

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย



นาย วิทวัส จิตต์ศิวงาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALANCE OF K-RAS GENE MUTATION IN PANCREATIC CANCER IN THAI
PATIENTS



Mr. Wittawat Jitpewngarm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009


Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความซุกซนของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับ
อ่อน ในผู้ป่วยไทย
โดย นาย วิทวัส จิตต์ผิงงาม
สาขาวิชา อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้ให้นักศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรัตน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เถลิงศักดิ์ กาญจนนุชย์)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เอกภพ สิริชัยนันท์)

วิทยุส จิตต์นิวงาม : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนในผู้ป่วยไทย
(PREVALANCE OF K-RAS GENE MUTATION IN PANCREATIC CANCER IN THAI PATIENTS)
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 105 หน้า.

ที่มา ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนพบว่ามีการกลายพันธุ์ของเคราสยีน ในการศึกษาต่างประเทศพบว่าอุบัติการณ์สูงถึง 70-90% แต่ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสของเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย

ผู้ป่วยและวิธีการ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเรื่องมะเร็งตับอ่อนในช่วง พ.ศ. 1 มกราคม 2549 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ตามรหัสโรค ICD10 ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นผู้ป่วยในของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีผลชิ้นเนื้อเพียงพอในการตรวจการกลายพันธุ์ของเคราสยีน ด้วยวิธีโพโรซีควอนซิงเทคนิค

ผลการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนทั้งหมด 25 ราย จากการตรวจการกลายพันธุ์ของเคราสยีนพบการกลายพันธุ์(k-ras mutant) 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ไม่มีการกลายพันธุ์(k-ras wild type) 15 รายโดยตำแหน่งของการกลายพันธุ์พบที่ตำแหน่ง GGT เป็น GAT 7 ราย(ร้อยละ 70) และ GGT เป็น GCT 3 ราย (ร้อยละ 30) และพบว่ามัธยฐานการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของเคราสยีน (k-ras mutant) แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ 7.00 เดือน เทียบกับ 18.56 เดือน (log rank test P=0.036)

สรุปผลการวิจัย อุตบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งตับอ่อนในการศึกษาอยู่ที่ร้อยละ 40 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาอื่น อาจเนื่องมาจากเชื้อชาติ ที่แตกต่างกัน ระยะเวลาของการเก็บรักษาชิ้นเนื้อ และตำแหน่งที่นำมาตรวจการกลายพันธุ์ มีแนวโน้มว่าการตรวจการกลายพันธุ์ของเคราสยีนอาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์ (prognostic factor) ได้ในอนาคต

ภาควิชา :อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต..... *วิภา โสภณนิวงาม*.....
สาขาวิชา :อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... *M.S.P.*.....
ปีการศึกษา :2552.....

5174829730: MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: K-RAS MUTATION/PANCREATIC CANCER/EGFR PATHWAY/TARGETD
THERAPY/PYROSEQUENCING TECHNIQUE

WITTAWAT JITPEWNGARM : PREVALANCE OF K-RAS GENE MUTATION IN PANCREATIC
CANCER IN THAI PATIENTS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. VIROTE SRIURANPONG,
M.D., 105 pp.

Background: *KRAS* mutation, an oncogene which plays role in tumorigenesis of cancer, had high prevalence in various type of cancer especially adenocarcinoma of pancreas. Previous study reports the prevalence in pancreatic cancer range 75-90%. Adding impact of gene detection. We sought to investigate the prevalence of *KRAS* mutation of pancreatic cancer in Thai patient.

The aim of this study was to identify the prevalence of *kras* mutation in pancreatic cancer.

Patients and methods. Retrospective study in 25 patients who had diagnosed pancreatic cancer, confirmed by histology, and received treatment at King Chulalongkorn Memorial hospital between 1 Jan 2006-30 Nov 2009 with adequate tissue for further analysis were enrolled in this study. The clinicopathological characteristic and modality of treatment were explored. Pyrosequencing technique, which previous studies proven superior sensitivity method than dideoxy sequencing method, had been used in this study. The result of *KRAS* genotype was analysis according to clinicopathological characteristic.

Results: Forty percent of *KRAS* mutation was found in this study with vast majority of mutation located at codon 12, common patterns were GGT> GAT followed by GGT>GCT. add clinicopathological information , concise. Overall survival was significant lower among patients with *K-RAS* mutation 7 month vs 18.56 month (*p-value* 0.036) add multivariate cox regression analysis according to clinical data.

Conclusion: This is the first study explore the prevalence of *KRAS* mutation in pancreatic cancer in Thai patient. The prevalence of *KRAS* mutation in our population was lower than previous study leads us to further explore other mechanism of tumorigenesis. *KRAS* mutation was an independent predictor of survival in Thai pancreatic cancer patient, its roles as prognostic factor had been confirmed in this study.

Department :.....Medicine.....Student's Signature *Wittawat Jitpeungarm wt*
Field of Study :.....Medicine.....Advisor's Signature..... *Virote Sruang*
Academic Year :...2009.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. อาจารย์แพทย์หญิง นภา ปริญญาติกุล ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
2. อาจารย์นายแพทย์ สืบพงศ์ ธนสารวิมล ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
3. อาจารย์แพทย์หญิง ชนิตา วินะยานุวัตติคุณ ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
4. นายแพทย์ณัฐพงศ์ โต้พิบูลพงศ์ ให้คำปรึกษาด้านสถิติทางการวิจัย
5. คุณชวลิต แซ่ล้อ พนักงานวิจัย ช่วยประสานงานและติดตามผู้ป่วย

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนฤมล คล้ายแก้ว ผู้ช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบคุณภาพของเนื้อเยื่อมะเร็ง

และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ เจ้าหน้าที่หน่วย GenePro
เจ้าหน้าที่แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รวมทั้งบิดา, มารดา, และครอบครัว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 คำถามการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	4
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น	5
1.7 คำสำคัญ	5
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย	5
1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย	6
1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	7
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 มະເຣິງຕັບອ່ອນ	20
บทที่ 4 การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องมະເຣິງຕັບອ່ອນ.....	32

	หน้า
บทที่ 5 ไฟโรซีควอนซิ่ง เทคโนโลยีและการตรวจการกลายพันธุ์ของโครมาติน	41
บทที่ 6 วิธีดำเนินการวิจัย.....	55
6.1 รูปแบบของการวิจัย	55
6.3 ระเบียบวิธีวิจัย	55
6.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	56
6.5 การสังเกตและการวัด.....	56
6.6 การเตรียม DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา	57
6.7 การรวบรวมข้อมูล.....	58
6.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	59
6.9 ปัญหาทางจริยธรรม	59
6.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข	60
6.11 การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน	61
6.12 งบประมาณ	61
บทที่ 7 ผลการศึกษา	62
บทที่ 8 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	75
8.1 สรุปผลการวิจัย.....	75
8.2 อภิปรายผลการวิจัย	75
8.3 ข้อเสนอแนะ	79
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	93
ภาคผนวก ก.....	94
ภาคผนวก ข	97
ภาคผนวก ค.....	101
ภาคผนวก ง.....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	105

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงการอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในมะเร็งชนิดต่างๆ8	8
ตารางที่ 2	แสดงลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจการกลายพันธุ์ของแคราสยีน จำนวน 61 ราย .9	9
ตารางที่ 3	แสดงผลการศึกษาคุณลักษณะประชากร จากการศึกษาของ Ralph H.Hruban และคณะเปรียบเทียบระหว่างมีการกลายพันธุ์ (k-ras mutant) หรือไม่มีการกลายพันธุ์ (kras wild type)..... 10	10
ตารางที่ 4	แสดงอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของแคราสยีน(k-ras mutation) พบว่าอุบัติการณ์ประมาณ ร้อยละ 60-90โดยทั่วไปเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่โคดอน (codon 12) โดยเปลี่ยนจาก GGT-GAT และ GTT ตามลำดับ..... 11	11
ตารางที่ 5	แสดงการกลายพันธุ์ของแคราสยีนของผู้ป่วยในการศึกษา Hugh E. Mulacahy และคณะจำนวน 21 ราย 14	14
ตารางที่ 6	แสดง Biomarker profile จากการศึกษาของ George Fountzilias และคณะ18	18
ตารางที่ 7	แสดงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนหลังการทำผ่าตัด26	26
ตารางที่ 8	แสดงอุบัติการณ์ของยีนป้องกันการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 33	33
ตารางที่ 9	แสดงอุบัติการณ์ยีนก่อมะเร็งและการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน.....36	36
ตารางที่ 10	แสดงอุบัติการณ์ของความผิดปกติในการซ่อมแซมยีนและการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วย มะเร็งตับอ่อน37	37
ตารางที่ 11	แสดงความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอ่อนในกลุ่มโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม39	39
ตารางที่ 12	แสดงผลการตรวจ K-ras mutation ของเซลล์ต้นแบบ (cell line)51	51
ตารางที่ 13	แสดงผลการตรวจ K-ras mutation ของชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็ง52	52
ตารางที่ 14	แสดงค่าใช้จ่าย และระยะเวลาการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆ53	53
ตารางที่ 15	แสดงข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล (baseline characteristic) ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย62	62
ตารางที่ 16	แสดงข้อมูลพื้นฐานปัจจัยทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย64	64
ตารางที่ 17	แสดงพื้นฐานด้านข้อมูลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย67	67

ตารางที่ 18	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลของกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) เทียบกับกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutant) 71
ตารางที่ 19	แสดงคุณสมบัติของชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจยีนเคราส 73
ตารางที่ 20	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลของกลุ่ม Uni-variate analysis /Multi-variate 74
ตารางที่ 21	แสดงอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสและลักษณะของการกลายพันธุ์ในการศึกษาที่ผ่านมาต่างๆ 78



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1	แสดงการกลไกการทำงานของยาชนิดที่มีผลต่อมะเร็งเท่านั้น2
แผนภูมิที่ 2	แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยจำนวน 82 รายเปรียบเทียบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส(K-ras mutation) และไม่มีการกลายพันธุ์ (k-ras wild type)..... 11
แผนภูมิที่ 3	แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนจากการศึกษาของ Jeeyun Lee, MD ที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutation) และไม่มีการกลายพันธุ์ (kras wild type) 12
แผนภูมิที่ 4	แสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (kras mutation)และ wild type ที่โคดอน (codon) 12..... 13
แผนภูมิที่ 5	แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของเคราสยีน(kras mutant)ได้รับการรักษาด้วย targeted therapy เปรียบเทียบกับการรักษาประคับประคอง 15
แผนภูมิที่ 6	แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราสยีน (wild type) ได้รับการรักษาด้วย targeted therapy เปรียบเทียบกับการรักษาประคับประคอง 16
แผนภูมิที่ 7	Kaplan-Meier curves แสดงการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย erlotinib ร่วมกับ gemcitabine เทียบกับ gemcitabine 17
แผนภูมิที่ 8	แสดงพยาธิวิทยาและการกลายพันธุ์ระดับอ่อนด้อย21
แผนภูมิที่ 9	แสดงการกดเบียดของมะเร็งตับอ่อน25
แผนภูมิที่ 10	แสดงการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับอ่อน32
แผนภูมิที่ 11	แสดงการทำงานของ p16/RB1..... 34
แผนภูมิที่ 12	แสดงการทำงานของ TGF- β pathway35
แผนภูมิที่ 13	แสดงการทำงานของ TGF- β pathway35
แผนภูมิที่ 14	แสดงการทำงานในส่วนของยีนเคราสและ EGFR receptor ที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนของเซลล์.....37

แผนภูมิที่ 15	แสดงหลักการในการเติมเบสและปล่อย pyrophosphate (PPi) ออกมาในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase43
แผนภูมิที่ 16	แสดง pyrogram ที่ได้จากปฏิกิริยาการเติมเบสของเอนไซม์ DNA Polymerase43
แผนภูมิที่ 17	แสดงการทำลาย dNTP และ ATP ที่ไม่ถูกใช้หรือไม่ใช่เบสคู่สมในระหว่างการเติมเบสของเอนไซม์ DNA polymerase.....44
แผนภูมิที่ 18	แสดง pyrogram ที่ของการเติมเบสโดยเอนไซม์ DNA polymerase44
แผนภูมิที่ 19	แสดงกระบวนการของ pyrosequencing ตั้งแต่แรกเริ่มจนถึงการวิเคราะห์ผล45
แผนภูมิที่ 20	แสดง pyrogram ที่ได้จากการทำ pyrosequencing46
แผนภูมิที่ 21	แสดงเวลาของการหาลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างวิธี conventional method ซ้ำย และ pyrosequencing ซวา.....47
แผนภูมิที่ 22	แสดงวิธี pyrosequencing ที่สามารถตรวจหา SNP หรือ mutation48
แผนภูมิที่ 23	ตารางแสดงตำแหน่งของการตรวจหายีนการกลายพันธุ์ ด้วยวิธีไพโรซีควนซิ่ง B C E F H23
แผนภูมิที่ 24	แสดงมัธยฐานระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยจำแนกตามการกลายพันธุ์ของโคราซีน.....72

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ECOG	Eastern Collaborative Oncology Group
EGFR	Epidermal growth factor receptor
OS	Overall survival
PFS	Progression free survival
TTP	Time to progression
DFS	Disease free survival
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block
ICD-10	International statistical classification of disease and related health problems tenth revision Thai modification
SSCP	Single strand conformation polymorphism analysis
HRM	High resolution melting
AJCC	American Joint Committee on Cancer
PCR	Polymerase chain reaction
SNP	Genotype of single nucleotide polymorphism

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย (Background and Rationale)

ปัจจุบันความรู้ความเข้าใจในชีวโมเลกุลมีการพัฒนามากขึ้น กล่าวคือสามารถศึกษายีนทั้งหมดหรือการแสดงออกของยีนในเซลล์ต่างๆ ความเข้าใจดังกล่าวมีผลต่อการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะสาขามะเร็งวิทยา ดังนั้นในความเข้าใจในโรคมะเร็งมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องการความรู้ด้านการวิเคราะห์และแสดงออกของยีน (gene expression profiling) มาประยุกต์ทั้งในด้านของการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง โดยขณะนี้ได้มีการพัฒนายาหลายชนิดที่มีผลต่อมะเร็งเท่านั้น ซึ่งเรียกว่าการรักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) เนื่องจากยาสามารถที่จะยับยั้งระบบการส่งสัญญาณ (signal transduction) ของเซลล์มะเร็งแต่ไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติ

ยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (protooncogene) สัมพันธ์กับการส่งระบบสัญญาณ ซึ่งพบว่าเป็นส่วนหนึ่งของพยาธิกำเนิดของมะเร็งตับอ่อน การศึกษายีนที่ก่อให้เกิดมะเร็งที่มีบทบาทสำคัญของ ได้แก่ Ras ยีน p53 ยีนเป็นต้น

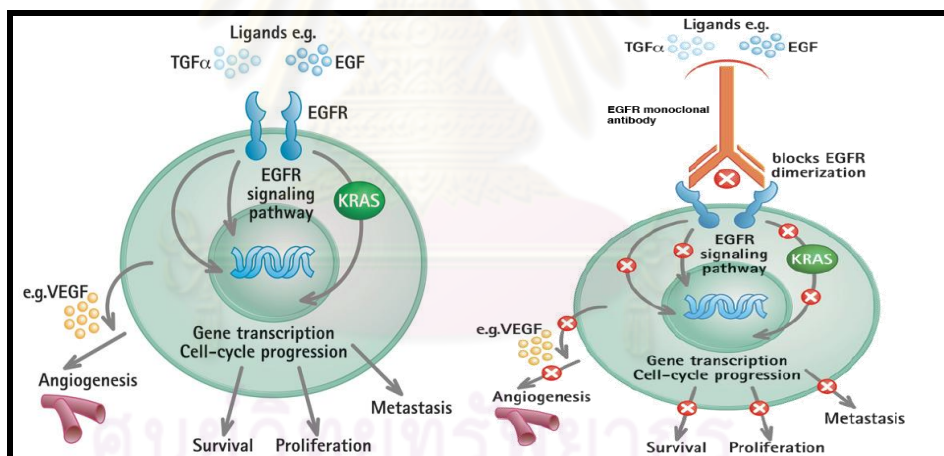
Ras protooncogene (ยีนก่อมะเร็งชนิดทรานส์) จะประกอบด้วย H-ras K-ras N-ras ปัจจุบันเราพบว่า Ras โปรตีนทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์หลายอย่าง ได้แก่ การแบ่งตัว (proliferation) การดำรงชีวิต (survival) และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์

ความผิดปกติของ ยีนทรานส์ (K-ras) ภาวะปกติ (K-ras) จะอยู่ในรูปของ ยีนก่อมะเร็ง (protooncogene) ซึ่งไม่ทำงาน (inactive form) แต่หากในกรณีที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะทำให้ ทรานส์อยู่ในรูปที่ทำงานหรือ active form หรือที่เรียกกันว่า oncogene ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นให้ เซลล์มีการแบ่งตัวและการดำรงชีวิตมากขึ้น

จากการรายงานการวิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ของเคราส(K-ras) ยีน พบว่ามีอุบัติการณ์สูงถึงร้อยละ 70-90 ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่พบที่ โคดอน (codon) ที่ 12 โดยมีการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน glycine (GGT) ไปเป็น aspartic acid (GAT) หรือ valine (TGT) [1-2] [3]

ในการศึกษานี้ ต้องการหาอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ในตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12 ในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอ่อนในประเทศไทย โดยการตรวจหาด้วยวิธี ไพโรซีควนซิง(pyrosequencing method)

แผนภูมิ ที่ 1 แสดงการกลไกการทำงานของยาคิน ที่มผลต่อมะเร็งเท่านั้น (target therapy) และการทำงานของเคราสยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอด (survival) การเติบโต (proliferation) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็ง [4]



1.2 คำถามการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary Research Question)

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ในเนื้อเยื่อ มะเร็งตับอ่อน ของผู้ป่วยไทยแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ หรือไม่

คำถามรอง (Secondary Research Question)

การกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนและในเลือดมีความสัมพันธ์กันหรือไม่

1.3.วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสของมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย

1.4.สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

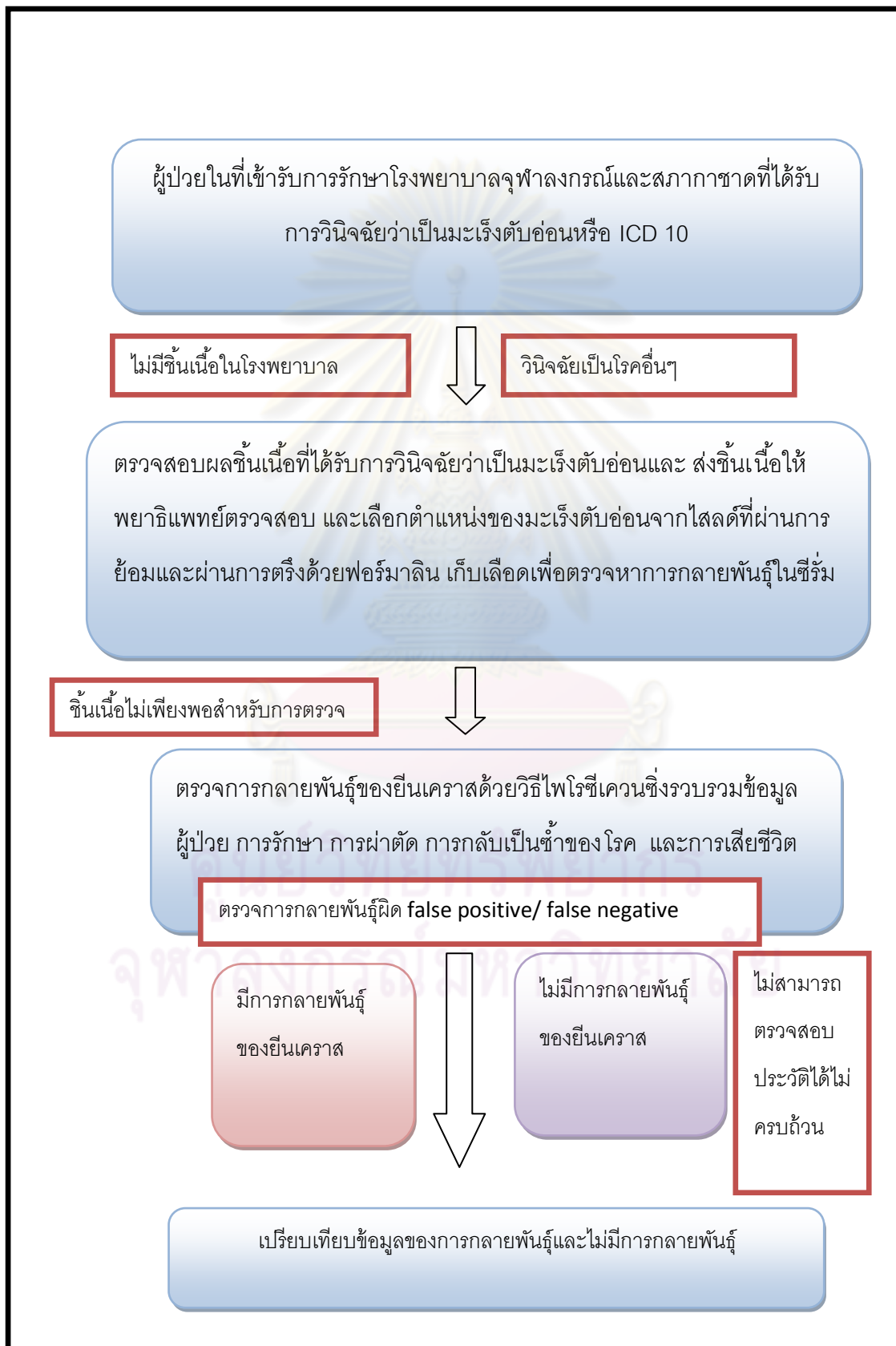
H0 : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งตับอ่อนในผู้ป่วยไทย ไม่มีความแตกต่างจากการศึกษาอื่น

Ha : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งตับอ่อนในผู้ป่วยไทย มีความแตกต่างจากการศึกษาอื่น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5.กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจการกลายพันธุ์ของเควาสีน

1. ชนิดและตำแหน่งของการกลายพันธุ์
การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมต่างตำแหน่ง ต่างชนิด และการเลือกใช้ Primer มีผลต่อการตรวจหาการกลายพันธุ์ (mutation analysis) โดยวิธีไพโรซีควนซิ่ง
2. คุณภาพของชิ้นเนื้อ ปริมาณ ของชิ้นเนื้อในส่วนที่เป็นมะเร็ง และขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาขึ้นกับวิธีการ อุปกรณ์ และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุลจีนโปร (GenePro)

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

- ไม่มี

1.7 คำสำคัญ (Key words)

K-ras mutation

Pancreatic cancer

EGFR pathway

Targeted therapy

Pyrosequencing technique

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) หมายถึง มะเร็งของตับอ่อน ที่มีอาการ อารมณ์แสดงตำแหน่งและการกระจายของโรค รวมทั้งผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ เข้าได้กับโรคนี้

การแบ่งระยะของมะเร็งใช้วิธีการแบ่งตาม American Joint Committee on Cancer (AJCC) ปี 2002 (รายละเอียดในบทที่ 3) เกณฑ์ในการวินิจฉัยมะเร็งระยะไม่สามารถผ่าตัดคือ 1.มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียงในปริมาณมากและหรือมีการแพร่กระจายของมะเร็ง 2.

ก้อนมะเร็งลูกกลมเส้นเลือดแดง celiac หรือ superior mesenteric aorta inferior venacava 3.

