอบ จากข้อมูลข้างต้น จึงสรุปแนวทางในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 ทั้งนี้การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับความพร้อมของห้องปฏิบัติการ ความชำนาญและประสบการณ์ของบุคลากรที่เกี่ยวข้องในการตรวจวินิจฉัยด้วย การศึกษาวิจัยในอนาคตยังต้องการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับ mast cell tumor ในด้านพฤติกรรมของเนื้องอก กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และ multidrug resistance-associated protein ซึ่งอาจนำมาสู่การพยากรณ์พัฒนาการของ



**แผนภาพที่ 1** สรุปแนวทางการวินิจฉัยและพยากรณ์โรค mast cell tumor ในผิวหนังสุนัข HC = histochemistry, IHC = immunohistochemistry, IMVD = Intratumoral microvessel density

เนื้องอก หรือการใช้เคมีบำบัดในการรักษาให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ทนงศักดิ์ มะมม และ อ.น.สพ.ดร.หัสตินทร์ บุญศรีโรจน์ สังกัดภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะในการจัดต้นฉบับจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

Abraham, S.N. and Malaviya, R. 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infect. Immun.* 65: 3501-3508.

Bancroft, J. and Gamble, M. 2008. Theory and Practice of Histological Techniques. 6<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia. 725 p.

Beaven, M.A. and Metzger, H. 1993. Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. *Immunol. Today* 14(5): 222-226.

De Souza Junior, D.A., Santana, A.C., da Silva, E.Z., Oliver, C. and Jamur, M.C. 2015. The Role of Mast Cell Specific Chymases and Tryptases in Tumor Angiogenesis *Biomed. Res. Int.* 1-13.

Derenzini, M. 2003. The AgNORs. *Micron* 31: 117-120.

- Dopson, J.M. and Scase, T.J. 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 48: 424-431.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Schneider, R., Hibbard, H.H. and Klauber, M.R. 1968. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda Country. *J. of the National Cancer Institute* 40: 307-318.
- Dos Santos Costa Poggiani, S., Terra, E.M., Neto, R.T., Costa, M.T. and Amorim, R.F. 2012. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Biologic Behavior and Its Correlation with Prognostic Indicators. *Open J. Vet. Med.* 2: 255-261.
- Downing, S. Chien, M.B., Kass, P.H., Moore, P.E. and London, C.A. 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1718-1723.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. 1979. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol.* 16: 673-679.
- Epstein, J.B., Scully, C. and Spinelli, J. 1992. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med.* 21:160-163.
- Fernandez, N.J., West, K.H., Jackson, M.L. and Kidney, B.A. 2005. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol.* 42: 437-445.
- Furitsu, T., Tsujimura, T. and Tono, T. 1993. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.* 92: 1736-1744.
- Galli, S.J., Zsebo, K.M. and Geissler, E.N. 1994. The kit-ligand, stem-cell factor. *Adv. in Immunol.* 55:1-96.
- Gleixner, K.V., Rebuzzi, L., Mayerhofer, M., Gruze, A., Hadzijusufovic, E., Sonneck, K., Vales, A., Kneidinger, M., Samorapoomichit, P., Thaiwong, T., Pickl, W.F., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Sillaber, C., Willmann, M. and Valent, P. 2007. Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells. *Exp. Hematol.* 35: 1510-1521.
- Goldschmidt, M.H. and Shofer, F.S. 1992. Skin tumours of the cat and dog. Pergamon press. Oxford, NY, USA. 316p.
- Howard, E.B., Sawa, T.R., Nielsen, S.W. and Kenyon, A.J. 1969. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. *Pathol. Vet.* 6:146-158.

- Huntley, JF. 1992. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J.Comp. Pathol.* 107(4): 349-372.
- Jackson, D. 1994. The cytology of the contagious (venereal) tumor of dog. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 20:433-442.
- Jones, C.L., Grahn, R.A., Chien, M.B., Lyons, L.A. and London, C.A. 2004. Detection of c-kit mutations in canine mast cell tumors using fluorescent poly acrylamide gel electrophoresis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 95-100.
- Kitamura, Y. and Fujita, J. 1989. Regulation of mast cell differentiation. *Bioessays* 10: 193-196.
- Kiupel, M., Webster, J.D., Bailey, K.L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C.J., Fitzgerald, S.D., Gamble, D., Ginn, P.E., Goldschmidt, M.H., Hendrick, M.J., Howerth, E.W., Janovitz, E.B., Langohr, I., Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., Miller, M.A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T.P., Neyens, I., O'Toole, D., Ramos-Vara, J., Scase, T.J., Schulman, F.Y., Sledge, D., Smedley, R.C., Smith, K., Snyder, P.W., Southorn, E., Stedman, N.L., Steficek, B.A., Stromberg, P.C., Valli, V.E., Weisbrode, S.E., Yager, J., Heller, J. and Miller, R. 2011. Proposal of a Two-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet. Pathol.* 48(1) 147-155.
- Kiupel, M., Webster, J.D., Kaneene, J.B., Miller, R. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 41: 371-377.
- Kiupel, M., Webster, J.D., Miller, R.A. and Kaneene, J.B. 2005. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J. Vet. Med. A.* 52: 280-286.
- Kube, P., Audige, L., Kuther, K. and Welle, M. 1998. Distribution, Density and Heterogeneity of Canine Mast Cells and Influence of Fixation Techniques. *Histochem. Cell Biol.* 110 (2): 129-135.
- Kurz, H. and Wittekind, D. 2001. A new panoptic stain for developmental biology - The mouse placenta paradigm. *Annual of Anat.* 183: 437-441.
- Leclere, M., Desnoyers, M., Beauchamp, G. and Lavoie, J.P. 2006. Comparison of Four Staining Methods for Detection of Mast Cells in Equine Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Vet. Intern. Med.* 20:377-381.
- Leder, L.D. 1979. The chloroacetate esterase reaction. A useful means of histological diagnosis of hematological disorders