ก้อนมะเร็งโอบรอบเส้นเลือดเส้นเลือดดำ superior mesenteric และ portal

1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

1. การศึกษาย้อนหลังอาจทำให้เก็บข้อมูลได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากไม่ได้มีการวางแผนไว้ล่วงหน้าก่อน
2. เกี่ยวกับเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation analysis) ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเนื่องจากว่ายังไม่มีการศึกษานี้ในประเทศไทย ห้องปฏิบัติการก็เป็นเพียงการทดลองในงานวิจัย และอาจมีปัญหาในการเลือก primer ที่เหมาะสม ร่วมกับคุณภาพของชิ้นเนื้อซึ่งอาจเก็บไว้นานเกินไป
3. ผู้ป่วยไม่ยินยอมในการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาความผิดปกติของเคราส(K-ras)

1.10 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัย (Expected Benefits and Application)

1. ทำให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย ไทยนำไปสู่การรักษาด้วยยาในกลุ่ม การรักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) ต่อไปในอนาคต
2. เป็นข้อมูลสำหรับใช้วางแผนในการศึกษาต่อไป เช่น การศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ในสหรัฐอเมริกา ในช่วงปี 2007 ปีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งตับอ่อนจำนวน 33370 คน ซึ่งถือว่าเป็นอันดับ 4 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งทั้งหมดในอเมริกา ช่วงอายุที่พบได้บ่อย ประมาณ 60-70 ปี เพศชายเท่ากับเพศหญิง ผู้ป่วยเพียงร้อยละ 5-22 เท่านั้นที่ก้อนมะเร็งอยู่ในระยะที่ผ่าตัดได้ [5-7] การรักษาลักษณะของมะเร็งตับอ่อนส่วนหัวคือ การผ่าตัดแบบ Whipple ซึ่งพบอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival rate) ประมาณร้อยละ 4-24 [8-9] และมีฐานเวลาการรอดชีวิต (median survival rate) ประมาณ 15-19 เดือน [10] อัตราการกำเริบเฉพาะที่ (local recurrent rate) และการแพร่กระจาย (distant metastasis rate) สูง พยาการณโรคที่สำคัญที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ได้แก่ ความสามารถผ่าตัดมะเร็งได้หมดในระดับพยาธิวิทยา (R0 resection tumor) ปริมาณของดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อมะเร็ง (DNA content) ขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor size) และการลุกลามต่อมน้ำเหลือง [11]

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1988 มีการรายงานพบว่ามี kirsten-ras codon mutation ในมะเร็งตับอ่อน โดย Almoguera C และคณะ โดยตรวจพบที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่โคดอน (codon) ที่ 12 [12]

ยีนราส (Ras gene) เริ่มมีการตรวจพบ ตั้งแต่กลางปี ค.ศ.1960 โดยทำการศึกษามาจาก Harvey Kristen strain ของ sarcoma virus และในปี 1980 เริ่มพบว่ายีนราส (ras gene) เป็นยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Protooncogene)

ยีนราส (Ras gene) ประกอบด้วย 4 ลักษณะ (isoform) ได้แก่ Harvey (H)RAS Neuroblastoma (N)RARS Kristen (K)RAS-4A,4B ดังที่ได้กล่าวข้างต้นการทำงานที่ผิดปกติของ ras gene โดยเฉพาะตำแหน่ง point mutation ที่โคดอน (codon) ที่ 12 13 และ 61 นำไปสู่การควบคุมของเซลล์ในเรื่องการแบ่งตัว การเติบโต การสร้างโปรตีนที่ผิดปกติซึ่งนำไปสู่การเป็น

มะเร็งต่อไป [13-15] ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันพบว่าการแสดงออกของ ยีนราส (*ras gene*) ที่แตกต่างกันด้วย [1-2]

สำหรับ K-*ras* mutation พบว่ามีอุบัติการณ์สูงขึ้นในมะเร็งปอด ตับอ่อน และมะเร็งลำไส้ [2] ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนแควราสในมะเร็งชนิดต่างๆ [2]

Cancer type	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRAF</i>
Biliary tract	0%	33%	1%	14%
Bladder	11%	4%	3%	0%
Breast	0%	4%	0%	2%
Cervix	9%	9%	1%	0%
Colon	0%	32%	3%	14%
Endometrial	1%	15%	0%	1%
Kidney	0%	1%	0%	0%
Liver	0%	8%	10%	3%
Lung	1%	19%	1%	2%
Melanoma	6%	2%	18%	43%
Myeloid leukaemia	0%	5%	14%	1%
Ovarian	0%	17%	4%	15%
Pancreas	0%	60%	2%	3%
Thyroid	5%	4%	7%	27%

The mutation data was obtained from the [Sanger Institute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer](#) web site¹⁴⁸.

Robert J.C. และคณะ [16] ได้ทำการตรวจหา การกลายพันธุ์ของแควราส (*K-ras* mutation) ตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12 จากชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อนจำนวน 550 รายตั้งแต่ปี ค.ศ.1995-1998 แต่มีเพียง 67 รายที่มีชิ้นเนื้อเพียงพอในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR) พบว่าการกลายพันธุ์ของยีนแควราส 46 (ร้อยละ 75) ใน 61 คน โดยการกลายพันธุ์มักเป็น point mutation จาก GGT เป็น GAT (ร้อยละ 54) หรือ GTT (ร้อยละ 30) เปลี่ยนจาก glycine เป็น aspartic acid หรือ valine

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการตรวจและไม่พบการกลายพันธุ์ได้แก่ ประวัติของการเป็นเบาหวาน ก่อนได้รับการวินิจฉัยมะเร็งตับอ่อน ($P < 0.02$, Fisher exact test) สำหรับระยะของมะเร็ง (staging tumor) grading cell type ไม่พบถึงความสัมพันธ์ในกลุ่มที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ

ยื่นเคราส แต่ดูเหมือนว่าจะมีแนวโน้มในการตรวจพบการกลายพันธุ์เมื่อมีระยะเวลาการดำเนินโรคที่มากขึ้น ($P=0.08$ X2 test for trend) ดังตารางที่ 2 แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่สามารถนำตรวจนั้นมักอยู่ในระยะที่สามารถผ่าตัดได้ และมีชิ้นเนื้อเพียงพอ

ตารางที่ 2 แสดงคุณลักษณะของผู้ป่วยที่ตรวจ การกลายพันธุ์ของเคราสยื่น จำนวน 61

ราย [16]

Characteristic	n	K-ras negative n = 15	K-ras positive n = 46	P
Age at diagnosis (\pm SD)	61	64.6 (\pm 9.8)	63.9 (\pm 11.3)	0.84 ^a
Sex				0.77 ^b
Female	34	9 (60%)	25 (54%)	
Male	27	6 (40%)	21 (46%)	
Race				1.00 ^c
African-American	4	1 (7%)	3 (7%)	
Asian	4	1 (7%)	3 (7%)	
White	53	13 (86%)	40 (86%)	
Diabetes ^d				0.002 ^b
Yes	8	6 (40%)	2 (4%)	
Average yr prior (\pm SD)		10.8 (\pm 6.5)	4 (\pm 2.8)	
Range (yr)		4–21	2–4	
Tumor stage				0.08 ^e
I	13	6 (40%)	7 (15%)	
II	14	3 (20%)	11 (24%)	
III	25	4 (26%)	21 (45%)	
IV	5	1 (7%)	4 (9%)	
Unknown	4	1 (7%)	3 (7%)	
Glandular differentiation				0.59 ^e
Well	28	6 (40%)	22 (48%)	
Moderately	15	7 (47%)	8 (17%)	
Poorly	18	2 (13%)	16 (35%)	
Nuclear atypia				0.32 ^e
Mild	15	5 (33%)	10 (22%)	
Moderate	20	5 (33%)	15 (33%)	
Severe	26	5 (33%)	21 (45%)	
Mitotic index ^f				0.71 ^e
Low	36	9 (60%)	27 (59%)	
Medium	18	5 (33%)	13 (28%)	
High	7	1 (7%)	6 (13%)	
Tumor grade				0.54 ^e
I	23	6 (40%)	17 (37%)	
II	16	5 (33%)	11 (24%)	
III	22	4 (27%)	18 (39%)	

^a Student's *t*-test.
^b Fisher's exact test.
^c χ^2 test.
^d Self-reported diabetes more than 1 year prior to pancreatic cancer diagnosis.
^e χ^2 test for trend.
^f Mitotic figures per 10 high-power fields: low, 0–5; medium, 6–10; high, >10.

Ralph H.Hruban และคณะ [1] ทำการศึกษาจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอ่อนจำนวน 82 ราย ตรวจหาการกลายพันธุ์ (K-ras mutation) ของโคดอน (codon) ที่ 12 จากชิ้นเนื้อ 68 (ร้อยละ 83) ใน 82 ราย พบว่า 33 ราย (ร้อยละ 49) มีการเปลี่ยนแปลงจาก guanine เป็น adenosine transition 27 (ร้อยละ 39) GGT-GAT guanine เป็น thymine transversion GGT-GTT และ 8 ราย (ร้อยละ 12) guanine เป็น cytosine GGT-TGT ดังตารางที่ การกลายพันธุ์พบในสวนของหัว 61/75 (ร้อยละ 81) สวนตัวหรือหางของตับอ่อน 7/7 (การศึกษานี้ใช้การตรวจด้วย

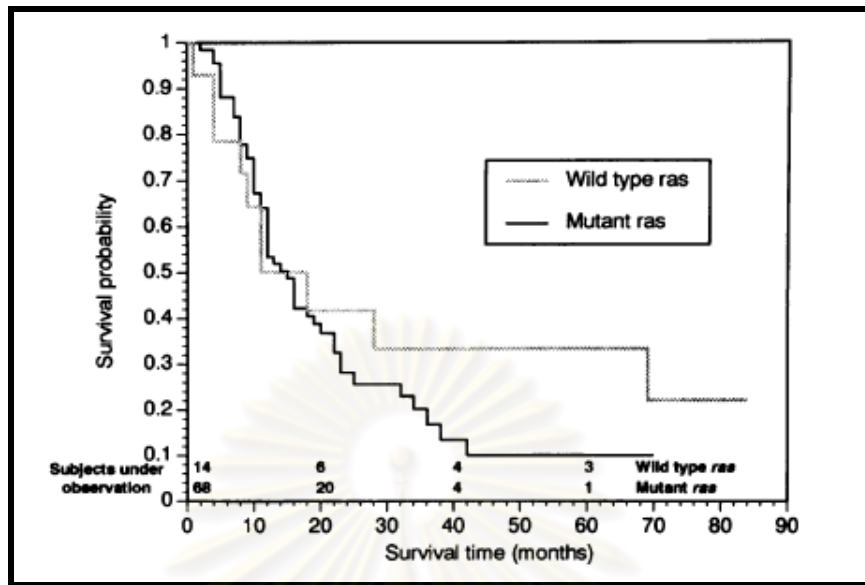
วิธี Primer-mediated, mutantenriched,PCR-RFLP analysis พบผู้ป่วยอุบัติการ ณ์ของการ กลายพันธุ์ของยีนเคราส ในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่หรือเคยมีประวัติกา รสูบบุหรี่ มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่เคยมี ประวัติการสูบบุหรี่ คิดเป็นร้อยละ 89.86 และ 68 ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.046) ดังแสดงผลในตารางที่ 3

การศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการรอดชีวิตในผู้ ปวยที่เป็นมะเร็งตับอ่อน ที่มีการกลายพันธุ์หรือไม่มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงใน แผนภูมิที่ 2 Kaplan-Meier survival Curve (p=0.05)

นอกจากนี้พบว่าการตรวจพบ การกลายพันธุ์ไม่สัมพันธ์กับ tumor proliferation index survival tumor ploidy

	Total N	Mutant ras	Wild type ras
Age	82	61.3 (SD 10.4)	60.4 (SD 9.6)
Race			
White	72	60 (83%)	12 (17%)
African-American	10	8 (80%)	2 (20%)
Sex			
Male	43	35 (81%)	8 (19%)
Female	39	33 (85%)	6 (15%)
Smoking Status			
Never	22	15 (68%)	7 (32%)
Ex	38	34 (89%)	4 (11%)
Current	22	19 (86%)	3 (14%)
Ploidy			
Missing	4	3 (75%)	1 (25%)
Diploid	28	22 (79%)	6 (21%)
Aneuploid	50	43 (86%)	7 (14%)
Tumor location			
Head	75	61 (81%)	14 (19%)
Body/tail	7	7 (100%)	0 (0%)
Alive at follow-up	82	25%	29%
Median follow-up	82	13 Months	11 Months

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาลักษณะประชากรจากการศึกษาของ Ralph H.Hruban และคณะ เปรียบเทียบระหว่างมีการกลายพันธุ์ (K-ras mutant) หรือไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) [1]



แผนภูมิที่ 2 แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยจำนวน 82 รายเปรียบเทียบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) และ ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติต่ออัตราการรอดชีวิต (p=0.05)

[1]

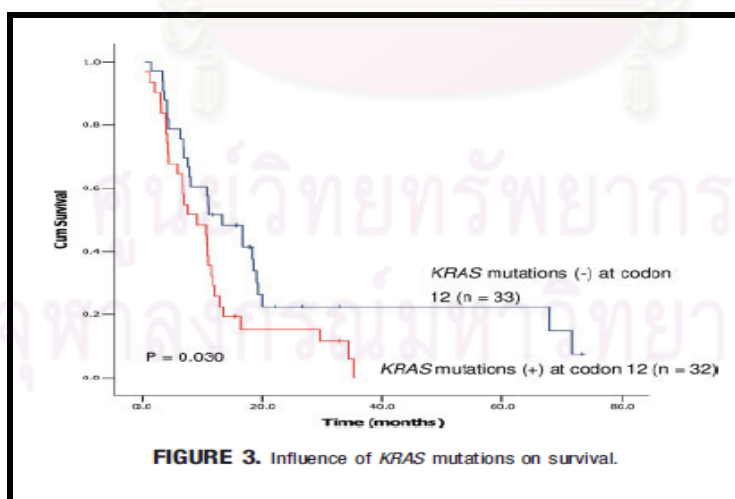
	No. cases examined	Total mutant	Wild type (GGT)	Types of mutations found in codon 12						Codon 13
				ASP (GAT)	VAL (GTT)	ARG (CGT)	CYS (TGT)	ALA (GCT)	SER (AGT)	ASP (GAC)
Current study	82	68 (83%)	14 (17%)	33 (49%)	24 (35%)	8 (12%)	3 (4%)	0	0	NE
Almoguera ¹⁹ (1988)	22	21 (95%)	1 (5%)	-	-	-	-	-	-	-
Burmer ²⁰ (1991)	20	16 (80%)	4 (20%)	1 (6%)	4 (25%)	8 (50%)	2 (13%)	1 (6%)	0	-
Capella ²¹ (1991)	68	51 (75%)	17 (25%)	24 (47%)	14 (27%)	5 (10%)	6 (12%)	0	1 (2%)	1 (2%)
Gonzalez-Cadavid ²² (1989)	17	3 (18%)	14 (82%)	-	-	-	-	-	-	-
Grünwald ⁷ (1989)	63	47* (75%)	16 (25%)	18 (37%)	15 (31%)	15 (31%)	0	1 (2%)	0	-
Lemoine ⁹ (1992)	16	12 (75%)	4 (25%)	2 (17%)	3 (25%)	2 (17%)	0	0	5 (42%)	-
Mariyama ²³ (1989)	12	8* (75%)	4 (25%)	6 (55%)	2 (18%)	2 (18%)	0	0	0	-
Motojima ²⁴ (1991)	40	35* (88%)	5 (12%)	24 (67%)	7 (19%)	4 (11%)	1 (3%)	0	0	-
Nagata ²⁵ (1990)	38	35* (92%)	3 (8%)	24 (65%)	9 (24%)	2 (5%)	1 (3%)	0	0	1 (3%)
Neuman ²⁶ (1991)	6	5 (83%)	1 (17%)	4 (80%)	1 (20%)	0	0	0	0	-
Shibata ²⁷ (1990)	36	20 (56%)	16 (44%)	-	-	-	-	-	-	-
Smit ⁸ (1988)	30	28 (93%)	2 (7%)	9 (32%)	8 (29%)	1 (4%)	10 (36%) [†]	0	0	-
Total	450	349 (78%)	101 (22%)	145 (47%)	87 (28%)	47 (15%)	23 (7%)	2 (1%)	6 (2%)	-

* Multiple mutations found in some tumors. -: RNAase mismatch method used; ASP: Aspartic Acid; VAL: Valine; ARG: Arginine; CYS: Cysteine; ALA: Alanine; GLY: Glycine; SER: Serine.
[†] In this study, the presence of TGT mutations observed may be overrepresented (see text).

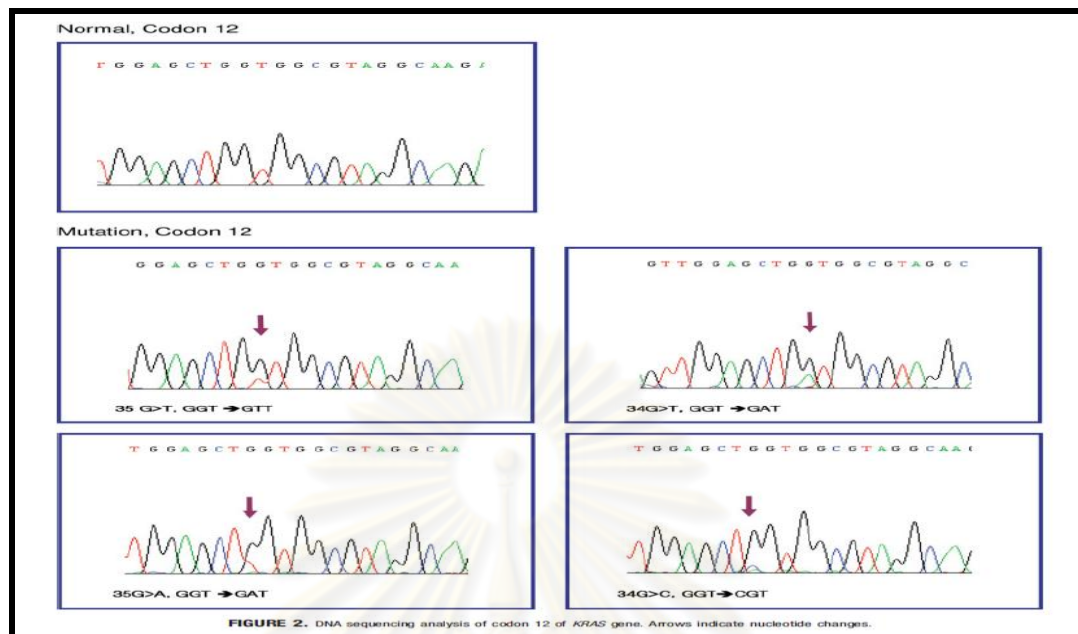
ตารางที่ 4 แสดงอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของเคราสยีน (K-ras mutation) พบว่าอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 60-90 โดยทั่วไปเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่โคดอน (codon) 12 โดย เปลี่ยนจาก GGT-GAT และ GTT ตามลำดับ [1]

Jeeyun Lee, MD [17] ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน ในประเทศเกาหลีจำนวน 65 รายที่เป็นมะเร็งตับอ่อน ระยะไม่สามารถผ่าตัดได้หรือมีการแพร่กระจายแล้ว ทั้งหมดการกลายพันธุ์จะอยู่ที่โคดอน (codon) ที่ 12 32 ราย คิดเป็นร้อยละ 49 ไม่พบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 13 และ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมักเกิดเปลี่ยนแปลงในส่วนของ glycine เป็น adenosine GGT-GAT ของตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12 (35G > A, 19 รายจาก 32 ราย, คิดเป็นร้อยละ 59) และ GGT-GTT ของตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12 (35G > T, 8 รายจาก 32 ราย คิดเป็นร้อยละ 25), GGT->CGT (34G > C) ร้อยละ 9, 3 ราย จาก 26 ราย, และ GGT->TGT (34G > T, 1 ราย ใน 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 4) ตามลำดับ(ส่วนของ primer ที่ใช้ โคดอน (codon) 12, 13 คือ ,F: 50-ttatgtgtgacatgttctaata, R: 50-agaatggtcctgcaccagtaa; codon 61, F: 50-TCAAGTCCTTTGCCCATTTT, R:50-TGCATGGCATTAGCAAAGAC)

ในการศึกษานี้พบว่าการตรวจพบ การกลายพันธุ์ของ (K-ras mutation) นั้นสามารถบอกถึงการพยากรณ์โรคที่แยกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) เมื่อได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดโดยชนิด gemcitabine (median survival time (9.1 vs 13.4 months, K-RAS mutation P .030,retrospective) ดังแสดง แผนภูมิที่ 3



แผนภูมิที่ 3 แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนจากการศึกษาของ Jeeyun Lee, ที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutation) และไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) (median survival time (9.1 vs 13.4 months,K-RAS mutation p .030,retrospective) [17]



แผนภูมิที่ 4 แสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) และ (K-ras wild type) ที่โคดอน (codon) 12,13 [17]

Hugh E. Mulacahy และคณะ [18] ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของเคราสยีน (K-ras mutation) ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอ่อน พบว่า ตรวจพบ บมีการกลายพันธุ์ในพลาสมา 17 คน (ร้อยละ 81) จากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการกลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อ 21 คน ในกลุ่มที่สามารถตรวจได้ ทั้งในเนื้อเยื่อและในพลาสมา พบว่าการกลายพันธุ์สอดคล้องกัน ทั้งในพลาสมาและในชิ้นเนื้อ มะเร็ง

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2 Clinical features and K-ras mutations in 21 pancreatic cancer patients

No./sex/age (yr)	Tumor site	Tumor size (cm) ^a	Plasma K-ras	Tumor K-ras	Outcome	Follow-up (mo) ^b
1/F/49	Head	2.0 × 2.0	GTT	GTT ^c	DOD ^d	16.7
2/M/63	Head	4.0 × 3.5	TGT	TGT/GAT	DOD	7.3
3/M/70	Head	3.0 × 2.0	GTT	GTT	DOD	9.6
4/M/56	Head	2.0 × 2.0	GTT/TGT	GTT/TGT	AWD ^f	12.2
5/M/57	Head	3.0 × 3.0	TGT	TGT	DOD	2.4
6/M/73	Head	4.0 × 3.0	CGT	CGT	DOD	3.0
7/F/53	Body	4.0 × 3.5	GTT	GTT	DOD	6.4
8/F/75	Head	3.0 × 3.0		TGT	DOD	1.7
9/M/69	Head	5.0 × 4.0			DOD	4.7
10/F/56	Head	4.0 × 3.0			DOD	1.2
11/F/71	Body	4.5 × 3.5	GTT	NA ^g	DOD	7.2
12/F/75	Head	4.5 × 2.0	TGT	NA	DOD	5.7
13/F/48	Head	4.0 × 3.0	GTT	NA	DOD	7.3
14/F/88	Head	3.0 × 2.0	TGT	NA	DOD	4.8
15/M/51	Head	3.0 × 2.5	GAT	NA	DOD	5.5
16/M/50	Head	2.0 × 2.0	TGT	NA	DOD	5.2
17/F/60	Head	5.0 × 3.0	GTT	NA	DOD	2.2
18/F/41	Head	2.0 × 2.0	GTT	NA	DOD	7.9
19/F/74	Body	3.5 × 3.5	GAT	NA	DOD	2.7
20/M/74	Head	4.0 × 2.0	GTT	NA	DOD	5.5
21/F/52	Head	4.0 × 3.0		NA	DOD	5.9

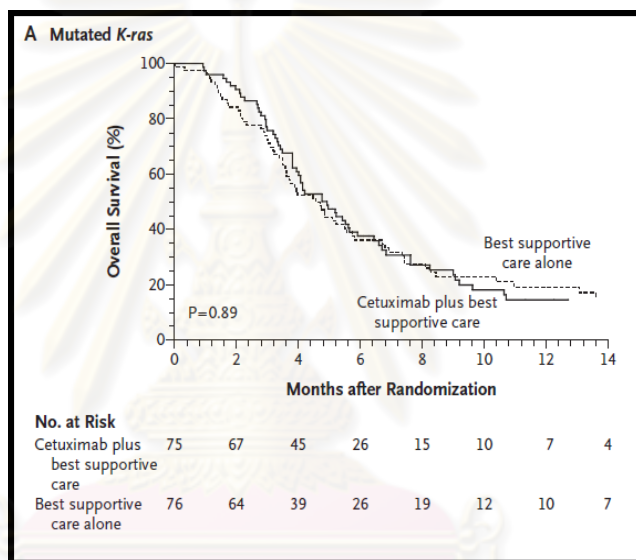
^a Estimated from radiological data.
^b From time of plasma sample.
^c Tumor tissue obtained at biopsy of liver metastasis.
^d DOD, dead of disease.
^e No tumor tissue or mutant DNA found in initial pancreatic biopsy.
^f AWD, alive with disease.
^g NA, no biopsy tissue available for DNA testing.

ตารางที่ 5 แสดงการกลายพันธุ์ของเคราสีนของผู้ป่วยในการศึกษา Hugh E. Mulacahy และคณะ จำนวน 21 ราย [18]

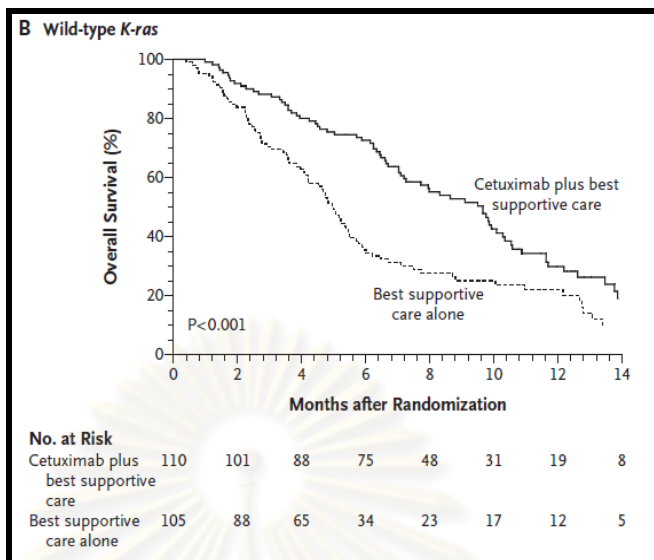
Antoni Castells และคณะ [19] ได้ทำการศึกษา การกลายพันธุ์ของเคราสีน ในพลาสมาผู้ป่วยที่ได้เป็นมะเร็งตับอ่อน จำนวน 44 ราย โดยใช้กลุ่มควบคุม(control) เป็นผู้ป่วยที่เป็นตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง (chronic pancreatitis) 37 ราย 10 รายเป็นเนื้องอกในตับอ่อน 9 รายเป็นตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน 4 รายเป็นคนปกติ โดยใช้วิธี PCR ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่โคดอน (codon) ที่ 12 พบว่าพบการกลายพันธุ์จากการตรวจในพลาสมา 12 ราย 27 จากผู้ป่วย 44 รายโดยพบว่ามี ความสำคัญกับระยะของการเป็นโรค (p=0.05) ระยะของการแพร่กระจาย (M1) (P0.02) นอกจากนี้ยังพบ การกลายพันธุ์ในผู้ป่วย ที่เป็นตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง 2 (ร้อยละ 5) รายใน 37 ราย และพบว่ากลุ่มที่มีความผิดปกติจะมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า (p<0.05)สำหรับในเนื้อเยื่อ 39 คน พบว่ามี การกลายพันธุ์ 28 ราย 9 ราย (ร้อยละ 32) พบว่ามีความสัมพันธ์ของในพลาสมาและในเนื้อเยื่อ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าในปัจจุบันการเข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของมะเร็งทำให้นำไปสู่การรักษาด้วยยาในกลุ่ม targeted therapy ที่ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งของ EGFR ทั้งในรูปแบบของแอนติบอดี หรือกลไกในส่วนของ receptor เอง (เช่น gefitinib, Erlotinib)

Christos S. Karapetis และคณะ [20] ศึกษาผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจาย แล้วเปรียบเทียบการให้ยา cetuximab หรือการให้การรักษาระดับประคองเพียงอย่างเดียว จำนวน 572 รายซึ่งสามารถนำชิ้นเนื้อมาตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสจำนวน 394 พบว่า ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutant) การรักษาด้วยยาดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกัน ของมัธยฐานการรอดชีวิต (hazard ratio, 0.98; P = 0.89) แต่สำหรับกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) พบว่ามีความแตกต่างกันของมัธยฐานการรอดชีวิต (median, 9.5 vs. 4.8 months; hazard ratio for death, 0.55; 95% confidence interval CI, 0.41 to 0.74; P < 0.001) ดังแผนภูมิที่ 5 และ 6

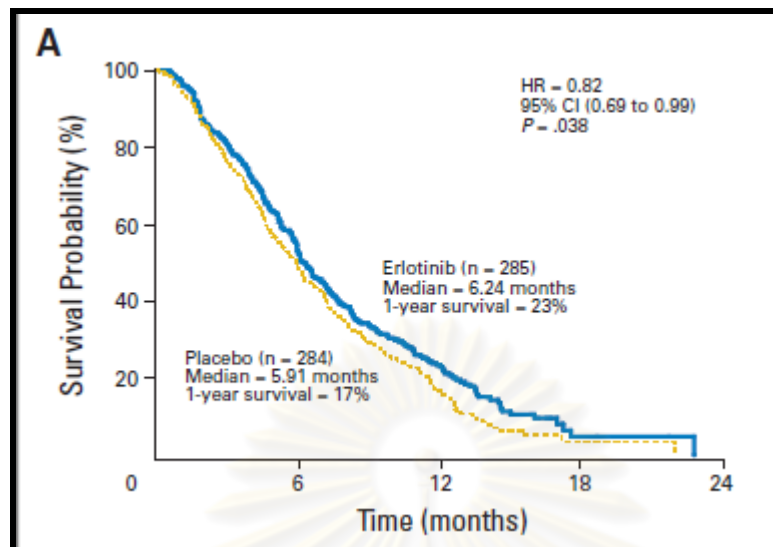


แผนภูมิที่ 5 แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของเคราสยีน (K-ras mutant) ได้รับการรักษาด้วย targeted therapy เปรียบเทียบกับการรักษาระดับประคอง [20]



แผนภูมิที่ 6 แสดง Kaplan-Meier survival Curve ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราสี้น (wild type) ได้รับการรักษาด้วย targeted therapy เปรียบเทียบกับการรักษาประคับประคอง [20]

ในมะเร็งตับอ่อนยา ชนิดที่มีผลต่อมะเร็งเท่านั้น (targeted therapy) เริ่มมีบทบาทมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดมาตรฐาน จากการศึกษานี้ของ Malcolm J. Moore และคณะ [21] เปรียบเทียบการใช้ยา Erlotinib (targeted therapy ต่อ EGFR) ร่วมกับยามาตรฐาน gemcitabine (Erlotinib+gemcitabine phase III) ในกลุ่มมะเร็งตับอ่อนระยะลุกลามหรือแพร่กระจายเปรียบเทียบกับให้การรักษาด้วยยามาตรฐานเพียงอย่างเดียว (คำถามวิจัยหลักคือการเพิ่มอัตราการรอดชีวิต overall survival) พบว่ากลุ่มที่ได้ยาในกลุ่ม targeted therapy (Tarceva ร่วมกับ gemcitabine) ร้อยละที่ผู้ป่วยรอดชีวิตในช่วง 12 เดือนสูงขึ้นในกลุ่มที่รักษาด้วยยา เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่รักษาด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (gemcitabine) (23% v 17%; $p=0.023$) มาตรฐานการรอดชีวิตในกลุ่มที่ได้ยาสองตัวดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ 6.24 เดือนเทียบกับ 5.91 เดือน (HR=0.82 (95% CI, 0.69 to 0.99; $p=0.038$, adjusted for stratification factors; median 6.24 months v 5.91 months) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกายอมรับเป็นทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนที่จะได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด



แผนภูมิที่ 7 Kaplan-Meier curves แสดงการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย erlotinib ร่วมกับ gemcitabine เทียบกับ gemcitabine [21]

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจ EGFR (epidermal growth factor receptor) ในผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษา 184 รายได้รับชิ้นเนื้อ มี 162 รายที่มีชิ้นเนื้อเพียงพอสำหรับการตรวจ พบว่าร้อยละ 53 ตรวจพบ EGFR ซึ่งในการวิจัยสรุปว่า การที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR ยังไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการได้ยาในกลุ่ม targeted therapy (แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจการกลายพันธุ์ของเคราสีน)

การศึกษาในระยะที่ 2 (Phase II) ของ George Fountzilias และคณะ [22] ด้วยการให้ยา gefitinib (ซึ่งเป็นยาในกลุ่มการรักษาแบบมุ่งเป้าโดยออกฤทธิ์ที่ EGFR) ร่วมกับการให้เคมีบำบัด gemcitabine ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอ่อนที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ (locally advanced pancreatic cancer) จำนวน 53 ราย พบว่ามีการตอบสนอง (partial response) ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา 6 ราย และ อาการคงที่ (stable disease) 12 ราย มีฐานการรอดชีวิตอยู่ที่ 7.3 เดือนและมีฐานการกำเริบของโรคอยู่ที่ 4.1 เดือน อัตราการรอดชีวิตที่ 1 ปี พบได้ร้อยละ 27 ทั้งนี้ยังตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราสีนในตำแหน่ง โคดอน (codon) ที่ 12 และ 13 (ด้วยการใช้ PCR DNA sequencing)

	N(%)
EGFR IHC <i>n</i> = 30 (NE 0)	
Positive	23 (77)
Negative	7 (23)
EGFR gene status <i>n</i> = 19 (NE 4)	
Normal	16 (84)
Gain	3 (16)
HER-2 IHC <i>n</i> = 28 (NE 2)	
Positive	6 (21)
Negative	22 (79)
HER-2 gene status <i>n</i> = 18 (NE 5)	
Normal	14 (78)
Gain	4 (22)
PTEN IHC <i>n</i> = 29 (NE 1)	
No Loss	7 (24)
Loss	22 (76)
PTEN gene status <i>n</i> = 20 (NE 3)	
Normal	5 (25)
Deletion	14 (70)
Gain	1 (5)
K-RAS mutation <i>n</i> = 34 (NE 0)	
Wild Type	17 (50)
Mutated	17 (50)
EGFR mutation <i>n</i> = 34 (NE 0)	
Wild Type	32 (94)
Mutated	2 (6)

NE = Non-Evaluable
For each biomarker, *n* corresponds to the number of evaluable patients and percentages are calculated among them.

ตารางที่ 6 แสดง Biomarker profile จากการศึกษาของ George Fountzilas และคณะ [22]

จากการศึกษาพบว่าสามารถนำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังเก็บไว้ใน พาราฟิน (Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks) จำนวน 38 ราย ตรวจพบการ กลายพันธุ์ของเคราสี้น ร้อยละ 50 (17 รายมีการกลายพันธุ์ และ 17 รายมีเคราสี้นที่ปกติจาก ผู้ป่วยทั้งหมด 38 รายที่สามารถนำชิ้นเนื้อมาตรวจได้) นอกจากนั้นยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราสี้นหรือไม่มีการกลายพันธุ์ในด้านค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตและการกำเริบของโรค

การศึกษาของ Henry Q. Xiong และคณะ [23] ซึ่งเป็นการศึกษาในระยะที่ 2 (clinical trail phase II) ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนระยะที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ หรือระยะแพร่กระจายด้วยการ ให้ยาในกลุ่มต้านอีจีเอฟอาร์ แบบโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Anti-EGFR Monoclonal Antibody) ร่วมกับยาเคมีบำบัดมาตรฐานคือ gemcitabine จำนวนผู้ป่วย 41 รายพบว่าอัตราการตอบสนองของโรคอยู่ที่ร้อยละ 12 อาการคงที่ร้อยละ 63.2 และมีการกำเริบของโรคร้อยละ 14

โดยสรุปการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในตับอ่อนพบได้ประมาณร้อยละ 70-90 ขึ้นกับแต่ละการศึกษา ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าในมะเร็งตับอ่อนการกลายพันธุ์ดังกล่าวจะส่งผลต่อการรักษา (predictive factor) หรือการดำเนินโรค (prognostic factor) ที่แย่ไปกว่าการไม่มีการกลายพันธุ์ การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลังทั้งสิ้น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer)

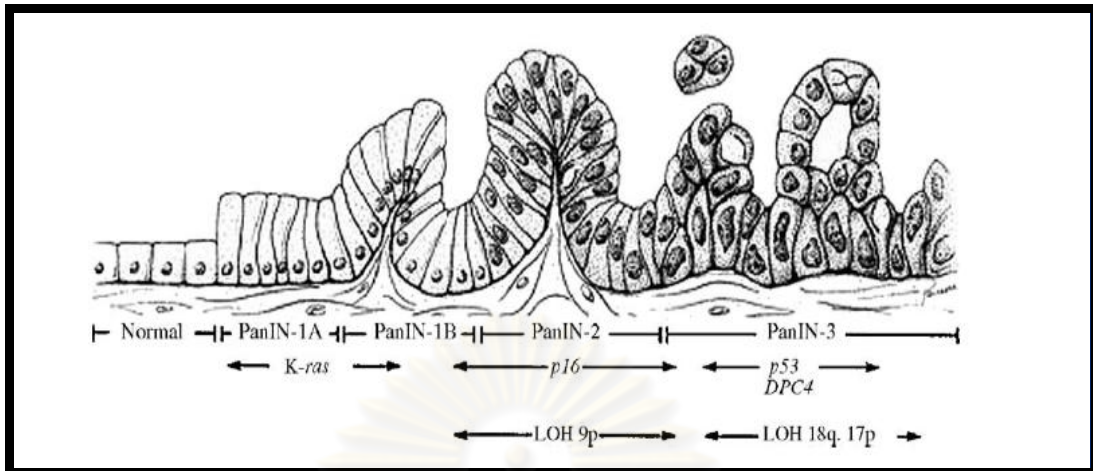
ระบาดวิทยา (epidemiology) ในสหรัฐอเมริกา ช่วงปี 2007 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งตับอ่อน โดยประมาณ 33370 ราย นับเป็นสาเหตุการตายจากมะเร็งอันดับสี่ ในเพศชาย [24]ตามรายงานของสหรัฐอเมริกา ในประเทศไทยเป็นมะเร็งที่พบได้ไม่บ่อย (พบประมาณปีละ 634 ราย) หรือ 1.07% ของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด มักพบในคนอายุเฉลี่ย 60 ปี ชาย:หญิง = 1.5:1 ASR 1.9:แสนในชายและ 1.3:แสนในหญิงไทย มักพบที่ตำแหน่งหัวของตับอ่อน (Head of pancreas) ประมาณ 2/3 ผู้ป่วยโรคนี้อัตราตายสูง (อัตราผู้รอดชีวิตที่ 5 ปีโดยรวมแล้วมีเพียงร้อยละ 1-4) เนื่องจากวินิจฉัยในระยะเริ่มต้นสามารถทำได้ยาก ไม่มีอาการที่จำเพาะเจาะจงและไม่มีวิธีการรักษาที่ให้ผลดี

ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งตับอ่อนแน่ชัด [25] แต่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ การสูบบุหรี่[26] การกินอาหารที่มีไขมันสูง อ้วนและการทำงานที่เกี่ยวข้องกับสารเคมี อันได้แก่ beta-naphthylamine และ benzidine [27] การมีปัญหตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง [28-29] และการเป็นเบาหวาน สำหรับการดื่มสุรา ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันว่าเป็นปัจจัยทำให้เกิดมะเร็งตับอ่อนหรือไม่ [30-31]

ผู้ป่วยร้อยละ 5 มีประวัติเป็นมะเร็งตับอ่อนในครอบครัว จากการศึกษาพบว่ายีนที่น่าเกี่ยวข้องมากที่สุดคือ p16 gene (CDKN2) และ BRCA2 นอกจากนี้มะเร็งตับอ่อนยังพบได้ในกลุ่มโรคมะเร็งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ เช่น Familial adenomatous polyposis coli, Herediatry non-polyposis colorectal cancer, Peutz-Jeghers syndrome, ataxia telangiectasia, von Hippel-Ridau, Li-Fraumeni syndrome, breast and ovarian cancer families เป็นต้น [32-34]

อณูชีววิทยา (molecular biology) ของมะเร็งตับอ่อน

(กล่าวละเอียดในบทของ molecular of pancreatic ductal adenocarcinoma)



แผนภูมิที่ 8 แสดงพยาธิวิทยาและการกลายพันธุ์ของระดับอ่อนตบอ่อน [35] ความผิดปกติของการกลายพันธุ์ในระยะต่างๆของการก่อมะเร็งตบอ่อน

ในมะเร็งตบอ่อนพบการกลายพันธุ์ของเคราสีน (K-ras mutation) มากกว่าร้อยละ 70-90 โดยการกลายพันธุ์ มักพบตั้งแต่ระยะต้น ตั้งแต่ขั้นกระบวนการก่อมะเร็ง PanIN-1(pancreatic intraepithelial neoplasm) ส่วน Lost of heterozygous (LOH) of p53 gene หรือมีการสร้างโปรตีน p53 ที่ผิดปกติ (mutant p53) พบได้ร้อยละ 60 ถึง 70 การขาดหายไปของโครโมโซมที่ 16 (p16 deletion) พบได้มากกว่าร้อยละ 80 และ SMAD4 gene deletion and point mutation พบได้ร้อยละ 50 การกลายพันธุ์ของเคราสีนมักพบลักษณะ single point mutation ซึ่งจะเกิดในตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12,13 และพบในโคดอน (codon) 59, 61, 63 [35]

อาการและอาการแสดง

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มาด้วยอาการ น้ำหนักลด เบื่ออาหาร ร่วมกับมีอาการปวดท้อง โดยเฉพาะปวดท้องแถวลิ้นปี่ (epigastrium) ร้าวไปหลัง หรือบางรายอาจมีเฉพาะอาการปวดหลัง ปวดมากเวลากลางคืน อาการปวดอาจมากขึ้นเมื่อผู้ป่วยนอนหงาย บางรายอาจมีอาการ ตัวเหลืองตาเหลือง โดยไม่มีอาการปวด อุจจาระสีซีด คลื่นไส้ อาเจียน หรืออาจมาด้วยอาการ ตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน (acute pancreatitis) ติดเชื้อทางในระบบทางเดินน้ำดี (cholangitis) เบาหวาน (โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเบาหวานชนิดที่ 2 ร่วมกับมีอาการอึดแน่นท้องและน้ำหนักลดอย่างต่อเนื่อง) [36] หรือ deep vein thrombosis บางรายอาจมาด้วยอาการของการขาดสารอาหารเนื่องจากการทำงานที่ลดลงของ ตับอ่อน อย่างไรก็ตามไม่มี อาการเตือนที่เป็นลักษณะจำเพาะของมะเร็งตบอ่อนที่ชัดเจน ทำให้ ระยะของโรคเมื่อได้รับการวินิจฉัยไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้

การจำแนกระยะของโรค

การจำแนกระยะของมะเร็งตับอ่อนแบ่งตามระบบ AJCC ปี 2002 American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging of Pancreatic Cancer (2002) เป็นการแบ่งระยะตามอาการและตามการผ่าตัด (Clinical and surgical staging)

T1 limited to pancreas 2 cm. or less
T2 limited to pancreas more than 2 cm.
T3 tumor extend to duodenum, bile duct, peripancreatic tissue
T4 extrapancreatic spread (stomach, colon, spleen, large vessel)
N1a one regional group involved
N1b two or more regional group

Stage grouping

Stage I T1-2 N0

Stage II T3 N0

Stage III T1-3 N1

Stage IV A T4 any N

Stage IVB any T any N

	T1	T2	T3	T4
N0	1A	1B	1C	3
N1	2B			
M1	4			

การตรวจเพิ่มเติม (Investigation)

ปัจจุบันการวินิจฉัยมะเร็งตับอ่อนต้องอาศัยความสามารถในด้านรังสี ร่วมกับความสามารถในด้านการนำชิ้นเนื้อ เพื่อการวินิจฉัยเนื่องจากตับอ่อนเป็นอวัยวะที่อยู่ในช่องท้องและอาการและอาการแสดงไม่จำเพาะเจาะจงต่อโรค

- Ultrasound อาจตรวจพบก้อนที่ใหญ่กว่า 2 ซม. ได้ และอาจเห็นท่อน้ำดีโตกว่าปกติ
- CT scan of the abdomen with contrast-enhanced อาจตรวจไม่พบถ้าก้อนมีขนาดเล็กกว่า 1 ซม. (ไม่จำเป็นต้องทำ coeliac and mesenteric angiography สำหรับ pre-operative staging) ปัจจุบันแนะนำให้ทำ CT scan dual-phase contrast thin-cut pancreatic protocols เนื่องจากสามารถเห็นรายละเอียดของตับอ่อนได้ดี โดยดูรายละเอียดดังต่อไปนี้เพื่อพิจารณาการผ่าตัด
 1. ไม่มีการกระจายของตัวมะเร็งออกนอกตับอ่อน (metastasis)
 2. ไม่มีการอุดตันของเส้นเลือดดำ mesenterics หรือ portal vein
 3. ไม่มีการกระจายหรือกดเบียดของ celiac axis และเส้นเลือดแดง mesentery (SMA)

พบว่าถ้าใช้การพิจารณาทางรังสีทั้ง 3 แบบ จะทำให้มีโอกาสการผ่าตัดได้ 70-85% [37-38]

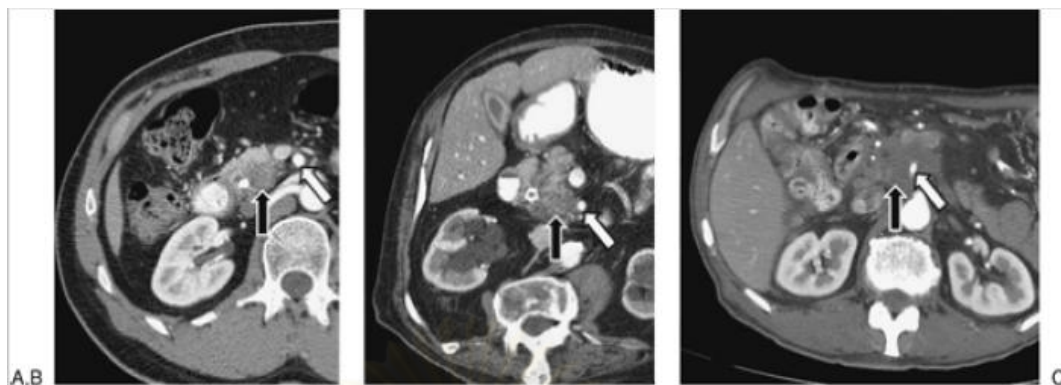
การใช้ CT-guided fine-needle aspiration (FNA) สามารถช่วยในการพิสูจน์เซลล์มะเร็งได้ แต่วิธีการนี้ต้องอาศัยความชำนาญของแพทย์ทางรังสีร่วมรักษา (interventional radiologist)

- MRI มีบทบาทในมะเร็งตับอ่อนน้อยกว่า CT scan แต่มีข้อได้เปรียบคือสามารถทำ MRI cholangiography เพื่อช่วยในการดูทางเดินน้ำดีได้โดยไม่ต้องทำ ERCP แต่ข้อเสีย คือใช้เวลาในการทำ (image acquisition) ค่อนข้างนาน
- Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography (ERCP) การส่งกล้องท่อน้ำดีและตับอ่อน ช่วยให้ได้ชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัย (tissue diagnosis) โดยการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) และ brush cytology พร้อมทั้งสามารถรักษาอาการเหลืองจากการอุดตันของระบบทางเดินน้ำดี โดยการส่องท่อไม่ว่าจะเป็นพลาสติกหรือโลหะก็ตาม

การพิสูจน์ชิ้นเนื้อที่มีประสิทธิภาพคือการตัดชิ้นเนื้อผ่าน endoscope (ERCP – endoscopic retrograde cholangiopancreatography) วิธีนี้ยังสามารถช่วยให้ได้ภาพทางรังสี ซึ่งแสดงถึง

การอุดตันของท่อน้ำดี และท่อตับอ่อน และช่วยในการรักษาแบบประคับประคองโดยการใส่ endobiliary stent เพื่อลดอาการเหลืองจากการอุดตันของทางเดินน้ำดี ปัจจุบันมีการใช้ endoscopic ultrasound และการใช้ endoscopic ultrasound-directed FNA เพื่อให้การวินิจฉัยแม่นยำขึ้น

- EUS (endoscopic ultrasound) การส่องกล้องตรวจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง สามารถช่วยในการวินิจฉัย และการตรวจการลุกลามของตัวมะเร็ง สู่เส้นเลือด (vascular invasion) และต่อมน้ำเหลืองซึ่งมีบทบาทมากในปัจจุบัน แต่ยังคงจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญการในการทำหัตถการและยังมีเฉพาะในโรงเรียนแพทย์หรือโรงพยาบาลศูนย์ที่มีขนาดใหญ่เท่านั้น [39-40]
- PET scan มีประโยชน์ในด้านการมองหาการแพร่กระจายที่ตรวจด้วยวิธีอื่นไม่เห็น (occult malignancy) ปัจจุบันประโยชน์ของ PET สำหรับมะเร็งตับอ่อนยังอยู่ในระหว่างการศึกษา โดยทั่วไปยังไม่มีประสิทธิภาพที่เหนือไปกว่า การใช้เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ที่มีความละเอียดสูง (high resolution CT scan)
- Laparoscope การผ่าตัดด้วยวิธีส่องกล้อง เป็นหัตถการเพื่อให้ได้รับการวินิจฉัยในเรื่องของการแพร่กระจายไปสู่เยื่อผนังช่องท้อง (peritoneum) หรือในช่องท้องที่มีขนาดเล็กและไม่แน่ชัดจากการทำ CT scan NCCN แนะนำว่าถ้าตรวจพบเซลล์มะเร็งในส่วนของน้ำล้างท้อง จากการผ่าตัดด้วยการส่องกล้อง (laparoscope) ให้ถือว่าเป็นระยะแพร่กระจาย (M1 disease) [41-42]
- สารบ่งชี้มะเร็ง (Tumor markers) อาทิเช่น CEA, CA 19-9 ความไวของการตรวจอยู่ที่ประมาณ (sensitivity) ร้อยละ 70-90, ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 90% CA 19-9 ไม่จำเพาะว่าต้องขึ้นในมะเร็งตับอ่อนเท่านั้น แต่ยังขึ้นสูงผิดปกติในมะเร็งชนิดอื่นได้อีก เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer), มะเร็งของระบบทางเดินน้ำดี (cholangiocarcinoma), มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) และยังสูงขึ้นในภาวะที่ไม่ใช่มะเร็งได้ด้วย เช่น ตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis), ตับอักเสบ (hepatitis), cholestasis, โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) เป็นต้น



แผนภูมิที่ 9 แสดงการกีดเบียดของมะเร็งตับอ่อน

จากภาพ A มะเร็งตับอ่อนที่สามารถผ่าตัดได้ จากลูกศร จะเห็นว่าไม่มีการกีดเบียดของเส้นเลือด superior mesenteric artery (SMA) ลูกศรสีขาว

B. มะเร็งตับอ่อนที่อาจจะสามารถผ่าตัดได้ (borderline resectable) เนื่องจากก้อนมะเร็งล้อมรอบเส้นเลือด SMA แต่ยังไม่พบการกีดเบียดที่ชัดเจน

C. มะเร็งตับอ่อนที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ locally advanced pancreatic cancer จะเห็นได้ว่ามี การกีดเบียดของเส้นเลือด SMA อย่างชัดเจน [43]

การรักษา

การรักษาหลักของมะเร็งตับอ่อนคือการผ่าตัดในกรณีที่สามารถผ่าตัดได้ การวางแผนการรักษาสามารถแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกระยะที่ผ่าตัดก่อนมะเร็งได้ (resectable disease) กลุ่มที่สองระยะเป็นมากเฉพาะที่ (locally advanced disease) และกลุ่มที่สามระยะมะเร็งแพร่กระจาย (metastatic disease) เกณฑ์ในการวินิจฉัยมะเร็ง ระยะผ่าตัดได้คือ 1. ไม่มีการแพร่กระจายของมะเร็ง 2. ก้อนมะเร็งไม่โอบรอบเส้นเลือดแดง celiac หรือ superior mesenteric 3. ก้อนมะเร็งไม่โอบรอบเส้นเลือดดำ superior mesenteric และ portal (แผนภูมิที่ 9) ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ถ้าไม่มีข้อห้ามดังที่กล่าวมาแล้ว จะมีโอกาสผ่าตัดออกให้หายขาดได้ แต่น่าเสียดายว่าพบผู้ป่วยที่มีก้อนขนาดเล็กเพียงไม่ถึงร้อยละ 15 และแม้ในผู้ป่วยที่ผ่าตัดได้ก็มี มาตรฐานการรอดชีวิต (Median survival) เพียง 13-18 เดือน (Median survival 19.9 months for N0 and 15 months for N1) และมี 5-year survival rate เพียงร้อยละ 17 (10-24%) เท่านั้น [44]