- from paraffin sections of the skin. *Anim. J. Dermatopathol.* 1:39-42.
- Linnekin, D., DeBerry, C.S and Mou, S. 1997. Lyn associates with the Juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in haemopoietic cell and normal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 272: 27450-27455.
- London, C.A., Kisseberth, W.C., Galli, S.J., Geissler, E.N. and Helfand, S.C. 1996 Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine MCTs. *J. Comp. Pathol.* 115: 399-414.
- London, C.A. and Segun, B. 2003. Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin. North Am. Small An. Pract.* 33: 473-489.
- Metcalf, D.D., Baram, D. and Mekori, Y.A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77: 1033-1079.
- Misdrop, W. 2004. Mast cells and canine mast cell tumors. *A review Vet. Q.* 26:156-169.
- Morini, M., Bettini, G., Preziosi, R. and Mandrioli, L. 2004. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 705-708.
- Nocka, K., Buck, J., Levi, E. and Besmer, P. 1990. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors *Embo. J.* 9: 3287-3294.
- Northrup, N.C., Howerth, E.W., Harmon, B.G., Brown, C.A., Carmicheal, K.P., Garcia, A.P., Latimer, K.S., Munday, J.S., Rakich, P.M., Richey, L.J., Stedman, N.L. and Gieger, T.L. 2005. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 561-564.
- Ogura, S., Abe, S., Sukoh, N, Kunikane, H., Nakajima, I., Inoue, K. and Kawakami, Y. 1992. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. *Cancer* 70: 63-68.
- O'Keefe, D.A. 1990. Canine mast cell tumors. *Vet. Clin. N. Am.-Small* 20:1105-1115.
- Pakhrin, B., Kang, M.S., Bae, I.H., Park, M.S., You, M.H., Kim, J.H., Yoon, B.I., Choi, Y.K. and Kim, D.Y. 2007. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J. Vet. Sci.* 8(3): 229-236.
- Patnaik, A.K., Ehler, W.J. and Macwem, E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21: 469-474.
- Preziosi, R., Sarli, G. and Paltrinieri, M. 2004. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumours of the dog. *J. Comp Pathol.* 130(2-3): 143-151.



- Prussin, C. and Metcalfe, D.D. 2003. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(2 Suppl): 486-494.
- Riva, F., Brizzola, S., Stefanello, D., Crema, S. and Turin, L. 2005. A study of mutations in the c-kit gene of 32 dogs with mastocytoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 385-388.
- Roels, 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. Patholo.* 121: 13-24.
- Scase, T.J., Edwards, D., Miller, J. Henley, W., Smith, K., Blunden, A. and Murphy, S. 2006. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Intern Med.* 20: 151-158.
- Serve, H., Yee, N.S., Stella, G., Sepplorenzino, L., Tan, J.C. and Besmer, P. 1995. Differential roles of PI3-Kinase and KIT tyrosine-821 in KIT receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo. J.* 14: 473-483.
- Simoes, J.P. and Schoning, P. 1994. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 458-465.
- Simoes, J.P., Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.* 31: 637-647.
- Strefezzi, R.F., Kleeb, S.R., Xavier, J.G. and Catão-Dias J.L. 2009. Prognostic indicators for mast cell tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2(2): 110-121.
- Strefezzi, R.F.S., Xavier, J.G. and Catao-Dias, J.L. 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 40: 268-275.
- Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Chieco, P. and Derenzini, M. 1997. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. *European J. Histochem.* 41(2): 153-154.
- Walls, A.F., Jones, D.B., Williams, J.H., Church, M.K. and Holgate, S.T. 1990. Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. *J Pathol.* 162: 119-126.
- Webster, J.D., Kiupel, M., Kaneene, J.B., Miller, R. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2004. The Use of KIT and tryptase epression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors, *Vet. Pathol.* 41(3): 371-377.
- Webster, J.D., Kiupel, M. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2006a. Evaluation of the

kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 6: 85.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Kaneene, J.B., Miller, R., Resau, J.H. and Kiupel, M. 2006b. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8: 104–111.

Webster, J.D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R.A., Kaneene, J.B. and Kiupel, M. 2007. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet. Pathol.* 44: 298–308.

Welle, M.M., Rohrer, B.C, Howard, J. and Rufenacht, S. 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet. Dermatol.* 19: 321-339.

Zemke, D., Yamini, B. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2002. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.* 39: 529–35.