วิธีผ่าตัดที่นิยมทำคือ Kausch-Whipple's procedure with or without pylorus preservation (หมายถึงการทำ pancreaticoduodenectomy ตัดเอาส่วนของ head and body of pancreas รวมทั้ง duodenum ออก แล้วนำตับอ่อนส่วนที่เหลือมาต่อกับ jejunum-pancreatojejunostomy)

การพยากรณ์โรค ขึ้นอยู่กับ ขนาดของก้อนมะเร็ง การลุกลามของมะเร็งไปที่ ต่อม น้ำเหลือง [45-47] การลุกลามไปยังปลายประสาท การผ่าตัดเพื่อให้ได้ขอบเขตที่เพียงพอ การสูญเสียเลือด ระหว่างผ่าตัด และผลทางพยาธิวิทยามีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย [44] ตามตารางที่ 7

ปัจจัย	จำนวนผู้ป่วย	อัตราการรอดชีวิต		มัธยฐาน เวลาการรอดชีวิต (เดือน)	P-value
		1 ปี	5 ปี		
Margin					
Negative	423	69	21	19	< 0.0001
Positive	184	49	6	12	
ต่อมน้ำเหลือง					
Negative	166	68	22	20	< 0.006
Positive	441	61	14	16	
ขนาดของก้อนมะเร็ง					
< 3 ซม.	268	72	22	21	< 0.0001
≥ 3 ซม.	325	56	12	14	
Poorly differentiation					
No	380	67	18	19	0.0003
Yes	216	56	13	14	
ปริมาณเลือดที่สูญเสีย					
< 750 มล.	294	71	20	20	0.003
≥ 750 มล.	295	55	14	14	

ตารางที่ 7 แสดงปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนหลังการทำผ่าตัด pancreaticoduodenectomy [44]

การรักษาเสริมหลังผ่าตัดด้วยเคมีบำบัด(adjuvant chemotherapy)

เนื่องจากมะเร็งตับอ่อนถึงแม้ว่าจะสามารถผ่าตัดได้แต่พบว่าเมื่ออัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคที่ค่อนข้างสูง ปัจจุบันพบว่าการรักษาเสริมด้วยเคมีบำบัด มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่า การรักษาเสริมด้วยเคมีบำบัดจึงเป็นการรักษามาตรฐานของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนที่ได้รับการผ่าตัด

จากการศึกษาของ CONKO-001 Oettle H และคณะ [48] ใช้ gemcitabine 1000 mg/m² day 1,8,15 ทุก 4 อาทิตย์จำนวน 6 รอบ เทียบกับยาหลอก (placebo)ในการรักษาเสริม (locally advanced pancreatic cancer) พบว่า การให้การรักษาเสริมสามารถเพิ่ม ระยะเวลาของการปลอดโรค (disease free survival จาก 6.9 เดือนเป็น 13.4 เดือน (P=0.001)โดยได้รับประโยชน์ทั้งในกลุ่มที่ตัดได้หมดหรือยังมีมะเร็งหลงเหลืออยู่ในระดับพยาธิ (R0,R1 resection) และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ จาก 20.2 เดือนเป็น 22.8 เดือน (P=0.005) ระยะการปลอดโรคที่ 5 ปีร้อยละ 25.16 และร้อยละ 21 ตามลำดับ [49]

การศึกษานี้ของ ESPAC [49-50] พบว่าการให้การรักษาเสริม ด้วยยา 5FU/folinic acid สามารถเพิ่ม อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี จากร้อยละ 14 เป็นร้อยละ 24 เทียบกับยาหลอก (P=0.001) จึงมีการศึกษาตามมา คือ ESPAC-3 ล่าสุดในการประชุมมะเร็งประจำปี 2009 ของอเมริกาที่ผ่านมา การรักษาเสริมเปรียบเทียบระหว่าง 5-FU/FA เปรียบเทียบกับการให้ gemcitabine ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนที่ทำการผ่าตัดได้หมดหรือยังมีมะเร็งหลงเหลืออยู่ในระดับพยาธิ (R0-R1) จำนวน 1,088 เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต (FA, 20 mg/m², iv bolus ร่วมกับ 5-FU, 425 mg/m², 1-5 วัน ทุก 28 วัน) หรือ gemcitabine (1,000mg/m² iv infusion 1d, 8d and 15d ทุก 4 อาทิตย์เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า กลุ่มที่ได้ 5FU/FA มีมัธยฐานการรอดชีวิต (median survival) 23.0 เดือน (95% CI: 21.1, 25.0) เทียบกับ gemcitabine 23.6 เดือน (95%CI: 21.4, 26.4) โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของการรอดชีวิต (p=0.39, HR_{GEM}=0.94 (95%CI: 0.81, 1.08)) [51]

สำหรับการรักษาเสริมด้วยการฉายแสงเพื่อหวังการกลับมาเป็นซ้ำยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรร่วมกับการศึกษาที่ผ่านมาของการฉายแสงมีจุดบกพร่องหลายจุด ทำให้ความน่าเชื่อถือของการศึกษาลดลง [52-54]

การรักษาในกลุ่มที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ locally advanced pancreatic cancer

ในรายที่เป็นมากเกินกว่าจะผ่าตัดให้หายขาด (unresectable) ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีมัธยฐานเวลาการรอดชีวิต (median survival) โดยรวม 6-8 เดือน (ในรายที่ยังไม่มี metastatic disease มีมัธยฐานเวลาการรอดชีวิต median survival 10-14 เดือน) [55] การรักษาเพื่อบรรเทาอาการจะทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของผู้ป่วยและอาการของโรค เช่น

1. การทำ Percutaneous Transcutaneous Bile Drainage (PTBD) ทำได้เฉพาะในรายที่มีท่อทางเดินน้ำดีอุดตันและขยายตัว (Intrahepatic bile duct dilatation) มาก และมีรังสีแพทย์ที่ชำนาญทางด้านนี้
2. การใส่ stent ด้วยการส่องกล้องท่อน้ำดีและตับอ่อน (ERCP) เพื่อบรรเทาเหลืองจากการอุดตันของทางเดินน้ำดี แต่เมื่อเวลาผ่านไปนาน อาจตันได้เร็วกว่ารายที่ผ่าตัด bypass การใช้ expandable metal stent จะดีกว่า polyethylene tube
3. การผ่าตัดเพื่อประคับประคอง (bypass) ทางเดินน้ำดีเพื่อบรรเทาอาการดีซ่าน ควรเลือกในรายที่อาการไม่หนักมาก เพราะได้ผลในแง่บรรเทาอาการนานกว่า
4. การให้รังสีรักษา มักใช้เพื่อบรรเทาอาการปวด ในขนาด 5,000 – 6,000 cGy ใน 5-6 สัปดาห์
5. การให้ยาเคมีบำบัด (เหมือนกับระยะแพร่กระจาย)
6. การรักษาด้วยเคมีบำบัดร่วมกับการฉายแสง

การศึกษาของ GITSG [56] ทำการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบในผู้ป่วย 194 ราย โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกฉายรังสีอย่างเดียว 60 Gy กลุ่มที่สองฉายรังสี 40 Gy พร้อมกับยาเคมี 5FU และกลุ่มที่สามฉายรังสี 60 Gy พร้อมกับยาเคมี 5FU โดยการฉายรังสี ใช้เทคนิคการฉายรังสีแบบ split course (พัก 2 สัปดาห์ ทุก 20 Gy; 2 Gy ต่อครั้งใน 10 ครั้ง) พบว่า กลุ่มที่ฉายรังสีอย่างเดียวมีมัธยฐานเวลาการรอดชีวิต 5.5 เดือน ในขณะที่กลุ่มที่ 2 และ 3 เท่ากับ 8.3 และ 11.3 เดือนตามลำดับ จากการศึกษาทำให้การให้รังสีเคมีบำบัดเป็นการรักษามาตรฐานในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนระยะที่ผ่าตัดไม่ได้

ในทางตรงกันข้าม Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) [57] ทำการศึกษาเปรียบเทียบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนที่ผ่าตัดไม่ได้ 91 ราย ระหว่างการให้ รังสีเคมีบำบัด (ปริมาณรังสี 40 Gy พร้อมกับ 5FU) 600 มก/ตร.ม/วัน ใน 3 วันแรกที่ฉายรังสี และให้ยาเคมี 5FU เสริมหลังฉายรังสีครบ 600 มก/ตร.ม/สัปดาห์ เปรียบเทียบกับการให้ยาเคมีบำบัด 5FU 600 มก/ตร.ม/สัปดาห์อย่างเดียว พบว่ามีมาตรฐานเวลาการอยู่รอดเท่ากันคือประมาณ 8.2 เดือน ซึ่งได้รับการพิจารณาว่าเป็นผลจากจำนวนผู้ป่วย ที่ทำการศึกษาน้อยและปริมาณรังสีที่ให้ไม่เพียงพอ

มะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจาย (Metastatic pancreatic carcinoma)

มะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจาย มักเป็นโรคที่ รุนแรง การดำเนินโรคค่อนข้างเร็ว ผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตไม่ว่าจะได้รับการรักษาอย่างไรก็ตาม การรักษาด้วยเคมีบำบัดหรือร่วมกับ targeted therapy ในผู้ป่วยที่มี Performance status 0-2 ช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและอาจเพิ่มโอกาสการรอดชีวิต

Gemcitabine เป็นเคมีบำบัดมาตรฐานในการรักษามะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจาย ตั้งแต่ปี 2539 จากการศึกษาพบว่า gemcitabine สามารถเพิ่มมาตรฐานการรอดชีวิต (median survival) เป็น 5-6 เดือน และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตที่ (1 yr survival) เป็น ร้อยละ 18-20

ตามการศึกษาของ Burris HA และคณะ [58] ที่ให้ เคมีบำบัด gemcitabine เทียบกับ bolus 5FU

Gemcitabine ให้ในขนาด 1,000 mg/m² IV ทุกอาทิตย์เป็นระยะเวลา 7 อาทิตย์ พัก 1 อาทิตย์ หลังจากนั้น 1,000 mg/m² ทุกอาทิตย์ 3 อาทิตย์ พัก 1 อาทิตย์ พบว่าในกลุ่มของ มีการตอบสนองที่ดีกว่าและการรอดชีวิตที่ดีกว่า (response rate (5.4% vs. 0%), improved median survival (5.65 vs. 4.41 months; $P = .0025$, 1-year survival rate (18% vs. 2%)) และสามารถช่วยบรรเทาอาการ(ปวด) และทำให้ performance status ดีขึ้นได้ (24-27% clinical benefit) ทำให้องค์กรอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ยอมรับเป็นยาหลักในการรักษาตั้งแต่ปี 1977 เป็นต้นมา [49]

การรักษาเคมีบำบัดอื่นร่วมกับยา gemcitabine ไม่ว่าจะเป็น oxaliplatin capecitabine cisplatin [59] พบว่าเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่มี performance status ที่ดี เนื่องจากผลข้างเคียงที่

ได้รับสูง แต่ไม่มีสูตรใดเลยที่ให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า gemcitabine เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [60-63]

สำหรับยาในกลุ่ม targeted therapy Gemcitabine Erlotinib (ซึ่งเป็น EGFR TKI) การศึกษาของ Malcolm J. Moorcec และคณะ [21] การให้ยา Gemcitabine ร่วมกับ Erlotinib ซึ่งมีฤทธิ์เป็น Tyrosine kinase inhibitor ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจาย 569 ราย เทียบกับ gemcitabine อย่างเดียว พบว่าช่วยเพิ่มมัธยฐานเวลาการอยู่รอดได้ (Median survival 6.3 vs. 5.9 months 1 YSR 24% vs. 19% HR 0.82 (95% CI, 0.69 to 0.99; P=.038, ร่วมกับมีระยะการปลอดโรคที่ขึ้นด้วย Progression-free survival (HR of 0.77 (95% CI, 0.64 to 0.92; P=0.04). แม้อัตราการตอบสนองไม่ค่อยแตกต่างกัน (RR 8.6% vs.7.9%) ในเดือน พ.ย. 48 US FDA อนุมัติให้ใช้ยานี้ในมะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจายได้ (รายละเอียดเพิ่มเติมในส่วนของวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องของบทที่ 2)

AViTA trial[64] Gemcitabine, bevacizumab(5 mg/kg ทุก 2 อาทิตย์ และ erlotinib เทียบกับ gemcitabine และ erlotinib จากผู้ป่วย 454 ราย พบว่าสามารถเพิ่มระยะการปลอดโรค (progression free survival) 3.6 เป็น 4.6 เดือน (P=0.002) แต่อัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน ผลข้างเคียงจากยาพอกๆกันในทั้ง 2 กลุ่ม

เคมีบำบัดสูตรที่ 2 (Second line systemic therapy)

จากรายงานของการรักษามะเร็งตับอ่อนหลังจากไม่ตอบสนองต่อยาชุดแรก หรือ second line treatment ของมะเร็งตับอ่อนระยะแพร่กระจาย (metastatic pancreatic carcinoma) โดยการใช้ FF regimen [49] โดยประกอบด้วยยา oxaliplatin 5FU และ folinic acid เทียบกับการให้ FF 5FU, folinic acid พบว่าผู้ป่วยได้รับการรักษาภายใน 3 สัปดาห์หลังจากเกิดโรคกำเริบ (progressive disease) จาก gemcitabine พบว่า FF regimen สามารถเพิ่มระยะเวลาที่โรคไม่ลุกลาม (progression free survival) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 13 สัปดาห์ เทียบกับ 9 สัปดาห์ p=0.012) นอกจากนี้ ยังมีมัธยฐานเวลาการอยู่รอด (median overall survival) ของผู้ป่วยที่ได้รับ FF นานเป็น 2 เท่าของ FF คือ 26 สัปดาห์ เทียบกับ 13 สัปดาห์, p=0.014)

แต่เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับอ่อนระยะลุกลามหลังจากที่อาการกำเริบจาก สูตร
มาตรฐาน (gemcitabine base)แล้วก็มีสถานะของผู้ป่วย (performance status) ที่ไม่ดีร้อยละ
20-50 ของผู้ป่วยไม่สามารถรักษาด้วยยาเคมีบำบัดต่อได้ ดังนั้น OFF จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง
สำหรับผู้ป่วยที่มีสถานะร่างกายที่แข็งแรง (performance status)พอที่จะสามารถทนผลข้างเคียง
ของการให้เคมีบำบัดได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

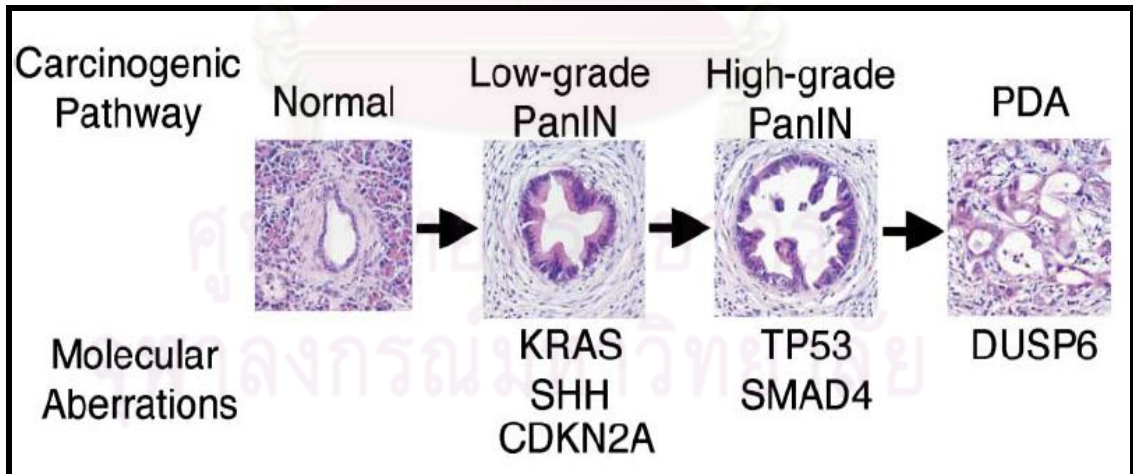
บทที่ 4

การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องมะเร็งตับอ่อน (Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis)

การเกิดมะเร็งตับอ่อน (pancreatic adenocarcinoma) มักมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของโครโมโซมบางส่วนที่ขาดหายไปเช่น 1p, 6q, 9p, 12q, 17p, 18q, 21q และบางส่วนที่เพิ่มเติมเข้ามา เช่น 8q และ 20q

การพัฒนาจากเซลล์ปกติไปสู่การเป็นมะเร็งตับอ่อนอาศัยความผิดปกติของยีนในส่วนของยีนก่อมะเร็ง ยีนต้านมะเร็ง และการซ่อมแซมความผิดปกติ และอื่น ดังจะได้อธิบายต่อไป [65] การกลายพันธุ์ของการเกิดมะเร็งตับอ่อนเป็นได้ทั้งการกลายพันธุ์ที่เกิดภายในครอบครัว (germline mutation) หรือการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในตัวของผู้ที่ผิดปกติเองหลังจากเกิดมา (somatic mutation)

ส่วนหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งตับอ่อน ได้แก่การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) ซึ่งเป็นลักษณะของการทำหน้าที่ที่เพิ่มขึ้น (gain function) ซึ่งถือว่าเป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) การกลายพันธุ์ดังกล่าวพบได้ถึงร้อยละ 70-90 [1]



แผนภูมิที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับอ่อน การที่มีการกระตุ้นการทำงานของยีนเคราสและ SHH และการหยุดยั้งการทำงานของ CDKN2A ทำให้เซลล์พัฒนาไปสู่ low grade Pancreatic intraepithelial neoplasm

การหยุดยั้งการทำงานของ TP53 SMAD4 ทำให้พัฒนาไปสู่ High grade Pancreatic intraepithelial neoplasm และท้ายสุดเมื่อมีการหยุดยั้งการทำงานของ DUSP6 ทำให้เกิดเป็นมะเร็งตับอ่อน (pancreatic ductal adenocarcinoma) [65]

มะเร็งตับอ่อนและยีนที่ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (Pancreatic cancer and Tumor suppressor gene)

ความผิดปกติของ ยีนป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน [66] ดังแสดงในตาราง ที่ 8 อาทิเช่น ความผิดปกติของยีน *p16/CDKN2A* gene (>95%)โครโมโซมที่ 9p, ยีน *TP53* โครโมโซมที่ 17p (50%–75%), และ *MADH4/DPC4* gene โครโมโซมที่ 18q (55%) *MKK4* ยีนโครโมโซมที่ 17p *STK11/LKB1* โครโมโซมที่ 19q [67-69] ซึ่งความผิดปกติของยีนดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จากกลไกหลายแบบ อาทิเช่น การขาดหายไปของโครโมโซมคู่เหมือน หรือการเติมหมู่ หมู่มะทิล (methyl) ที่ผิดปกติไป ทำให้การทำงานของยีนป้องกันการเกิดมะเร็งเสียไป (homozygous deletion intragenic mutation promotor hepermethylation)

ตารางที่ 8 แสดงอุบัติการณ์ของยีนป้องกันการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน [66]

Gene	Chromosome	% of case
<i>P16/CDKN2A</i>	9p	>95
<i>TP53</i>	17p	50–75
<i>MADH4/DPC4</i>	18q	55
<i>MKK4</i>	17p	4
<i>STK11/LKB1</i>	19q	4-6
<i>TGFβ1, TGFβ2, ALK4, ACVR2, FBXW7, EP300</i>	Various	All <5

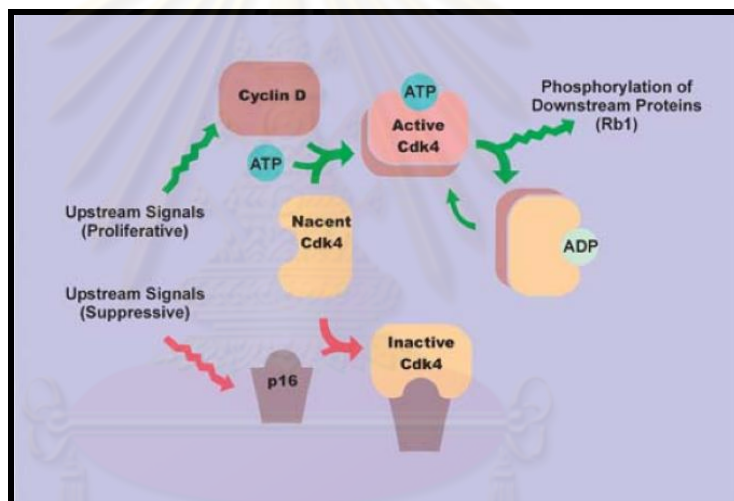
p16/CDKN2A ยีนบนโครโมโซมที่ 9p เป็นความผิดปกติของยีน (inactive) ที่ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (tumor suppresser) ยีน ที่พบได้บ่อยที่สุดร้อยละ 95 ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนทั้งหมด

ร้อยละ 40 เกิดจากการขาดหายไปของ alleles chromosomce คู่เหมือน อีกร้อยละ 40 เกิดจาก intragenic mutation ใน 1 allele ร่วมกับมีการขาดหายไป อีก 1 allele และร้อยละ 15 เกิดจาก การเติมหมู่เมทิล(hypermethylation) ของ promoter ของยีน *p16/CDKN2A*

p16/CDKN2A ที่ทำงานลดลง inactive พบได้ตั้งแต่ความผิดปกติของตับอ่อนที่ยังไม่เข้าสู่ระยะการเป็นมะเร็ง (noninvasive) (PanIN) ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่มะเร็งเมื่อมีการลุกลามมากขึ้น (invasive)

การขาดหายไปของโปรตีน p16 พบได้น้อยกว่าร้อยละ 30 ในผู้ป่วยที่เป็น low grade PanIN และพบได้มากขึ้น เป็นร้อยละ 55 ในกลุ่ม PanIN-2 และร้อยละ 70 ในกลุ่ม PanIN-3 (high grade PanIN)

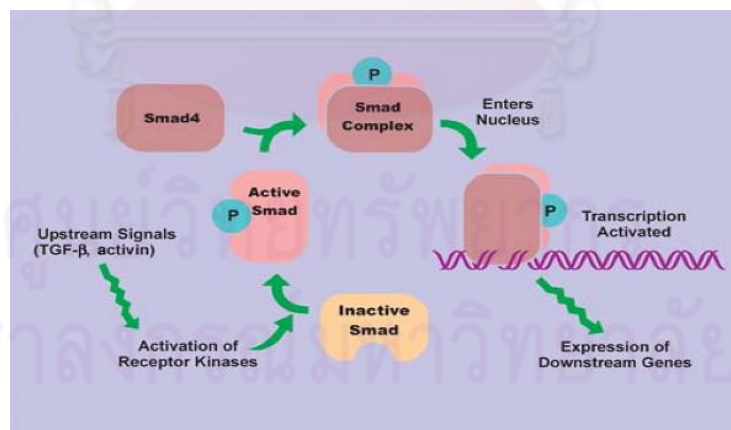
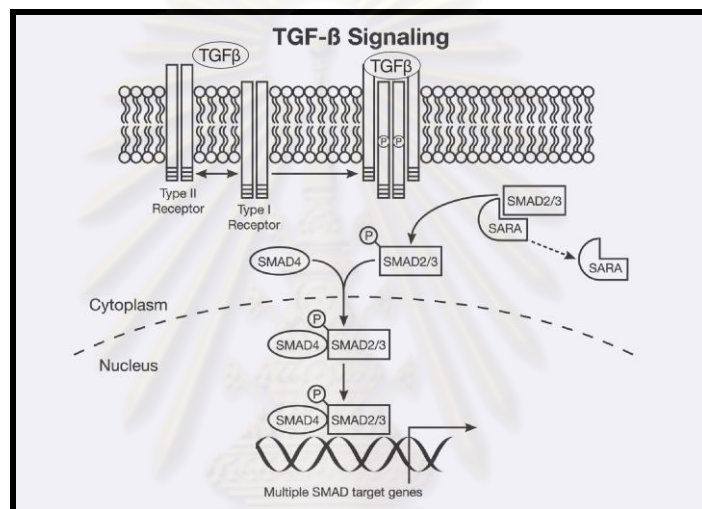
หน้าที่หลักของ โปรตีน p16 คือการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) โดยยับยั้งการทำงานในส่วนของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) การเสียการทำงานของยีน p16/CDKN2A นำไปสู่การขาดการยับยั้งการทำงานของ โปรตีน p16 ทำให้การทำงานส่วนการตรวจสอบ (checkpoint) ของวัฏจักรเซลล์เสียไปด้วย



แผนภูมิที่ 11 แสดงการทำงานของ p16/Rb1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ วัฏจักรเซลล์ ในส่วนของ Cdk 4 (cyclin dependent kinase 4) การจับกันของ p16 จะทำให้ cdk4 อยู่ในรูปของการไม่ทำงาน (inactive form) ในมะเร็งตับอ่อนที่มีการกลายพันธุ์ดังกล่าวทำให้ p16 ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของวัฏจักรเซลล์ทำงานมากกว่าปกตินำไปสู่ขั้นตอนการก่อมะเร็ง [43]

ยีนที่พี 53 (TP 53) เป็นยีนป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง (tumor suppressor gene) พบในโครโมโซม (chromosome) ที่ 17p ในมะเร็งตับอ่อนพบว่ามีการทำงานที่ผิดปกติไปพบได้ร้อยละ 50-70 การผิดปกติของ P53 ยีนพบในการพัฒนาเข้าสู่มะเร็งตับอ่อนในระยะท้าย ดังแผนภูมิที่ 10 มักพบ P53 ในช่วงของ PanIN-3 (high grade) และในระยะที่เป็นมะเร็ง ลุกลาม (infiltrative adenocarcinoma) โดยปกติ P53 โปรตีนทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และการควบคุมการตายของเซลล์ (cell death)[70-72]

MADH4/DPC4 ยีน เป็นยีนป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18q พบว่ามี การทำงานที่ผิดปกติได้ร้อยละ 55 ของมะเร็งตับอ่อน การเสียการทำงานของ MADH4/DPC4 สัมพันธ์กับการเกิดเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรง (neoplasm) MADH4/DPC4 เกี่ยวข้องกับการทำงานของ กระบวนการ สร้างสายดีเอ็นเอทรานสคริปชัน (transcription DNA) โดยผ่านทาง TGF β (transforming growth factor like beta) และ ligand อื่นๆ ดังรูป การทำงานที่ผิดปกติทำให้ โปรตีนไม่สามารถส่งสัญญาณยับยั้งในกระบวนการสร้างสายดีเอ็นเอได้และ การแสดงออกของยีน เปลี่ยนแปลงไป[69, 73-74]



แผนภูมิที่ 12 และ 13 บนและล่าง แสดงการทำงานของ TGF- β pathway SMAD4=homologue of Mother against Decapentaplegic, MADH4, (MADH4); SARA=SMAD anchor for receptor activation.[66]., [43]

ยีนก่อมะเร็ง (Oncogene)

Oncogene คือยีนซึ่งมีความผิดปกติเกิดขึ้น (abnormal expression or altered gene product) จะทำให้เกิดการนำไปสู่การเป็นมะเร็ง (malignant phenotype) Cellular oncogenes เปลี่ยนแปลงมาจากยีนของเซลล์ปกติที่เรียกว่า protooncogenes เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมเรียกว่าการกระตุ้นการทำงานของยีนก่อมะเร็ง (oncogene activation) จะทำให้ยีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (neoplastic transformation)

ความผิดปกติของ oncogenes ที่พบได้ในมะเร็งตับอ่อน แสดงดังตารางที่ 9

การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) พบได้มากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นกับแต่ละการศึกษา BRAF พบประมาณ ร้อยละ 5 และ AKT2 ร้อยละ 10-20 [75-76]

เคราส ยีน (K-ras) ในภาวะปกติ เคราสจะอยู่ในรูปของ protooncogene ซึ่งไม่ทำงาน (inactive form) แต่หากในกรณีที่ มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น จะทำให้เคราส ยีน (K-ras) อยู่ในรูปที่ทำงานหรือ active form หรือที่เรียกกันว่า oncogene [1]

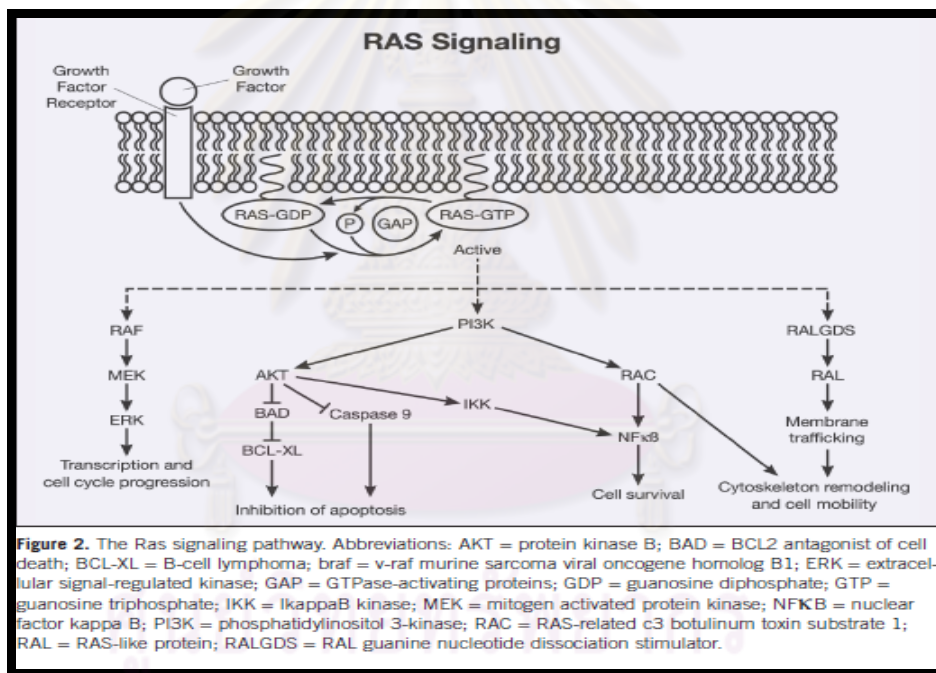
ตารางที่ 9 แสดงอุบัติการณ์ยีนก่อมะเร็งและการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน [66]

Oncogenes activated in pancreatic cancer.

Gene	Chromosome	% of cases
<i>K-RAS2</i>	12p	>90
<i>BRAF</i>	6q	20q
<i>MYB</i>	19q	10–20
<i>AKT2</i>	7p	5
<i>AIB1</i>	20q	60

ตารางที่ 10 แสดงอุบัติการณ์ของความผิดปกติในการซ่อมแซมยีนและการเกิดโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน [66]

DNA repair genes inactivated in pancreatic cancer		
Gene	Chromosome	% of cases
MLH1	3p	3-15
BRCA2	13q	7
FANC-C	9q	<5
FANC-G	9p	<5



แผนภูมิที่ 14 แสดงการทำงานในส่วนของยีนเคราสและ EGFR receptor ที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนของเซลล์ [66]

K-ras มักเกิดในตำแหน่ง point mutation ที่ตำแหน่งโคดอน (Codon) ที่ 12 ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ ความผิดปกติของตับอ่อนในระยะเริ่มต้นที่ไม่มีการลุกลาม low grade PanIN-1 pancreatic intraepithelial neoplasia [77-78]

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (ras oncoprotein) ทำให้เกิดการเจริญเติบโต และการเกิดมะเร็งในที่สุด ดัง แผนภูมิที่ 14 การส่งสัญญาณเข้าเซลล์ผ่าน receptor tyrosine kinase (growth

factor receptor) ที่ผิวเซลล์ เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อมีการจับกันระหว่าง growth factor และ receptor tyrosine kinase จะเกิด auto phosphorylation ของส่วนปลายของ receptor ที่อยู่ในเซลล์ ทำให้จับกับอณูต่างๆภายในเซลล์ เช่นจับกับ PI3 kinase phosphatidylinositol 3-kinase และ phospholipase C gamma และโปรตีน grb2 grb2 จะจับกับ guanine nucleotide exchange factor SOS ผ่านทาง SH3 domain และจะเปลี่ยน ras oncoprotein ที่ผิวของเซลล์จาก inactive GDP bound เป็น active GTP bound from ras จะจับและกระตุ้น serine/threonine kinase raf oncoprotein หลังจากนั้น raf จะ phosphorylate เอ็นไซม์ kinase เรียกว่า MEK ซึ่งเอ็นไซม์นี้จะ phosphorylate MAP kinase ที่ตำแหน่ง serine และ threonine MAP kinase จะ phosphorylation โปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณของเซลล์ เช่น protein kinase rsk phospholipase A2 และ transcription factor เช่น p62TCF myc jun oncoprotein ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของยีน นอกจาก นี้ยังมี oncogenes อื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น src oncoprotein จับกับ grb2 heptahelical G-protein-linked receptor กระตุ้น MEK ผ่านทาง raf homologue MEKK และ mos oncoprotein กระตุ้น MEK เข้าสู่การเพิ่มจำนวนและการเติบโตของเซลล์ต่อไป

ปกติ *ras* oncoprotein จะอยู่ที่ผิวเซลล์ (cell membrane) โดยจะจับกับ guanosine triphosphate และทำหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ เมื่อมี point mutation เกิดขึ้นทำให้ oncoprotein ทำหน้าที่ผิดไป แผนภูมิที่ 14

BRAF ยีนซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7q พบได้ประมาณร้อยละ 5 ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนทั้งหมด โดย BRAF มักพบในผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเครา ๘ (wild type K-ras) [79] AKT ยีน อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 19q พบได้ประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน [78] ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ศูนย์วิทยาศาสตร์การ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอ่อนในกลุ่มโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม [66]

Familial pancreatic cancer.			
Individual/germline gene alteration	Relative risk of developing pancreatic cancer	Risk of pancreatic cancer by age 70	Other cancer types
No history	1	0.5%	-
<i>BRCA2</i> (Breast-ovarian)	3.5-10	5	Breast,ovary,prostate
<i>P16</i> (FAMMM)	20-34	10-17	melanoma
Three or more first-degree relatives with pancreatic cancer	14-32	8-16	unknown
<i>PRSS1</i> (Pancreatitis)	50-80	25-40	Gastrointestinal, (Peutz-Jeghers) gastroesophageal, small bowel, colorectal, breast
<i>STK11/LKB1</i> (Peutz-Jeghers)	130	30-60	

FAMMM = familial atypical multiple mole melanoma syndrome.

ความผิดปกติของกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair gene)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมความผิดปกติของดีเอ็นเอ ซึ่งได้แก่ *BRCA2*, *FANNC-C* *FANC-G* และ *MLH1* [80-85] ดังตารางที่ 10 ในมะเร็งตับอ่อนพบความผิดปกติของยีนดังกล่าวได้น้อยโดยประมาณ ร้อยละ 5 เท่านั้นแต่อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติดังกล่าวมีความสำคัญเนื่องจากความผิดปกติสามารถส่งผล

ต่อความผิดปกติในทางพันธุกรรม (familial pancreatic cancer) นอกจากนั้นความผิดปกติในส่วน MLH ยังคงทำให้เกิดภาวะ microsatellite instability (MSI) ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดของเซลล์มะเร็งตับอ่อนบางชนิดอีกด้วย [82]

ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางพันธุกรรมของมะเร็งตับอ่อน

(Gene responsible for familial pancreatic cancer)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคทางพันธุกรรมของมะเร็งตับอ่อน ดังตารางที่ 11 เช่น BRCA2 (เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่) p16/CDK2A มีความสัมพันธ์กับการเกิดเมลานิวมา (FAMMM familial atypical multiple mole melanoma syndrome) LKB1 ยีนซึ่งมีความสัมพันธ์กับ Peutz-jeghers syndrome ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน BRCA2 [86-87] นอกจากจะมีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นมะเร็งรังไข่และมะเร็งเต้านมยังมีความเสี่ยงสูงที่จะเป็นมะเร็งตับอ่อนเพิ่มขึ้น 10 เท่าจากประชากรโดยทั่วไป BRCA2 พบได้บ่อยในเชื้อชาติยิว การทราบถึงความผิดปกติในส่วนดังกล่าว อาจพัฒนาไปสู่การพัฒนายาเพื่อรักษามะเร็งตับอ่อนได้ดีขึ้น อาทิเช่นยาในกลุ่ม PARB1 inhibitor poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor[88] FAMMM โรคทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการมีไฟที่ผิดปกติ และจำนวนมาก ก่อให้เกิดมะเร็งชนิดเมลานิวมา พบว่าการมีความผิดปกติของยีนดังกล่าวทำให้มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอ่อนสูงขึ้น 20-34 เท่า ดังนั้นผู้ป่วยที่มีเมลานิวมาและมะเร็งตับอ่อนควรได้รับการตรวจความผิดปกติของยีนดังกล่าว[89-91]

PRSS1 (cationic trypsinogen gene) ยีน ผู้ที่มีความผิดปกติในยีนนี้ มักมีอาการตับอ่อนอักเสบรุนแรงตั้งแต่อายุยังน้อย และมีความเสี่ยงของการเกิด 50 ถึง 80 เท่าในผู้ป่วยที่ตรวจพบบางรายจึงจำเป็นต้องผ่าตัดตับอ่อนเพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งและการเกิดตับอักเสบที่รุนแรงในผู้ป่วยกลุ่มนี้ [92-93]

Peutz-Jeghers syndrome มักมีรอยโรคซีแมลงวัน (lentiginos, melanocytic macule) ที่ริมฝีปาก เยื่อช่องปาก ร่วมกับมีอาการทางระบบทางเดินอาหารคือมีก้อนเนื้อ (hamatoma) ส่วนของลำไส้เล็ก hamartomatous polyp มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งหลายชนิดรวมถึง ความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอ่อนสูงถึง 130 เท่า [94]

Precursor pancreatic neoplasm

เนื่องจากความผิดปกติในระดับยีน สามารถนำไปสู่การเกิดมะเร็ง ปัจจุบันการเข้าใจในระดับการเปลี่ยนแปลงของยีนและโมเลกุลอาจนำไปสู่การวินิจฉัยได้เร็วขึ้นเนื่องจากเป็นที่ทราบกันดี มะเร็งตับอ่อนยังเป็นโรคที่การพยากรณ์โรคไม่ดี การตรวจพบถึงการมีการกลายพันธุ์ของยีนขณะที่ยังเป็นมะเร็ง PanIN (noninvasive) [95] อาจช่วยให้ทำการวินิจฉัยผู้ป่วยเหล่านี้ได้เร็วขึ้น

บทที่ 5

ไพโรซีควนซิ่ง เทคโนโลยี (pyrosequencing technology) และการตรวจการกลายพันธุ์ของเคราสยีน

การตรวจด้วยวิธีไพโรซีควนซิ่ง

การตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีนที่น่าสนใจหรือการตรวจสอบความผิดปกติของยีน เช่น การเปลี่ยนแปลงของยีน (mutation) นิยมตรวจสอบโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ซึ่งปกติใช้วิธีดั้งเดิม (conventional method) โดยมีชื่อเรียกตามหลักการว่า dideoxy chain termination method ซึ่งคิดค้นและนำเสนอโดย Sanger [96] โดยมีข้อจำกัดคือ ความเร็วและผลการวิเคราะห์ที่ต่ำ ราคาของการศึกษาเพื่อตรวจวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างค่อนข้างสูง

ปัจจุบัน หลักการของวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ จึงมีการคิดค้นและพัฒนาวิธีหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ 3 วิธีได้แก่ วิธีที่ 1 โดยใช้หลักการหาลำดับเบส (hybridization) [97] วิธีที่ 2 คือการหาลำดับเบสโดยใช้หลักการของ ligation และ cleavage [98] และวิธีที่ 3 คือการหาลำดับเบสโดยวิธีการไพโรซีควนซิ่ง (pyrosequencing) [99-100]

Pyrosequencing technology เป็นอีกเทคโนโลยีที่ใช้สำหรับตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยมีประโยชน์หลักอยู่ 2 ประการคล้ายกับการตรวจแบบดั้งเดิม คือเป็นเทคนิคเพื่อตรวจสอบหรือยืนยันลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ตรวจพบ (confirm sequencing) หรือใช้เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่ไม่เคยรู้จักมาก่อน (de novo sequencing) อย่างไรก็ตามข้อดีของไพโรซีควนซิ่ง (pyrosequencing) ที่แตกต่างกับวิธีดั้งเดิมคือ ใช้เวลาในทดสอบพอกัน pyrosequencing เหมาะสำหรับการตรวจหาลำดับเบสของยีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 100 bp และเหมาะสำหรับการตรวจหา genotyping หรือใช้ตรวจซ้ำหายีนที่ผิดปกติซึ่งได้จากวิธีดั้งเดิม

หลักการในการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของไพโรซีควนซิ่ง (pyrosequencing) [101]

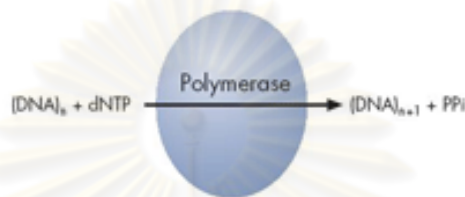
ไพโรซีควนซิง (pyrosequencing) มีชื่อเรียกตาม pyrophosphate PPi ซึ่งถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเติมเบส dNTP คู่สม complementary กับดีเอ็นเอต้นแบบ template เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจำนวนของ PPi ที่ถูกปล่อยออกมาจะสัมพันธ์หรือมีปริมาณเท่ากับจำนวนเบสคู่สมที่ถูกเติมโดยเอนไซม์ DNA polymerase ดังนั้นจำนวน PPi จึงสามารถบ่งบอกถึงประมาณของ dNTP ที่เติมเข้าไปในระหว่างการสังเคราะห์และการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase จากนั้น PPi ที่ปล่อยออกมาจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ให้พลังงานคือ ATP โดยเอนไซม์ ATP sulfurylase ซึ่ง ATP ที่เกิดขึ้นนี้จะไปเปลี่ยน luciferin ให้กลายเป็น oxyluciferin ที่สามารถเปล่งแสงได้โดยใช้เอนไซม์ luciferase นอกจากนี้ในปฏิกิริยาต้องอาศัยเอนไซม์ apyrase ในการทำลาย dNTP และ ATP ที่เกินมาเพื่อไม่ให้ไปรบกวนต่อปฏิกิริยา หรือผลของการวิเคราะห์ในการเติมเบสของ DNA polymerase ของเบสคู่สมตัวต่อไป ดังนั้นในปฏิกิริยาการหาลำดับเบสโดยวิธี pyrosequencing จึงประกอบด้วย

1. สารตั้งต้นที่เป็นต้นแบบ คือดีเอ็นเอสายเดี่ยว (singlestrand DNA)
2. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ primer
3. เอนไซม์ DNA polymerase
4. เอนไซม์ ATP sulfurylase
5. เอนไซม์ luciferase
6. เอนไซม์ apyrase
7. เอนไซม์ Substrates adenosine 5 phosphosulfate (APS) และ luciferase

ขั้นตอนของ pyrosequencing technology

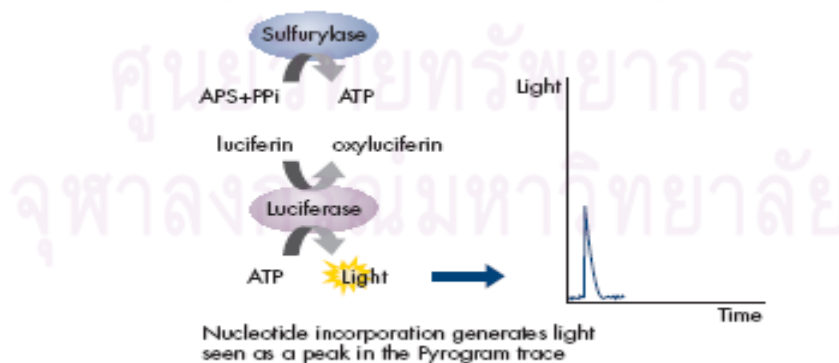
ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนการเติมนิวคลีโอไทด์เบส (dNTP) หรือในที่นี้ขอแทนที่ด้วยเบส โดยเบส 1 ใน ตัวถูกเติมลงในปฏิกิริยา ถ้าเบสตัวที่เติมนั้นเป็นเบสคู่สม complementary base กับดีเอ็นเอตั้งต้น เช่นเบสที่ตั้งต้นเป็น T ถ้ามีการเติมเบส A ลงในปฏิกิริยาการสร้างเส้นดีเอ็นเอ แต่ถ้ามี

การเติมเบสตัวอื่นเช่น เบส G ลงในปฏิกิริยาของการสร้างเบส G แต่ไม่ใช่เบสคู่สมจึงไม่มีการต่อเบส G จึงถูกทำลายโดยเอนไซม์ apyrase ขณะเดียวกันเมื่อมีการเติมเบส A ที่เป็นเบสคู่สมลงในปฏิกิริยาเบส A ที่เป็นเบสคู่สมลงในปฏิกิริยา ก็ปล่อย PPI ออกมา ในปริมาณที่เท่ากับเบส A ที่เติมลงไปในปฏิกิริยาดังแผนภูมิที่ 15



แผนภูมิที่ 15 แสดงหลักการในการเติมเบสและปล่อย pyrophosphate (PPI) ออกมาในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase [102]

ขั้นที่ 2 ขั้นตอนการเปลี่ยน PPI เป็น ATP โดยเอนไซม์ ATP sulfurylase ซึ่งอาศัย adenosine 5 phosphosulfate (APS) เป็นสารตั้งต้น substrate ต่อมาเอนไซม์ luciferase จะเปลี่ยน luciferin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นอีกชนิดหนึ่งที่เติมลงไปในปฏิกิริยาให้กลายเป็น oxyluciferin โดยอาศัย ATP เป็นสารให้พลังงาน โดย oxyluciferin สามารถเปล่งออกมาเป็น pyrogram ดังแผนภูมิที่ 16



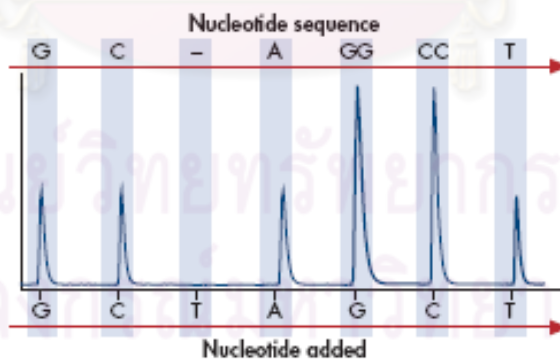
แผนภูมิที่ 16 แสดง pyrogram ที่ได้จากปฏิกิริยาการเติมเบสของเอนไซม์ DNA polymerase[102]

ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นตอนการทำลาย dNTP และ ATP ที่เกินมา ซึ่งไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ หรือมีการเติมเบสที่ไม่ใช่เบสคู่สมในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase โดยเอนไซม์ apyrase เมื่อมีการทำลายสมบูรณ์แล้วกระบวนการเติม dNTP ตัวใหม่ก็เริ่มขึ้น (แผนภูมิที่ 17)



แผนภูมิที่ 17 แสดงการทำลาย dNTP และ ATP ที่ไม่ถูกใช้หรือไม่ใช่เบสคู่สมในระหว่างการเติมเบสของเอนไซม์ DNA polymerase [102]

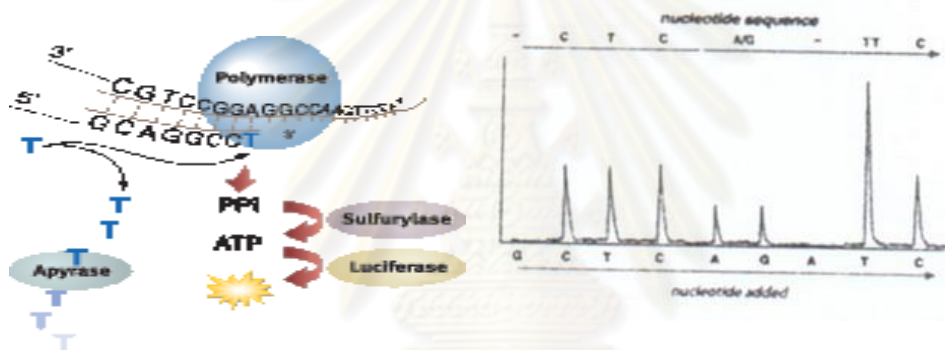
ขั้นตอนที่ 4 เป็นขั้นตอนเติมเบส (dNTP) ตัวใหม่เมื่อเบสที่เติมใหม่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ก็จะมีการสร้างดีเอ็นเอต้นแบบ ก็จะมีการสร้างเส้นดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ DNA polymerase ต่อไป ดังนั้นจะปรากฏเป็น pyrogram แผนภูมิที่ 18



แผนภูมิที่ 18 แสดง pyrogram ที่ของการเติมเบสโดยเอนไซม์ DNA polymerase[102]

แผนภูมิที่ 18 สามารถอธิบายดังนี้คือ นิวคลีโอไทด์ที่ถูกเติม (nucleotide add) ตัวแรกคือ G ตามด้วย C T A G C T ตามลำดับ ส่วนการอ่านผลลำดับเบส (nucleotide sequence) สามารถอ่านโดยเรียงลำดับดังนี้ G C T A GG CC และ T ตามลำดับ จากการสังเกตความสูง

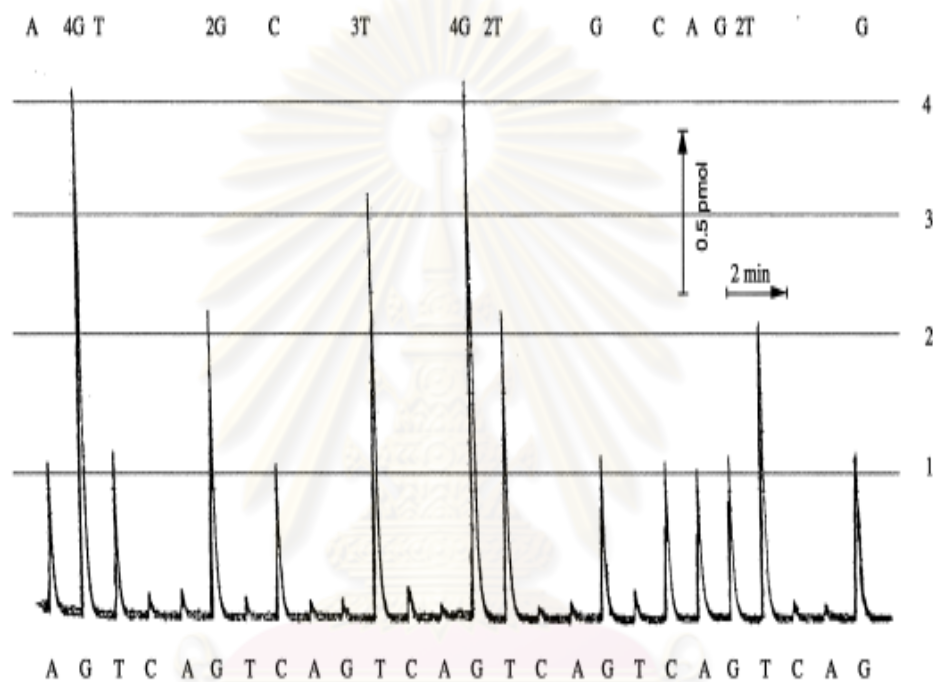
ของ pyrogram มี 2 ระดับปกติ และระดับสูงกว่าปกติ ระดับปกติคือมีการปล่อย PPI โมเลกุล ซึ่งเกิดจากการเติมเบสคู่สม 1 เบส ส่วน pyrogram ที่สูงกว่าปกติคือผลที่เกิดจากการได้ PPI 2 โมเลกุล ซึ่งเกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกัน 2 เบส ซึ่งสาเหตุเป็นเพราะว่าในลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบมีเบสที่เหมือนกันติดกัน 2 เบส ดังนั้นจึงปรากฏเป็น pyrogram ที่สูงกว่าปกติ เช่นตามภาพเมื่อเติมเบส G แต่ผลของ pyrogram ได้ peak สูงกว่าปกติ ดังนั้นจึงอ่านเป็น GG เป็นต้น ดังนั้นแผนภูมิที่ 18 จึงสามารถอ่านลำดับเบส ได้ดังนี้ 5'-GCAGGCCT-3' ดังนั้นจึงสามารถสรุปกระบวนการของ pyrosequencing ตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงการวิเคราะห์ผลดังภาพข้างล่าง แผนภูมิที่ 19



แผนภูมิที่ 19 แสดงกระบวนการของ pyrosequencing ตั้งแต่แรกเริ่มจนถึงการวิเคราะห์ผล [102]

แผนภูมิที่ 19 แสดงกระบวนการของเทคโนโลยีหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing ทั้งหมดตั้งแต่เริ่มแรกจนถึงผลการวิเคราะห์ ซึ่งเบส C ถูกเติม DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ โดยขณะเมื่อเติมเบส C มาในปฏิกิริยาจะมีการปล่อย PPI ออกมาและ PPI จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานแสงซึ่งสามารถแปลงผลเป็น pyrogram ดังภาพดังนั้นจึงสามารถอ่านลำดับเบส nucleotide sequence ได้ดังนี้คือ 5'-CTC (A-G) TTC-3' จากผลการหาลำดับเบสแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส หรือ polymorphism เกิดขึ้น 1 ตำแหน่งจากการสังเกตระดับความสูงของ pyrogram ดังภาพ พบว่ามี 3 ระดับคือ ระดับปกติ ระดับต่ำกว่าปกติและสูงกว่าปกติระดับต่ำกว่าปกติ บ่งบอกว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจากเบสปกติ mutation หรือ polymorphism เช่นตามภาพเมื่อนิวคลีโอไทด์ที่เติมคือ A และ G พบว่าได้ระดับ peak ที่ต่ำกว่าปกติ แสดงให้เห็นว่า PPI ที่ถูกปล่อยออกมาเกิดจากการเติมทั้งเบส A และ G อย่างละครั้ง โดยเติม

เบส A ก่อนแล้วค่อยเติมเบส G เวลาอ่านผลจึงอ่าน A/G ส่วนเมื่อเติมเบส T พบว่า peak สูงกว่าปกติ แสดงว่าต้องมี PPi ที่ปล่อยออกมาปริมาณ 2 เท่าของปกติ เวลาอ่านผลลำดับเบสจึงอ่าน TT

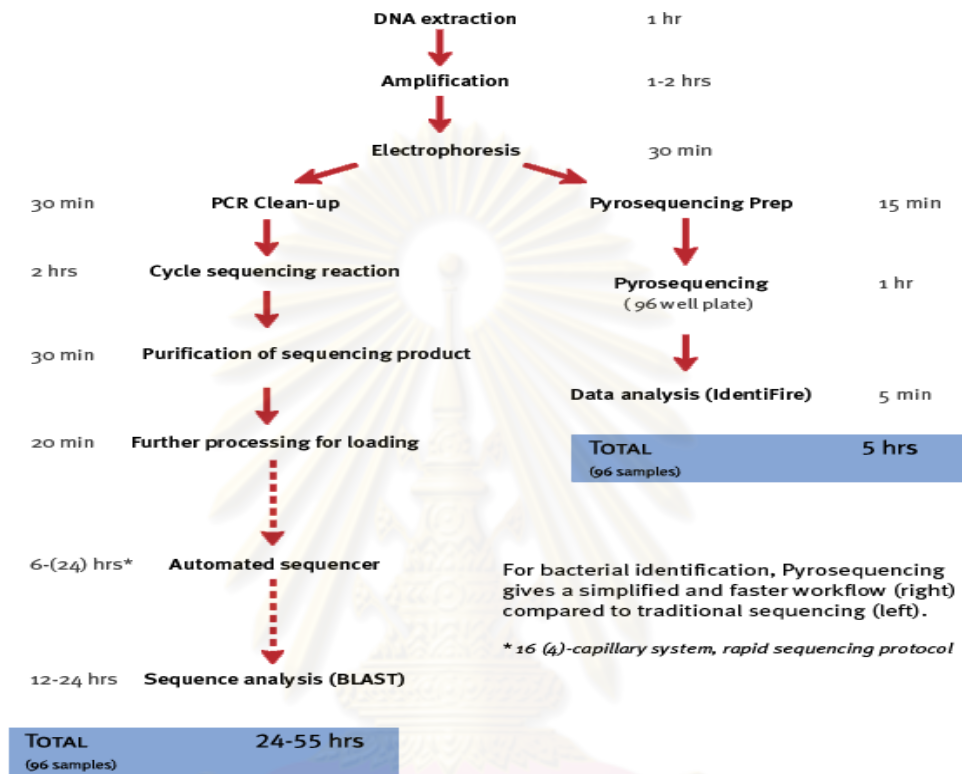


แผนภูมิที่ 20 แสดง pyrogram ที่ได้จากการทำ pyrosequencing [101]

แผนภูมิที่ 20 แสดง pyrogram ซึ่งความสูงของ pyrogram แสดงจำนวนเบสที่ถูกเติมในระหว่างที่มีการสร้างดีเอ็นเอ หรือแสดงประมาณ PPi ที่ถูกปล่อยมาในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจากรูปที่ 6 มี PPi เกิดขึ้นหลังจากการเติมเบสคู่สมได้ 4 แบบ ทำให้เกิด pyrogram ที่มีความสูงอยู่ 4 ระดับคือ 1PPi ที่เกิดจากการเติมเบสคู่สม 1 เบส 2PPi เกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกันติดต่อกัน 2 เบส 3 PPi เกิดจากการเติมเบสคู่สมชนิดเดียวกันติดต่อกัน 3 เบส และ 4 PPi เกิดจากการเติมเบสชนิดเดียวกัน 4 เบส ดังรูปที่ 6 สามารถอ่านลำดับเบสที่ได้ผลจากการทำ pyrosequencing ได้ดังนี้

5'AGGGGTGGCTTTGGGGTTGCAGTTG-3' หลังจากมีการเติมเบสดังนี้

AGTCAGTCAGTCAGTCAGT CAGTCAG

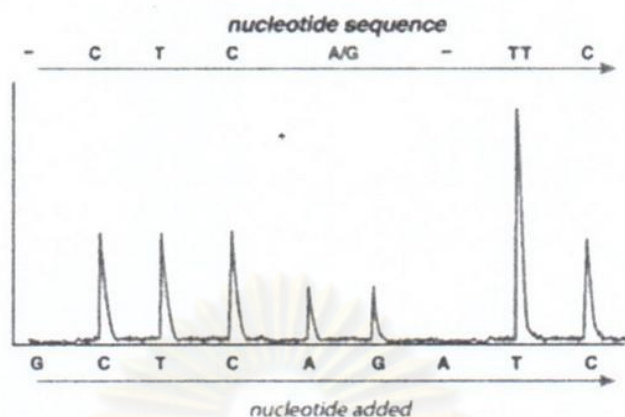


แผนภูมิที่ 21 แสดงเวลาของการหาลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างวิธี conventional method ซ้าย และ pyrosequencing ขวา [102]

การประยุกต์วิธี pyrosequencing และสำหรับงานการตรวจหาการกลายพันธุ์ของโคราสนีน

ปัจจุบันเทคโนโลยีในการหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing มีการพัฒนามาเป็นระบบเครื่องมืออัตโนมัติ automate system เช่น PSQ 96 system ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว (high throughput) เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม

การประยุกต์เพื่อหาจีโนไทป์ของ SNP (genotype of single nucleotide polymorphism) หรือการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส mutation



แผนภูมิที่ 22 แสดงวิธี pyrosequencing ที่สามารถตรวจหา SNP หรือ mutation [101]

แผนภูมิที่ 22 แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจหา single nucleotide polymorphism หรือ SNP จากภาพจะเห็นว่าผลของ pyrogram สามารถแสดงลำดับเบสได้ 2 แบบ คือ แบบแรก 5'CTCATTC-3' แบบที่ 2 คือ 5'CTCGTTC-3' แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส mutation หรือ polymorphism เกิดในตำแหน่ง A/G ซึ่งระหว่าง mutation หรือ polymorphism ต่างกันที่ mutation ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน และให้การหน้าที่ของยีนนั้นเปลี่ยน ส่วน polymorphism ไม่ทำให้กรดอะมิโนและหน้าที่ของดีเอ็นเอเปลี่ยนไป ดังนั้นจะเห็นว่า pyrosequencing สามารถตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP)

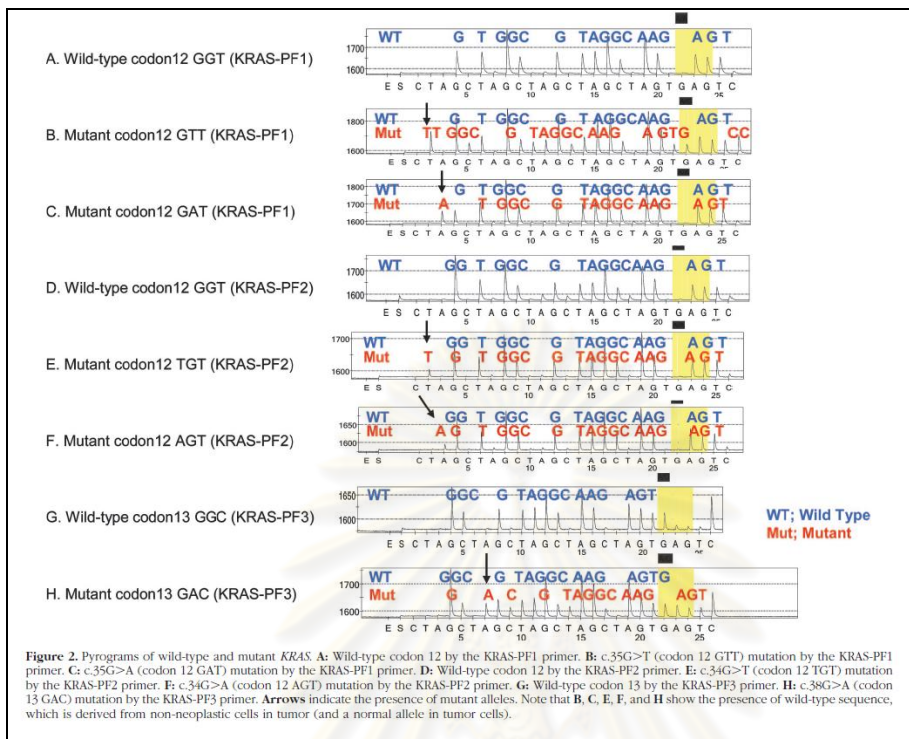
ข้อเสียและข้อจำกัดของ pyrosequencing technology

เนื่องจาก เทคโนโลยี pyrosequencing เป็นเทคโนโลยีใหม่ และมีหลักการซับซ้อน ดังนั้นอาจทำให้ผู้ที่ศึกษาอยากต่อการทำความเข้าใจ และเครื่องมือที่ตรวจวิเคราะห์ ด้วยหลักการนี้มีราคาแพง มีการใช้ เทคโนโลยีในการแปลผลหลายอย่างที่มีความซับซ้อนในการแปลผล เช่นการใช้เครื่องมือที่สามารถตรวจวัดการ เปล่งแสงของ oxyluciferin เพื่อแปลมาเป็นผล ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวมีราคาแพงมาก

การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation analysis)

วิธีที่นิยมในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) ทาง NCCN และ FDA องค์การอาหารและยาของอเมริกายังไม่ได้แนะนำไว้ชัดเจนว่าจำเป็นต้องใช้วิธีใดในการตรวจแต่จะเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา มักนิยมใช้การตรวจ 2 วิธี ได้แก่ real time PCR และ direct sequencing analysis ปัจจุบันในประเทศไทย การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) มีบทบาทมากในมะเร็งลำไส้ ซึ่งสถานที่ตรวจได้ยังคงเป็นมหาวิทยาลัยหรือโรงเรียนแพทย์เป็นหลัก แต่ในมะเร็งตับอ่อนยังไม่มีข้อบ่งชี้ในการตรวจชัดเจน ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การกลายพันธุ์ของเคราสนั้นมักเกิดขึ้นใน codon 12,13 และ 61

Shugi Ogino และคณะ [103] ได้ทำการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) ด้วยวิธี pyrosequencing เทคนิค โดยเทียบกับ dideoxy sequencing technique ในเซลล์ต้นแบบและชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็ง FFPE (paraffin-Embedded Tissue Blocks) เพื่อเปรียบเทียบความไวของการตรวจด้วยวิธีไพโรซีควอนซิง (sensitivity) โดยการตรวจการกลายพันธุ์ในส่วนของเซลล์ต้นแบบ (cell line) ที่ตำแหน่ง codon 12 GGT-->GTT และ codon 13 (GGC-->GAC และส่วนของ ชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้และมะเร็งตับอ่อน (paraffin tissues) จำนวน 9 ราย ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส K-ras mutation 5 แบบของการกลายพันธุ์ ได้แก่ c.35G->T (codon 12 GGT->GTT; p.Gly12Val), c.35G->A (codon 12 GGT->GAT;p.Gly12Asp), c.34G->T (codon 12 GGT->TGT; p.Gly12Cys),c.34G->A (codon 12 GGT->AGT; p.Gly12Ser), and c.38G->A(codon 13GGC->GAC; p.Gly13Asp ดังแผนภูมิที่ 23 B C E F H แสดงการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras) ในแต่ละรูปแบบ



แผนภูมิที่ 23 ตารางแสดงตำแหน่งของการตรวจหายีนการกลายพันธุ์ ด้วยวิธีไพโรซีควอนซึ่ง B C E F H [103]

โดยการตรวจในแต่ละส่วนนั้นได้เปลี่ยนความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน สำหรับเซลล์ต้นแบบ (cell line) ใช้สัดส่วนความเข้มข้นที่ร้อยละ 50,30,20,10,5,3, และร้อยละ 2 ตามลำดับ ส่วนชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็ง (paraffin embedded tissues) นั้นใช้ความเข้มข้นสัดส่วนที่ร้อยละ 50,30,20,10 และร้อยละ 5 ตามลำดับ สำหรับชิ้นเนื้อในส่วนของมะเร็งตับอ่อนจำนวน 9 รายนั้นไม่ได้นำมาเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น

จากการวิจัยของ Ogino และคณะ พบว่าในการตรวจด้วยวิธีไพโรซีควอนซึ่งนั้นในส่วนของการตรวจเซลล์ต้นแบบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มี ความไวที่ ความเข้มข้นที่ร้อยละ 10 และร้อยละ 5 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.004, P=0.00008$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ดังในตารางที่ 12 สำหรับในส่วนของชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งพบว่าในส่วนของการตรวจระดับความเข้มข้นที่ร้อยละ 50,30,5 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในส่วนของร้อยละ 10 และ

ร้อยละ 20 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006, 0.0007$)ตามลำดับ ดังในตารางที่ 13

สำหรับชิ้นเนื้อในส่วนของมะเร็งตับอ่อนจำนวน 9 รายพบว่าการใช้วิธีไพโรซีควอนซึ่งสามารถแสดงผลการตรวจได้ 7 ราย 21 การตรวจที่พบว่ามีกรกลายพันธุ์จากการตรวจทั้งหมด 21 ครั้ง ส่วนวิธี dideoxy BigDye sequencing สามารถตรวจพบได้ 5 รายจาก 14 การตรวจจากการตรวจทั้งหมด 21 ครั้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P=0.01$) [103]

Fraction of mutant DNA	Diagnosis	Dideoxy (BigDye) sequencing	Pyrosequencing
50%	Correct	23/24 (96%)	24/24 (100%)
	Wild type (incorrect)	0/24 (0%)	0/24 (0%)
	Indeterminate	1/24 (4%)	0/24 (0%)
30%	Correct	23/24 (96%)	24/24 (100%)
	Wild type (incorrect)	0/24 (0%)	0/24 (0%)
	Indeterminate	1/24 (4%)	0/24 (0%)
20%	Correct	21/24 (88%)	24/24 (100%)
	Wild type (incorrect)	0/24 (0%)	0/24 (0%)
	Indeterminate	3/24 (12%)	0/24 (0%)
10%	Correct	16/24 (67%)*	24/24 (100%)*
	Wild type (incorrect)	0/24 (0%)	0/24 (0%)
	Indeterminate	8/24 (33%)	0/24 (0%)
5%	Correct	8/24 (33%) [†]	23/24 (96%) [†]
	Wild type (incorrect)	4/24 (17%)	0/24 (0%)
	Indeterminate	12/24 (50%)	1/24 (4%)
3%	Correct	5/24 (21%)	11/24 (46%)
	Wild type (incorrect)	14/24 (58%)	9/24 (38%)
	Indeterminate	5/24 (21%)	4/24 (17%)
2%	Correct	1/24 (4%)	4/24 (17%)
	Wild type (incorrect)	21/24 (88%)	16/24 (67%)
	Indeterminate	2/24 (8%)	4/24 (17%)

The numbers in the first, second, and third row for each mixture represent the fractions of individual runs with correct diagnosis, with wild-type diagnosis, and with indeterminate diagnosis, respectively.
 *Statistical significance, $P = 0.004$.
[†]Statistical significance, $P = 0.000008$.

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจ K-ras mutation ของเซลล์ต้นแบบ (cell line) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50,30,20,10,5,3,2 ส่วนที่ระดับร้อยละ 10,5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.004, P=0.00008$) [103]

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fraction of cancer DNA	Diagnosis	Dideoxy (BigDye) sequencing	Pyrosequencing
50%	Correct	15/15 (100%)	15/15 (100%)
	Wild type (incorrect)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	Indeterminate	0/15 (0%)	0/15 (0%)
30%	Correct	14/15 (93%)	15/15 (100%)
	Wild type (incorrect)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	Indeterminate	1/15 (7%)	0/15 (0%)
20%	Correct	8/15 (53%)*	15/15 (100%)*
	Wild type (incorrect)	5/15 (33%)	0/15 (0%)
	Indeterminate	2/15 (13%)	0/15 (0%)
10%	Correct	6/15 (40%) [†]	15/15 (100%) [†]
	Wild type (incorrect)	6/15 (40%)	0/15 (0%)
	Indeterminate	3/15 (20%)	0/15 (0%)
5%	Correct	7/15 (47%)	10/15 (67%)
	Wild type (incorrect)	6/15 (40%)	5/15 (33%)
	Indeterminate	2/15 (3%)	0/15 (0%)

The numbers in the first, second, and third row for each mixture represent the fractions of individual runs with correct diagnosis, with wild-type diagnosis, and with indeterminate diagnosis, respectively.
*Statistical significance, $P = 0.006$.
[†]Statistical significance, $P = 0.0007$.

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจ K-ras mutation ของชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50,30,20,10,5 ส่วนที่ระดับร้อยละ 20,10 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.004, P=0.00008$) [103]

โดยสรุปทางผู้วิจัยคิดว่าการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแคราส ด้วยวิธีไพโรซีควนซิง เทคโนโลยี นั้นน่าจะทำได้ดีและมีความคุ้มค่า เนื่องจากสะดวก รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม คือมีความเร็วสูง และเหมาะกับชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจเนื่องจากสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ถึงแม้ว่าจะมีการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอแล้วก็ตาม

จากการศึกษาของ Vicki และ คณะ [104] ได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษา การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแคราสด้วยการตรวจวิธีชนิดต่างๆ ทั้ง 7 วิธีที่ได้แก่ SSCP (single strand conformation polymorphism analysis), pyrosequencing, HRM (high resolution melting) 92 bp, HRM high resolution melting) 80 bp, Tib Molbiol, Dideoxy sequencing, Dxs (allele specific PCR) การศึกษาตรวจแคราสยีนในผู้ป่วยมะเร็ง ลำไส้ใหญ่จาก 74 ชิ้นเนื้อที่ทำ การตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังไว้ในพาราฟิน (FFPE Formalin-fixed Paraffin-Embedded tissue) พบว่าการตรวจพบยีนแคราสโดยใช้อย่างน้อย 5 วิธีที่ได้ผลตรวจเหมือนกัน (จำเป็นต้องตรวจผลเหมือนกันอย่างน้อย 5 วิธีการตรวจ) อยู่ที่ร้อยละ 83 (66/80) แต่ถ้าใช้ผลอย่างใดอย่างหนึ่งที่ตรวจพบการกลายพันธุ์พบว่าอยู่ที่ร้อยละ 96 (71/74) โดยที่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าวิธีใดเป็นการตรวจที่

ควรเป็นมาตรฐานหลัก (gold standard) แต่ขึ้นเนื้อที่นำมาตรวจควรมีปริมาณของเนื้อมะเร็งที่มากกว่าร้อยละ 20-25

อย่างไรก็ตามการศึกษา พบว่าการใช้วิธี DXS, TIB Molbiol มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ขั้นตอนของการตรวจ ค่อนข้างยุ่งยาก ถึงแม้จะสามารถทราบผลตรวจได้เร็ว และดูเหมือนว่าวิธีที่ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากและขั้นตอนการตรวจเหมาะสมน่าจะเป็น วิธี HRM และ pyrosequencing ดังภาพประกอบ

Method	Reagent costs	Labor time	Turnover time, hours*
SSCP	+	++	5
HRM	+	+	2.5
Pyrosequencing	++	++	3.5
Sequencing	++	+++	5
TIB Molbiol	+++++	+++++	2.5
DxS	+++++	++	2.5

*Exclusive of DNA extraction.

ตารางที่ 14 แสดงค่าใช้จ่าย และระยะเวลาการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่างๆ [104]

ผลการตรวจยีนแควาสทำให้เราสามารถแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มที่มียีนแควาสชนิดปกติ (K-ras wild-type)
2. กลุ่มที่มียีนแควาสชนิดกลายพันธุ์ (K-ras mutant)

ปัจจุบันทางการแพทย์เราหวังที่จะก้าวหน้าไปสู่แนวทางใหม่ที่เรียกว่า Personalized therapy คือการจำแนกผู้ป่วยตามรายละเอียดของตัวโรค และยีนของผู้ป่วยมะเร็งเพื่อวางแผนการรักษาให้เหมาะสมที่สุดกับผู้ป่วยแต่ละราย บทบาทของยีนแควาสชัดเจนในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ ระยะแพร่กระจายที่จำเป็นต้องเลือกการรักษาด้วยการให้ยากกลุ่ม อีจี เอฟ อาร์ แต่ในมะเร็งตับอ่อนยังไม่มียีนแควาสชัดเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

การส่งตรวจการกลายพันธุ์ของยีนโคราส

การส่งเนื้อสด (fresh tissue) จำเป็นต้องทำในโรงพยาบาลที่มีห้องปฏิบัติการการตรวจ การกลายพันธุ์เท่านั้น เนื่องจากพยาธิแพทย์ต้องเก็บชิ้นเนื้อไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ให้คงสภาพไว้ จนถึงเวลาที่จะนำเนื้อสดออกมาสกัดดีเอ็นเอ และต้องเป็นชิ้นเนื้อที่ยืนยันว่าเป็นเซลล์มะเร็งที่มีชีวิต (viable cancer cell) ไม่ใช่บริเวณที่เป็นเนื้อตาย นอกจากนี้ น้ำ ปรระปาที่ใช้กันอยู่ทั่วไปก็อาจจะมีส่วนทำให้ทำลายดีเอ็นเอได้เช่นกัน

การส่งชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังไว้ในพาราฟิน (FFPE Formalin-fixed Paraffin-Embedded tissue) เป็นชิ้นเนื้อซึ่งผ่านการวินิจฉัยโดยพยาธิแพทย์มาก่อนแล้ว ชิ้นเนื้อเหล่านี้จะตรึงด้วย ฟอร์มาลินและเก็บรักษาไว้ ซึ่งสามารถนำกลับมาตัดซ้ำและเลือกบริเวณที่มีเนื้อมะเร็ง ลुकกลม มาทำการสกัดสารพันธุกรรมได้ อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาไว้นานเกินไป สภาพภูมิอากาศ ความชื้น และสูตรผสมของฟอร์มาลินไทย ทำให้เนื้อเยื่อมะเร็งอาจมีคุณภาพด้อยลงเรื่อยๆ จากข้อจำกัดนี้การใช้ FFPE block ที่มีอายุเกิน 3 ปี มีโอกาสที่ทำให้การสกัดดีเอ็นเอล้มเหลวได้สูง และอาจจะต้องใช้เวลาานกว่าปกติ เนื่องจากต้องสกัดหลายครั้งหรืออาจจะทำไม่ได้เลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

วิธีดำเนินการวิจัย

6.1 รูปแบบของการวิจัย

การวิจัยรูปแบบการศึกษาเชิงพรรณนา(Descriptive study)

6.2 .ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

6.2.1 ประชากรเป้าหมาย หมายถึง ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งของตับอ่อน pancreatic cancer

ประชากรตัวอย่าง (sample population) หมายถึง ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งตับอ่อนที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

การวิจัยทำในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งตับอ่อน ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ พ.ศ.2549 ถึงพ.ศ.2552 โดยมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยดังนี้

6.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion criteria) (ข้อ 1-3 สำหรับผู้ป่วยเก่า และ 1-5 สำหรับผู้ป่วยใหม่)

1. เป็นผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สามารถเก็บประวัติการรักษาได้
2. ได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา
3. ยังมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่สามารถนำมาตรวจเพิ่มเติมเกี่ยวกับ molecular genetic ได้
4. สามารถเจาะเลือดผู้ป่วยได้ก่อนผ่าตัดหรือหลังผ่าตัดหรือในรายที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ (ในกรณีที่ผู้ป่วยใหม่)
5. ยินยอมให้เจาะเลือดเพื่อทำการตรวจ *k-ras* mutation (ในกรณีที่ผู้ป่วยใหม่ ในรายที่ไม่ยินยอมเจาะเลือด ถ้า เกณฑ์ในข้อ 1-3 เข้าได้ สามารถเข้าร่วมงานวิจัยได้โดยไม่ต้องเจาะเลือด)

6.3 เกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ไม่มีชิ้นเนื้อในโรงพยาบาลหรือ ชิ้นเนื้อที่มีอยู่ไม่สามารถนำมา มาตรวจทาง molecular genetic ได้
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมให้ข้อมูล

6.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

เนื่องจากการศึกษาเชิงพรรณนาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ของตับอ่อนและการกลายพันธุ์ของยีนเคราส เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน เคราส ในประเทศไทยมาก่อน จึงอาศัยข้อมูลการศึกษาในต่างประเทศซึ่งพบว่า อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของ เคราสยีนในต่างประเทศประมาณ 70-90 % ของมะเร็งตับอ่อนทั้งหมด

จึงใช้ค่าดังกล่าวแทน $P = 0.9$, $1-P = Q = 0.1$ และกำหนดให้ความเชื่อมั่นที่ 95% ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ประมาณ $\pm 10\%$ (d) คำนวณหาขนาดตัวอย่างจากสูตร

$$N = [Z_{\alpha}^2 P Q / d^2] \approx 34$$

ได้ขนาดตัวอย่างประมาณ 34 คน ทางผู้วิจัยคิดว่าจะเก็บข้อมูล โดยวางแผนรวบรวมผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนประมาณ 38 คน

6.5 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

1. ตัวแปรการวิจัย
 - 1) การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (*K-ras* mutation) ตำแหน่ง codon ที่ 12
 - 2) การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (*K-ras* mutation) ในเลือดของผู้ป่วย

ผลเป็นอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสเป็นร้อยละ
2. เครื่องมือที่ใช้ในการวัด
 - 1) ข้อมูลจากเวชระเบียน เก็บข้อมูลของผู้ป่วยด้วยใบบันทึก (Record Form)

2) Mutation analysis : PCR technique , DNA sequencing, Pyrosequencing method

6.6 การเตรียม DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1. นำชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่ได้รับการทำ Microdissection มาทำการแยกเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml.

2. จากนั้นเติม Lysis buffer II (950:50) 10% Sodium Sulphate 200-400 uL เพื่อเป็นการย่อยสลาย เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) จากนั้นใส่ Proteinase K 5-10 uL และนำไปใส่ไว้ในเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 50 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

3. เติม phenol chloroform ปริมาตร 2 เท่าของชิ้นเนื้อ จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูส่วนที่ใสใสในหลอดทดลองอีกอันหนึ่ง

4. เติม 3 M Sodium Acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด ร่วมกับ 100% Ethyl Alcohol 500 uL เพื่อเป็นการตกตะกอน DNA จากนั้นใส่ glycogen 1 uL และนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ -20°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

5. นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่น (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนบนทิ้ง

6. ใส่ 70% Ethyl alcohol 500uL และนำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

7. เติม Tris EDTA 50 uL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ DNA ของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่พร้อมทำการตรวจ Pyrosequencing ต่อไป

โดยการทำการตรวจหา การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (*K-ras* mutation) ในการศึกษานี้ใช้วิธีการไพโรซีควอนซิงเทคนิค (Pyrosequencing technique) ในตำแหน่งที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่ามี การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (*K-ras* mutation) ในการศึกษานี้ตรวจการกลายพันธุ์ใน

ตำแหน่งโคดอนที่ 12 และเข้าสู่ขั้นตอนของ DNA sequencing ต่อไป (รายละเอียดการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนคราสในบทที่ 5) (สถานที่ทำการตรวจการหาการกลายพันธุ์ หน่วย Gene Pro ดีกอปอ.ชั้น 14 คณะแพทยศาสตร์จุฬา)

6.7.การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ขั้นเตรียมการ

1. ทบทวนบทวรรณกรรมเกี่ยวกับมะเร็งตับอ่อนและอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนคราส
2. ศึกษาระเบียบของการวิจัย และทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการวิจัยด้านผลลัพธ์ทางการแพทย์และการรักษามะเร็งตับอ่อน วิธีการตรวจด้วยไฟโรซีควอนซิงเทคนิค
3. เสนอโครงร่างงานวิจัย และขอความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นดำเนินการ

1. รวบรวมรายชื่อผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยเรื่องมะเร็งตับอ่อนตามรหัสโรค ICD10 ได้แก่ C25.0-C 25.9 ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นผู้ป่วยในของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงระยะเวลาที่กำหนด
2. รวบรวมรายชื่อชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่วินิจฉัยว่าเป็น มะเร็ง ของตับอ่อนจาก ข้อมูลของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. เก็บข้อมูลจากเวชระเบียน โดยใช้แบบบันทึกข้อมูล (record form) โดยผู้วิจัยเป็นผู้บันทึก ข้อมูลที่ต้องการ ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ,อาการและอาการแสดง , ภาวะแทรกซ้อนที่พบทั้งก่อนและระหว่างการรักษา , ขนาดและตำแหน่งของก้อนเนื้องอก ความสามารถในการผ่าตัดได้ หรือไม่ได้ ,การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด การตอบสนองต่อการรักษา และระยะเวลารอดชีวิต
4. ส่งรายชื่อและรวบรวมชิ้นเนื้อที่มีอยู่ในโรงพยาบาลจุฬาหรือในรายที่สามารถตามชิ้นเนื้อจากที่อื่น ๆ ได้ให้แก่พยาธิแพทย์
5. พยาธิแพทย์ตรวจสอบและกำหนดขอบเขตของชิ้นเนื้อที่มีส่วนของมะเร็งตับอ่อนที่มากที่สุดหรือมากกว่าร้อยละ 30 ในสไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี H&E หลังจากนั้นส่งตัดชิ้น

เนื้อในส่วนที่ทำการตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block) จำนวน 5-10 สไลด์เพื่อให้ได้จำนวนของเนื้อในส่วนของมะเร็งมากที่สุด

6. ส่งชิ้นเนื้อผ่านการตัดเป็นสไลด์และส่วนที่กำหนดขอบเขตแล้ว มาเข้าสู่ขั้นตอนของการเตรียม ดีเอ็นเอ
7. ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนแคราสด้วยวิธีไพโรซีควนซิงเทคนิคในตำแหน่งโคดอนที่ 12, แปลผลการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ
8. ในส่วนของซีรัม จะทำการขอเลือดผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในหน่วยมะเร็งวิทยาในช่วงที่เข้ารับการรักษาให้ยาเคมีบำบัด หรือจำเป็นต้องเจาะเลือดเพื่อเข้ารับการรักษาในด้านมะเร็ง
9. ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษาคงจะถูกบันทึกลงบนแบบบันทึกข้อมูลและจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยผู้ทำการวิจัยจะเป็นผู้รวบรวม

6.8 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 16

1. Primary endpoint การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราส ในมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย แตกต่างจากการศึกษาอื่นหรือไม่
2. Secondary endpoint คือ การกลายพันธุ์ของยีนแคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนและในเลือดมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ข้อมูลที่ทำการศึกษาคือข้อมูลเชิงคุณภาพ คือ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนแคราส (*k-ras*)
3. สรุปรูปข้อมูลเป็นร้อยละ ,มีหรือไม่มี ความสัมพันธ์, นำเสนอในรูปแบบตารางและสถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน คือ Chi-square test
4. วิเคราะห์ข้อมูลด้านการรอดชีวิตด้วย Kaplan meier, log rank test

6.9 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

เนื่องจากการศึกษาโดยการนำชิ้นเนื้อมะเร็ง ตับอ่อนของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาไปแล้วมาทำการตรวจพิเศษทาง molecular genetic ด้วยวิธี ไพโรซีควนซิง (Pyrosequencing) ซึ่งไม่มีผลต่อการรักษาที่ผ่านมาแล้วของผู้ป่วยแต่อย่างใด สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยก่อน

และหลังการผ่าตัดต้องผ่านการยินยอมจากผู้ป่วยร่วมด้วย ข้อมูลของการวิจัยเคารพในสิทธิของผู้ที่เข้าร่วมการวิจัย การเจาะเลือดจะทำในช่วงที่ผู้ป่วยเข้ารับการแทงเส้นเลือดเพื่อให้ยาเคมีบำบัด หรือช่วงตรวจการรักษาที่จำเป็นต้องเจาะเลือด

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด มีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ข้าจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก การวิจัยไม่มีผลต่อกา รักษาของผู้เข้าร่วมงานวิจัย การรักษายังคงดำเนินตามมาตรฐานเดิม ผู้เข้าร่วมวิจัยสามารถขอหยุดการเข้าร่วมโครงการวิจัยได้เมื่อต้องการ เนื่องจากเป็นการวิจัยในมนุษย์ผู้วิจัยได้เตรียมไปยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

6.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

การวิจัยนี้มีข้อจำกัดในเทคนิคการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เพื่อหา การกลายพันธุ์ของ ยีนเคราส (K-ras mutation) เนื่องจากว่าการตรวจทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับ mutation analysis ดังกล่าวในประเทศไทยยังเป็นเพียงการทดลองในงานวิจัย การตรวจ K-ras mutation analysis ในไทยยังไม่เป็นที่แพร่หลาย จึงคิดว่าห้องปฏิบัติการของเรามีความพร้อมรวมถึงมีเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญเพียงพอในการทำการปฏิบัติการในด้าน mutation analysis ปัญหาในเรื่องจำนวนผู้ป่วยและชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจอาจไม่เพียงพอกับ ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ (sample size) เนื่องจากอุบัติการณ์ของมะเร็งตับอ่อนค่อนข้างน้อย จำเป็นต้องเจาะเลือดผู้ป่วย เพื่อตรวจหาความผิดปกติของเคราส อาจมีปัญหาด้านความยินยอมหรือการเก็บรักษาเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.11 การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)

การดำเนินการ	2551		2552												2553			
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. การเตรียมงาน	0	0																
2. เก็บข้อมูล			0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Pyrosequencing study				0		0		0		0								
อ่านผล mutation				0		0		0		0								
3. รวบรวมข้อมูล				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4. วิเคราะห์ข้อมูล															0	0		
5. เรียบเรียงการนำเสนอข้อมูล																0	0	0

6.12 งบประมาณ (Budget)

แหล่งทุนวิจัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยมะเร็งวิทยาเป็นผู้สนับสนุนค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ

ค่า Pyrosequencing (1,000 บาท/ ครั้ง) 200,000 บาท

ค่า Primer 100,000 บาท

ค่าเตรียมเอกสาร 5,000 บาท

รวม 305,000 บาท

บทที่ 7

ผลการศึกษา

การศึกษาเก็บข้อมูล ตั้งแต่ 1/1/49-30/11/52 การศึกษารวบรวมผู้ป่วยตามรหัสวินิจฉัยโรค ICD-10 ตั้งแต่ 1/1/50-30/6/52 รายชื่อผู้ป่วยที่ได้ทั้งหมด 192 ราย คัดรายชื่อผู้ป่วยที่มีผลชิ้นเนื้อในรพ.จุฬาลงกรณ์ และวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อน (CA pancreas) เท่านั้น 80 ราย ไม่มีรายชื่อของชิ้นเนื้อที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งตับอ่อนในโรงพยาบาล ตั้งแต่แรก (ไม่ได้ส่งชิ้นเนื้อเพื่อตรวจวินิจฉัยทางหน่วยพยาธิของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์) 38 ราย ตรวจสอบกับทางพยาธิวิทยา มีผลชิ้นเนื้อรายงานแต่ไม่พบว่ามีเซลล์ชิ้นเนื้อ (ผู้ป่วยขอรับเพื่อไปทำการรักษาที่อื่น), 17 รายมีผล cytology negative (วินิจฉัยจากอาการและอาการแสดง), 9 รายเป็น neuroendocrine tumor, 7 รายไม่ทราบตำแหน่งชัดเจน, 9 รายเป็นมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่มะเร็งตับอ่อนเช่น มะเร็งลำไส้ GIST มะเร็งของถุงน้ำดี มะเร็งตับ, 32 รายชิ้นเนื้อไม่เพียงพอสำหรับการตรวจ เนื่องจากเป็น cytology หรือ FNA จากผู้ป่วย 192 รายชื่อได้ชิ้นเนื้อเพื่อนำมาตรวจการกลายพันธุ์ทั้งหมดเพียง 25 ราย 8 รายได้รับการเจาะเลือดเก็บไว้เพื่อหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในซีรัม แต่มีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่มีชิ้นเนื้อและเจาะเลือดเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของเคราส (6 รายไม่มีชิ้นเนื้อที่สามารถตามมาตรวจได้) ข้อมูลของการวิจัยเก็บข้อมูลจนถึงวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2553

ข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของผู้ป่วยในการศึกษา จำนวน 25 ราย

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล (baseline characteristic) ของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย

ชนิดของคุณสมบัติ	K-ras Wild type จำนวน(ราย) N=15	K-ras mutant จำนวน(ราย)N=10
อายุ		
อายุน้อยกว่า 60 ปี	4	2
อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี	11	8
มัธยฐานอายุ	63	64.5
ช่วงอายุ	41-79	36-82

ตารางที่ 15 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล (baseline characteristic) ของผู้ป่วย
มะเร็งตับอ่อน 25 ราย

สิทธิการรักษา		
ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ	4	3
30 บาท	8	4
ประกันสังคม	0	0
จ่ายเงินสด	3	3
เพศ		
ชาย	10	2
หญิง	5	8
โรคประจำตัว(Underlying disease)		
ไม่มีโรคประจำตัว	5	2
โรคประจำตัว = 1	4	3
โรคประจำตัว = 2	3	4
โรคประจำตัว = 3	2	1
4 หรือมากกว่า	1	0
เบาหวานชนิดที่ 2	6	4
สูบบุหรี่		
สูบบุหรี่	2	2
ไม่สูบบุหรี่	13	7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลพื้นฐานปัจจัยทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย

ชนิดของคุณสมบัติ	K-ras Wild type จำนวน(ราย)	K-ras mutant จำนวน(ราย)
ระยะทางคลินิก(clinical staging)		
ระยะเริ่มต้น(early)	8	7
ระยะลุกลาม (advanced unresectable)	7	3
ระยะตาม AJCC Staging system		
IA	1	0
IB	1	0
IIA	0	0
IIB	5	5
III	3	2
IV	5	3
ระยะตามความสามารถการผ่าตัด (Resecability)		
สามารถผ่าตัดได้(resectable)	8	7
ระยะลุกลามเฉพาะที่ (Locally advanced unresect)	2	0
ระยะแพร่กระจาย(metastasis)	5	3
ตำแหน่งที่มีการลุกลามเฉพาะที่(Site of local invasion)		
SMA	3	0
SMV	3	0
Celiac axis	3	0
Splenicvein	2	0
Portal vein	1	0

ตารางที่ 16 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานปัจจัยทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย

ชนิดของคุณสมบัติ	K-ras Wild type จำนวน(ราย)	K-ras mutant จำนวน(ราย)
ตำแหน่งของการแพร่กระจาย(Site of metastasis)		
ปอด (Lung)	1	0
ตับ (Liver)	5	2
เยื่อผนังช่องท้อง (Peritonium)	0	2
ต่อมน้ำเหลือง (Lymphnode)	0	1
กระดูก (Bone)	0	0
อาการนำ (Symtomp of presentation)		
ปวดท้อง (Abdominal pain)	9	7
น้ำหนักลด (Weight loss)	8	2
เหลือง (Jaundice)	11	5
ก้อนในท้อง (mass)	2	1
น้ำในท้อง (ascites)	2	1
ตำแหน่ง(loacation)		
Head	13	8
Tail	0	2
Head+body	1	0
Body+tail	1	0
Histologic grade		
Well differentiate	13	4
Mod differentiate	0	5
Pooly differentiate	1	0
Unidentify	1	1

ตารางที่ 16 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานปัจจัยทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย

ชนิดของคุณสมบัติ	K-ras Wild type จำนวน(ราย)	K-ras mutant จำนวน(ราย)
ชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย		
ตับอ่อนprimary	11	7
ต่อมน้ำเหลือง(Lymphnode)	1	0
ตับ(liver)	3	1
ลำไส้ใหญ่(colon)	0	1
เยื่อพุงช่องท้อง(omentum)	1	1
CA 19-9 median	248.5	39.28

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงพื้นฐานด้านข้อมูลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน 25 ราย

ชนิดของคุณสมบัติ	K-ras Wild type จำนวน(ราย)	K-ras mutant จำนวน(ราย)
ผ่าตัด		#ไม่ได้ผ่าตัด 1 ราย
Whipple operation	8	5
Palliative	5	4
Tissue biopsy	2	0
ฉายแสง		
● ได้รับการฉายแสง	8	4
● ไม่ได้รับการฉายแสง	7	6
เคมีบำบัด		
● ได้รับการเคมีบำบัด	5	6
● ไม่ได้รับเคมีบำบัด	9	4
สาเหตุการให้เคมีบำบัด		
การรักษาเสริม(adjutant)	3	3
locally advanced	1	0
metastasis	1	3

ผู้ป่วยทั้งหมด 25 รายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อน และมีผลชิ้นเนื้อที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ พบว่ามี 15 รายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras wild type) และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) พบ 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 40 ของผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด

กลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras wild type)

ข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล (ตามตารางแสดงที่ 16)

ผู้ป่วยที่ทำการรักษาทั้งหมด 25 ราย กลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส wild type 15 ราย ค่ามัธยฐานของอายุ อยู่ที่ 63 ปี (อายุอยู่ในช่วงอายุ 41-79 ปี) มีผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี จำนวน 11 ราย และน้อยกว่า 60 ปี จำนวน 4 สิทธิการรักษาส่วนใหญ่เป็นสิทธิ 30 บาท 8 ราย (ร้อยละ 53) เพศชาย 10 ราย และหญิง 5 ราย ส่วนมากมักมีโรคประจำตัวอย่างน้อยหนึ่งโรค 10 ราย (ร้อยละ 66) และมี 6 รายที่มีโรคเบาหวาน ร่วมกับได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานก่อนที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อนผู้ป่วยสูบบุหรี่ 2 ราย (ร้อยละ 13)

ข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก (ตามตารางแสดงที่ 17)

แบ่งผู้เข้ารับการรักษาตามระยะทางคลินิก พบว่า 8 รายเป็นระยะเริ่มต้น (early stage) 7 รายเป็นระยะลุกลาม (locally advanced or metastasis disease) ส่วนระยะของโรคตาม AJCC staging system อยู่ในระยะ 1A 1 ราย IB 1 ราย IIB 5 ราย III 3 ราย และ ระยะที่ IV 5 ราย ตำแหน่งที่มีการลุกลาม มักเป็นเส้นเลือดแดง superior mesenteric artery 3 รายและ celiac axis 3 ราย การกระจายส่วนใหญ่มักพบที่ ตับ 5 ราย อาการนำพบว่าเป็นดีซ่าน ปวดท้อง น้ำหนักลด ก้อนในท้อง และน้ำในท้อง ตามลำดับ ระยะเวลาก่อนมีอาการค่ามัธยฐานอยู่ที่ 1 เดือน(ไม่ได้แสดงรายละเอียดในตาราง) ตำแหน่งของมะเร็งที่พบบ่อย ได้แก่ส่วนของหัวของตับอ่อน 13 ราย คิดเป็น ร้อยละ 86.6 histologic grade 8 รายเป็น well differentiate (ร้อยละ 53.3)

ผู้ป่วยที่ไม่ มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ทั้งหมด 15 ราย 8 รายเป็น pancreatic adenocarcinoma 5 รายเป็น adenocarcinoma, 2 รายเป็น periampullary carcinoma(รายละเอียดไม่ได้แสดงในตาราง)

ตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย 11 รายได้จากตำแหน่งของตับอ่อน 1 รายได้จากต่อมน้ำเหลือง 3 รายได้จากตำแหน่งของตับ 1 รายได้จากเยื่อผนังช่องท้อง

ผู้เข้ารับการศึกษ 8 ราย ได้รับการผ่าตัดด้วยวิธี Whipple's operation (ร้อยละ 53.3) ที่เหลือเป็น การผ่าตัดเพื่อประคับประคองภาวะดีซ่าน หรือได้รับการผ่าตัดเพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อเพื่อทำการ วินิจฉัย มีพื้นฐานของค่า CA19-9 อยู่ที่ 248.5

ผู้เข้ารับการศึกษ 8 รายได้รับการฉายแสง 5 รายได้รับเป็นการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด 2 รายได้รับ เนื่องจากเป็นระยะลุกลามเฉพาะที่ (locally advanced disease) 1 รายได้รับเพื่อการ ประคับประคอง (5 รายได้ รับการฉายแสงร่วมกับการให้เคมีบำบัด)

สำหรับเคมีบำบัดในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) มีผู้เข้าร่วมการศึกษ 4 รายได้รับ เคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด (สูตรที่ได้รับเป็นยา gemcitabine ทั้ง 4 ราย) 2 รายได้รับเนื่องจากเป็นระยะลุกลามเฉพาะที่ locally advanced disease และ 2 รายได้รับเพื่อ ประคับประคองเมื่อได้รับการวินิจฉัยว่าแพร่กระจาย

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (kras mutation)

ข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคล(ตามตารางที่ 16)

ผู้ป่วยที่ทำการศึกษทั้งหมด 25 ราย กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutant) 10 ราย ค่ามัธยฐานของอายุ อยู่ที่ 64.5 ปี (อายุอยู่ในช่วง อายุ 34-82 ปี) มีผู้เข้ารับการศึกษที่อายุ มากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี จำนวน 8 ราย และน้อยกว่า 60 ปีจำนวน 2 ราย สถิติการรักษาเป็นสถิติ 30 บาท 4 ราย (ร้อยละ 40) ชำราชการหรือรัฐวิสาหกิจ 3 ราย จ่ายเงินสด 3 ราย เพศชาย 2 ราย และหญิง 8 ราย มักมีโรคประจำตัวอย่างน้อยหนึ่งโรค 7 ราย (ร้อยละ 70) และมี 4 รายที่มี โรคเบาหวาน ก่อนที่จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อนผู้ป่วยสูบบุหรี่ 2 ราย(ร้อยละ 20)

ข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก

ระยะทางคลินิก พบว่า 7 รายเป็นระยะเริ่มต้น (early stage) 3 รายเป็นระยะลุกลาม (locally advanced or metastasis disease) ส่วนระยะของโรคตาม AJCC staging system อยู่ใน ระยะ II B 5 ราย III 2 ราย และ ระยะที่ IV 3 ราย การกระจายพบที่ ตับ 2 ราย เยื่อปอดช่อง ท้อง 2 ราย 1 รายแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง อาการนำพบว่าเป็น ปวดท้อง ดีซ่าน น้ำหนักลด

ก้อนในท้อง ตามลำดับ ระยะเวลาก่อนมีอาการค่ามัธยฐานอยู่ที่ 1 เดือนซึ่งไม่ต่างกับในกลุ่มที่ไม่มี การกลายพันธุ์(ไม่ได้แสดงรายละเอียดในตาราง)

ตำแหน่งของมะเร็งที่พบบ่อย ได้แก่ส่วนของหัวของตับอ่อน 8 รายคิดเป็น ร้อยละ 80 Histologic grade 4 ว่าเป็น Well differentiate (ร้อยละ 40) 5 ว่าเป็น Moderate differentiate กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 7 ว่าเป็น pancreatic adenocarcinoma 2 ว่าเป็น adenocarcinoma 1 ว่าเป็น periampullary carcinoma (รายละเอียดไม่ได้แสดงในตาราง) ตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่ได้รับการวินิจฉัย 7 รายได้จากตำแหน่งของตับอ่อน 1 รายได้จากตำแหน่ง ของตับ 1 รายได้จากเยื่อผนังช่องท้องและอีก 1 รายได้จากลำไส้ใหญ่ที่มีการแพร่กระจายไป ผู้เข้ารับการศึกษา 5 ราย ได้รับการผ่าตัดด้วยวิธี Whipple s operation (ร้อยละ 50) ที่เหลือเป็นการ ผ่าตัดเพื่อประคับประคองภาวะดีซ่าน หรือได้รับการผ่าตัดเพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อเพื่อ อกทำการ วินิจฉัย 4 ราย และไม่ได้รับการผ่าตัด 1 ราย มัธยฐาน ของค่า CA19-9 อยู่ที่ 39.28

4 รายได้รับการฉายแสง ทั้งหมดได้รับเป็นการรักษาเสริมหลังการผ่าตัดโดยเป็นการรักษาฉายแสง ร่วมกับเคมีบำบัด มีผู้เข้าร่วมการศึกษา 6 ราย ได้รับเคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริมหลัง การผ่าตัด (สูตรที่ได้รับเป็นยา gemcitabine ทั้ง 3 ราย) 3 รายได้รับเนื่องจากประคับประคองเมื่อได้รับการ วินิจฉัยว่าแพร่กระจาย

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลของกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) เทียบกับกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutant)

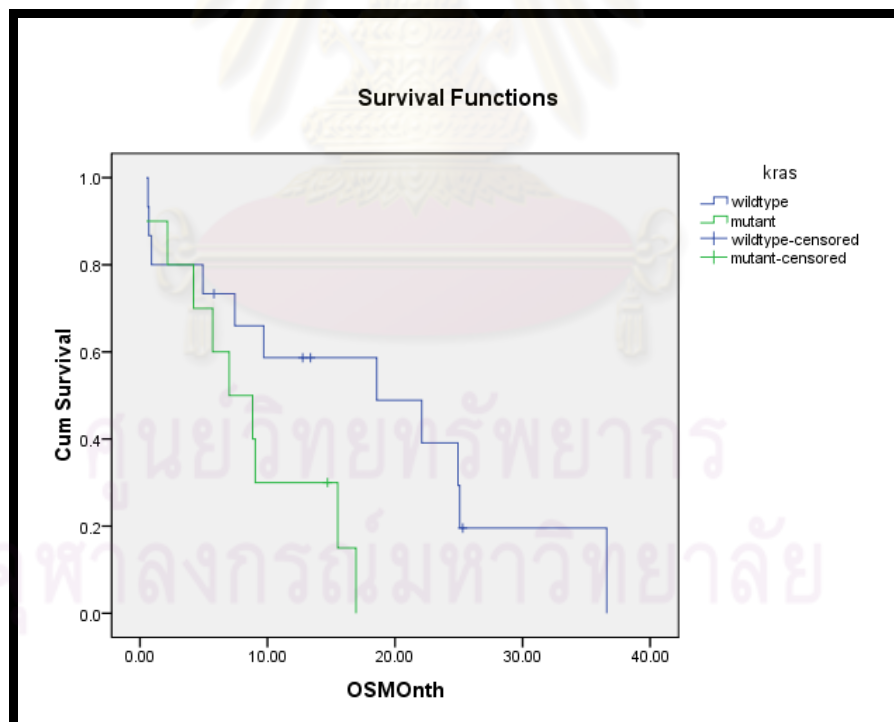
ชนิดของคุณสมบัติ	(Chi square test (P))
อายุ	
น้อยกว่า 60 ปี หรือมากกว่าเท่ากับ 60 ปี	P=0.702
สิทธิการรักษา	
30 บาท หรือสิทธิอื่นๆ	P=0.510
เพศ	
ชาย หญิง	P=0.022
เบาหวานก่อนได้รับการวินิจฉัย	P=1.0
สูบบุหรี่	P=0.571
ระยะทางคลินิก (clinical staging)	P=0.404
ระยะเริ่มต้น(early)	
ระยะลุกลามหรือแพร่กระจาย (advanced unresectable or metastasis)	
Histologic grade	P=0.513
Well differentiated VS mod-poorly differentiated	
การผ่าตัด	P=0.870
(whipple's operation VS palliative or biopsy)	
CA 19-9 ก่อนผ่าตัด	P=0.573 (Mann-Whitney U test)
ตำแหน่งของชิ้นเนื้อส่งตรวจโครมาติน	P=0.856
ตับอ่อน หรือ ส่วนอื่นๆ	
ระยะเวลาการเก็บชิ้นเนื้อก่อนได้รับการตรวจการกลายพันธุ์	P=0.026 (Mann-Whitney U test)

จากข้อมูลพื้นฐานของทั้งสองกลุ่ม (K-ras wild type and K-ras mutant) พบว่าไม่มี ความแตกต่างกันของคุณลักษณะประชากร ยกเว้นในเรื่องของเพศ (p=0.022) และระยะเวลาการ เก็บชิ้นเนื้อก่อนได้รับการตรวจการกลายพันธุ์ (p=0.026) ดังตารางที่ 18

การมีชีวิตรอดของทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแผนภูมิที่ 24 พบว่าในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส มีมาตรฐานการรอดชีวิต 18.56 เดือน สำหรับของกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของเคราส ยีน มีมาตรฐานการรอดชีวิตอยู่ที่ 7.001(P=0.036) มีมาตรฐานการรอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มอยู่ที่ 9.7 เดือน

ปัจจัยที่พบว่ามีผลต่อการรอดชีวิต ได้แก่ ระยะข องโรค การได้รับการผ่าตัดด้วย Whipple operation, Histologic grade และ K-ras mutation (ตารางที่ 20)

แผนภูมิที่ 24 แสดงมาตรฐานระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยจำแนกตามการกลายพันธุ์ของเคราส ยีน (Median overall survival all patients total N=25) มีมาตรฐานการรอดชีวิตข องผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของเคราส ยีน =7.00 เดือน มีมาตรฐานการรอดชีวิตของผู้ป่วย ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราส ยีน =18.56 เดือน1(P=0.036)



คุณสมบัติของชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

ชิ้นเนื้อทั้งหมดที่ส่งตรวจเป็นชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วย ฟอรัมาลินและฝังไว้ในพาราฟิน (FFPE Formalin-fixed Paraffin-Embedded tissue) ชิ้นเนื้อที่ได้รับการส่งตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราสจำนวน 25 ราย (ตามตารางที่ 19) ร้อยละ 68 ได้จากตับอ่อนเอง (primary lesion) 11 ราย ในกลุ่มของเคราส (K-ras wild type) 6 รายในกลุ่มของเคราส K-ras mutant อีกร้อยละ 32 ได้จากส่วนอื่นๆ ได้จากชิ้นเนื้อในส่วนของ การแพร่กระจายไปที่ตับ 4 รายคิดเป็นร้อยละ 16 ได้จากต่อมน้ำเหลือง 2 และเยื่อผนังช่องท้อง 1 มีพื้นฐานของการเก็บชิ้นเนื้อเพื่อมาตรวจการกลายพันธุ์ในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (K-ras wild type) 44.22 เดือน กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ (K-ras mutant) 18.15 เดือน (ไม่แสดงในตาราง)

ตารางที่ 19 แสดงคุณสมบัติของชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจยีนเคราส

ตำแหน่งส่งตรวจการกลายพันธุ์	K-ras wild type	K-ras mutant
ทั้งหมด N=25	N=15	N=10
ตับอ่อน(primary)	11	6
ต่อมน้ำเหลือง(lymphnode)	1	1
ตำแหน่งที่แพร่กระจายไปที่ตับ (liver)	3	1
ตำแหน่งที่แพร่กระจายไปที่ลำไส้ใหญ่(colon)	0	1
เยื่อผนังช่องท้อง (peritonium omentum)	0	1

การกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่พบ

พบลักษณะการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน (codon) ที่ 12 มักพบเป็นการเปลี่ยนแปลง จาก GGT-GAT 7 ราย (ที่ตำแหน่ง nucleotide ที่ 35,38) และ GGT-GCT 3 ราย (ที่ nucleotide ที่ 34,35 ไม่พบการกลายพันธุ์ในส่วนของ GGT-GTT, GGT-TGT หรือ GGT-CGT)

สำหรับการกลายพันธุ์ในส่วนของซีรัมทางเนื่องจากมีเพียง 1 ราย ที่สามารถเก็บเลือดได้และมีผล
ขึ้นเนื้อทางพยาธิที่สามารถตรวจสอบถึงการกลายพันธุ์ได้ ทางผู้วิจัยยังไม่ได้ตรวจเพิ่มเติมของการ
กลายพันธุ์ของซีรัมดังกล่าว

ตารางที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลของกลุ่ม Uni-variate
analysis /Multi-variate

ชนิดของคุณสมบัติ	Univariate (P)	Multivariate (P)
อายุ		-
น้อยกว่า 60 ปี หรือมากกว่า เท่ากับ 60 ปี	P=0.872	
เพศ		-
ชาย หญิง	P=0.230	
เบาหวานก่อนได้รับการวินิจฉัย	P=0.702	-
สูบบุหรี่	P=0.096	-
ระยะทางคลินิก (clinical staging)	P=0.034	0.026
ระยะเริ่มต้น(early) ระยะลุกลามหรือแพร่กระจาย (advanced unresectable or metastasis)		
Histologic grade	P=0.000	0.004
(Well differentiated VS mod- poorly differentiated)		
การผ่าตัด	0.001	0.013
(whipple's operation VS palliative or biopsy)		
การกลายพันธุ์ของยีนเคราส	0.036	0.027

บทที่ 8

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

8.1 สรุปผลการวิจัย

- 1.อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส อยู่ที่ร้อยละ 40 โดยการกลายพันธุ์ส่วนมากเป็น GGT-GAT
2. ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในด้านเพศ และระยะเวลาการเก็บชิ้นเนื้อ ก่อนได้รับการตรวจการกลายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญคือ ในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras wild type) พบว่ามีจำนวนเพศชายมากกว่าเพศหญิง ส่วนกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราสพบว่ามี เพศหญิงที่มากกว่าเพศชาย ระยะเวลาการเก็บชิ้นเนื้อก่อนการตรวจ มีพื้นฐานในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์นานกว่า คือ 44.22 เดือน เทียบกับ 18.15 เดือน สำหรับข้อมูลอื่นๆไม่มีความแตกต่างกัน
3. การรอดชีวิตในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (mutant) แย่กว่าในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (wild type) ปัจจัยที่มีผลต่อระยะเว ลากการมีชีวิตรอด ได้แก่ ระยะทางคลี นิค (clinical staging) Histological grade การได้รับการผ่าตัดด้วยวิธี Whipple 's operation และการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

8.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการศึกษาเชิงพรรณนาโดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเป็นการศึกษาอุบัติกา ณ์การกลายพันธุ์ของยีนเคราสในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย โดยเปรียบเทียบอุบัติการณ์กับการศึกษาอื่นๆที่ทำมาซึ่งวิธีที่นำมาใช้ในการตรวจคือวิธีไฟโรซีควอนซึ่งเทคนิค

ข้อมูลที่สำคัญ คือ อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ ซึ่งขึ้นกับขั้นตอนการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ เริ่มจากการเก็บรวบรวมชิ้นเนื้อที่มีอยู่มาอ่านซ้ำและสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้น

เนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block) ระยะเวลาที่เก็บรักษาชิ้นเนื้อ สารพันธุกรรมที่สกัดได้ออกมาจะมีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอหรือไม่ขึ้นกับ หลายสาเหตุ จากการศึกษาที่ใช้อุบัติการณ์ของต่างประเทศเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาดังกล่าวในเมืองไทย ชิ้นเนื้อที่สามารถนำมาตรวจได้จำนวนเพียง 25 ราย (จากที่คำนวณไว้ 34 ราย) จากระยะเวลาตั้งแต่ปี 1 มกราคม 2549 ถึง 31 พฤศจิกายน 2552 เป็นผลให้ได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือที่น้อยลงยากที่จะใช้ในการบอกแนวโน้มของการตอบสนองการรักษา ระยะเวลาที่โรคจะลุกลามและระยะเวลาการรอดชีวิต อาจจะต้องรอการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การใช้การตรวจด้วยวิธีไฟโรซีควอนซิงเทคนิคจากการศึกษาดังที่ได้กล่าวมาแล้ว พบว่ามีความเหมาะสมในด้านของ ความไวและความจำเพาะ ระยะเวลาในการตรวจ ความสามารถในการแปลผล และราคา [103] ทำให้เป็นวิธีการตรวจที่ ศูนย์จีโนม (GenePro) คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์ เลือกใช้และบริการสำหรับการตรวจการกลายพันธุ์ในส่วนของมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกวิธีนี้เพื่อทำการศึกษาในมะเร็งตับอ่อน โดยการตรวจจะตรวจการกลายพันธุ์ตามข้อมูลของ Ogino และคณะ คือ ตรวจการกลายพันธุ์ของโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่ง ของโคดอน 12 เนื่องจากอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของโคดอนที่ 13 พบได้น้อย โดยประมาณร้อยละ 2-3

มะเร็งตับอ่อนในปัจจุบันยังคงเป็นโรคที่มีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่ดี การศึกษาของ CONKO-001[48] พบว่าถึงแม้ว่าผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนอยู่ในระยะที่สามารถผ่าตัดได้และได้รับการผ่าตัดได้ร่วมกับการได้รับการรักษาเสริมด้วยเคมีบำบัด แล้วก็ตาม มัธยฐานการมีชีวิตรอดของการมีชีวิตรอดมีเพียง 22.8 เดือนเท่านั้น จากการศึกษาที่พบว่ามะเร็งตับอ่อนยังเป็นโรคที่มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและไม่ต่างจากการศึกษาอื่นๆ เนื่องจากพบว่ามัธยฐานการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ได้รับการศึกษาทั้งกลุ่มที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์มีเพียง 9.7 เดือนเท่านั้นถึงแม้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับการศึกษาร้อยละ 50 อยู่ในระยะที่สามารถผ่าตัดได้ก็ตาม

จากการศึกษาพบว่าอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส อยู่ที่ร้อยละ 40 (10/25) รายจาก 25 ราย ซึ่งพบว่าอุบัติการณ์ค่อนข้างต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมา ดังตารางที่ 8.1 แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ยังเป็นการกลายพันธุ์จาก GGT เป็น GAT ทางผู้วิจัยคิดว่า อุตการณ์ที่น้อยกว่าการวิจัยอื่น ๆ อาจสืบเนื่องมาจากจำนวนประชากรที่นำมาทำการศึกษาค่อนข้างน้อย และ อาจมีความแตกต่างกันในด้านของเชื้อชาติ คุณภาพของชิ้นเนื้อที่เก็บไว้จนเกินไปก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอส่งผลให้การตรวจมีความคลาดเคลื่อน โดยจะเห็นได้ว่า ระยะเวลาเก็บชิ้นเนื้อสำหรับ การตรวจการกลายพันธุ์ทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $P=0.026$ ซึ่งพบว่าในกลุ่มที่ตรวจสอบไม่พบการกลายพันธุ์นั้นมีค่ามัธยฐานที่น้อยกว่ากลุ่มที่ตรวจพบว่ามี การกลายพันธุ์ ปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการตรวจการกลายพันธุ์ได้แก่ ปริมาณในส่วนของเซลล์มะเร็ง อาจไม่เพียงพอทำให้ตรวจไม่พบในส่วนที่มีการกลายพันธุ์ แต่จากการทดสอบวิธีการตรวจการกลายพันธุ์หลาย วิธี พบว่า การตรวจด้วย วิธีไพโรซีควอนซึ่งเทคนิค นั้นสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ดีถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของเนื้อเยื่อมะเร็งในปริมาณ น้อยเพียง ร้อยละ 5 ก็ยังสามารถที่จะตรวจพบได้ [103] (โดยทั่วไปเป็นข้อแนะนำการตรวจการกลายพันธุ์ควรมีจำนวนของเซลล์มะเร็งอยู่มากกว่าร้อยละ 20-30 ระยะเวลาในการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อมะเร็งที่รอบกวนการตรวจแนะนำว่าประมาณ 2-3 ปี) [104] ซึ่งรายละเอียดข้อมูลอ้างอิงจากการตรวจการกลายพันธุ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นหลัก

จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตได้แก่ ระยะทางคลินิก (clinical staging) Histological grade การได้รับการผ่าตัดด้วยวิธี Whipple 's operation ซึ่งทั้ง 3 สิ่งเป็นการพยากรณ์โรคที่สำคัญโดยทั่วไปของมะเร็งตับอ่อน [44] สำหรับการกลายพันธุ์ของยีนเคราสนั้น การศึกษาต่างๆที่ผ่านมา มีทั้งที่มีข้อมูลของการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและไม่มีผล ทั้งนี้ทั้งนั้นการศึกษาดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังหรือการศึกษาที่มีจำนวนผู้ป่วยที่ค่อนข้างน้อยอาจไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ชัดเจน

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้มีแนวโน้มว่าการกลายพันธุ์ของเควาสยีนอาจเป็นสิ่งบ่งชี้ที่มีผลต่อการพยากรณ์ (Prognostic factor) ได้ในอนาคต

ตารางที่ 21 แสดงอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนเควาสและลักษณะของการกลายพันธุ์ในการศึกษาที่ผ่านมาต่างๆ

	จำนวน (N)	K-ras mutant(%)	ลักษณะของการกลายพันธุ์ Codon 12					Codon13
			GAT	GTT	CGT	TGT	GCT	
Almoguera (1988) [12]	22	21(95%)	-	-	-	-	-	-
Nagata (1990) [105]	38	35* (92%)	24 (65%)	9 (24%)	2 (5%)	1 (3%)	0	1 (3%)
Shibata(1990)[106]	36	20 (56%)	-	-	-	-	-	-
Ralph H. Hruban (1993) [1]	82		33 (49%)	24 (35%)	8 (12%)	3 (4%)	0	-
Robbert J. C (2000) [16]	61	46 (75%)	25 (54%)	14 (30%)	6 (13%)	1(2%)	0	-
Takanori (2004) [107]	28	28 (93%)	19 (67%)	9 (33%)	-	-	0	-
Jeeyun Lee (2007) [17]	65	31(49%)	19 (59%)	8 (25%)	3 (9%)	-	0	0
George Fountzilas(2008) [22]	34	17 (50%)	-	-	-	-	-	-
Current study	25	10/25 (40%)	7	-	--	-	3(30%)	-

8.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดคือเก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยได้น้อย เนื่องจากเป็นการเก็บรวบรวมข้อมูลในระยะเวลาที่จำกัด ข้อมูลที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับอ่อนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา เป็นผู้ป่วยใน เนื่องจากสามารถสืบหาข้อมูลของการวินิจฉัยจากผู้ป่วยในตาม ICD10 นั้นทำได้แน่นอนและสะดวกกว่าผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปัจจุบันยังไม่สามารถตรวจสอบย้อนหลังได้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเรื่องมะเร็งตับอ่อนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีจำนวนเท่าไร ซึ่งข้อมูลประชากรที่ได้ในการศึกษานี้อาจไม่แสดงถึงอุบัติการณ์ของมะเร็งตับอ่อนในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทั้งหมด

นอกจากนั้น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษาดังกล่าว โดยเพิ่มจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มให้มากขึ้นมีระบบเก็บฐานข้อมูลที่ดีขึ้นทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก ทำการศึกษาการศึกษาร่วมกันของโรงพยาบาลหลายแห่ง ทำการตรวจการกลายพันธุ์ในชิ้นเนื้อที่สามารถมีปริมาณของเซลล์มะเร็งเพียงพอเช่นหลังการผ่าตัดด้วยวิธี Whipple's operation ทำให้ไม่จำเป็นต้องเก็บรักษาชิ้นเนื้อที่นานเกินไปก่อนนำมาทำการตรวจการกลายพันธุ์ของเซลล์ยีน

รายการอ้างอิง

- [1] Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. **Am J Pathol** 1993;143:545-54.
- [2] Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer** 2003;3:459-65.
- [3] Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007;7:295-308.
- [4] K-ras slide set. 2009 [updated 1 Feb 2010; cited 2009 1 Nov]; Available from: www.K-ras-info.com.
- [5] Rosenberg JM, Welch JP, Macaulay WP. Cancer of the head of the pancreas: an institutional review with emphasis on surgical therapy. **J Surg Oncol** 1985;28:217-21.
- [6] Funovics JM, Karner J, Pratschner T, Fritsch A. Current trends in the management of carcinoma of the pancreatic head. **Hepatogastroenterology** 1989;36:450-5.
- [7] Singh SM, Longmire WP, Jr., Reber HA. Surgical palliation for pancreatic cancer. The UCLA experience. **Ann Surg** 1990;212:132-9.
- [8] Trede M, Schwall G, Saeger HD. Survival after pancreatoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. **Ann Surg** 1990;211:447-58.
- [9] Cameron JL, Crist DW, Sitzmann JV, Hruban RH, Boitnott JK, Seidler AJ, et al. Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. **Am J Surg** 1991;161:120-4; discussion 4-5.

- [10] Yeo CJ, Abrams RA, Grochow LB, Sohn TA, Ord SE, Hruban RH, et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. **Ann Surg** 1997;225:621-33; discussion 33-6.
- [11] Berger AC, Garcia M, Jr., Hoffman JP, Regine WF, Abrams RA, Safran H, et al. Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704. **J Clin Oncol** 2008;26:5918-22.
- [12] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell** 1988;53:549-54.
- [13] Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res** 1989;49:4682-9.
- [14] Barbacid M. ras genes. **Annu Rev Biochem** 1987;56:779-827.
- [15] Santos E, Nebreda AR. Structural and functional properties of ras proteins. **FASEB J** 1989;3:2151-63.
- [16] Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE, Holly EA, Brock JW, Zhang RH, et al. K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000;9:1223-32.
- [17] Lee J, Jang KT, Ki CS, Lim T, Park YS, Lim HY, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. **Cancer** 2007;109:1561-9.
- [18] Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, qi Chen X, Anker P, Alstead EM, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. **Clin Cancer Res** 1998;4:271-5.
- [19] Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-ras mutations in

- DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999;17:578-84.
- [20] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757-65.
- [21] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25:1960-6.
- [22] Fountzilas G, Bobos M, Kalogera-Fountzila A, Xiros N, Murray S, Linardou H, et al. Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation. *Cancer Invest* 2008;26:784-93.
- [23] Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, et al. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol* 2004;22:2610-6.
- [24] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43-66.
- [25] Birt DF, Stepan KR, Pour PM. Interaction of dietary fat and protein on pancreatic carcinogenesis in Syrian golden hamsters. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:355-60.
- [26] Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1510-6.
- [27] Mancuso TF, el-Attar AA. Cohort study of workers exposed to betanaphthylamine and benzidine. *J Occup Med* 1967;9:277-85.

- [28] Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. **N Engl J Med** 1993;328:1433-7.
- [29] Karlson BM, Ekblom A, Josefsson S, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Jr., Nyren O. The risk of pancreatic cancer following pancreatitis: an association due to confounding? **Gastroenterology** 1997;113:587-92.
- [30] Patel AV, Rodriguez C, Bernstein L, Chao A, Thun MJ, Calle EE. Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005;14:459-66.
- [31] Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, et al. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. **J Natl Cancer Inst** 1998;90:1710-9.
- [32] Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, et al. Familial pancreatic cancer: a review. **Semin Oncol** 1996;23:251-75.
- [33] Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. **N Engl J Med** 1995;333:975-7.
- [34] Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2003;95:214-21.
- [35] Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. **Biochim Biophys Acta** 2005;1756:97-101.
- [36] Ogawa Y, Tanaka M, Inoue K, Yamaguchi K, Chijiwa K, Mizumoto K, et al. A prospective pancreatographic study of the prevalence of pancreatic carcinoma in patients with diabetes mellitus. **Cancer** 2002;94:2344-9.
- [37] Fuhrman GM, Charnsangavej C, Abbruzzese JL, Cleary KR, Martin RG, Fenoglio

- CJ, et al. Thin-section contrast-enhanced computed tomography accurately predicts the resectability of malignant pancreatic neoplasms. **Am J Surg** 1994;167:104-11; discussion 11-3.
- [38] Talamonti MS, Small W, Jr., Mulcahy MF, Wayne JD, Attaluri V, Colletti LM, et al. A multi-institutional phase II trial of preoperative full-dose gemcitabine and concurrent radiation for patients with potentially resectable pancreatic carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2006;13:150-8.
- [39] Rosch T, Braig C, Gain T, Feuerbach S, Siewert JR, Schusdziarra V, et al. Staging of pancreatic and ampullary carcinoma by endoscopic ultrasonography. Comparison with conventional sonography, computed tomography, and angiography. **Gastroenterology** 1992;102:188-99.
- [40] Varadarajulu S, Wallace MB. Applications of endoscopic ultrasonography in pancreatic cancer. **Cancer Control** 2004;11:15-22.
- [41] Warshaw AL, Gu ZY, Wittenberg J, Waltman AC. Preoperative staging and assessment of resectability of pancreatic cancer. **Arch Surg** 1990;125:230-3.
- [42] Ferrone CR, Haas B, Tang L, Coit DG, Fong Y, Brennan MF, et al. The influence of positive peritoneal cytology on survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. **J Gastrointest Surg** 2006;10:1347-53.
- [43] Vincent T. DeVita Jr, Theodore S. Lawrence, Steven A. Roesenberg. **DeVita, Hellman, and Rosenberg' cancer :Principle of oncology** 8 ed. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins; 2008.
- [44] Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. **J Gastrointest Surg** 2000;4:567-79.
- [45] Takeuchi M, Kondo S, Sugiura H, Kato H. Pre-operative predictors of short-term survival after pancreatic cancer resection. **Hepatogastroenterology** 1998;45:2399-403.
- [46] Ozaki H, Hiraoka T, Mizumoto R, Matsuno S, Matsumoto Y, Nakayama T, et al.

- The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. **Surg Today** 1999;29:16-22.
- [47] Birk D, Fortnagel G, Formentini A, Beger HG. Small carcinoma of the pancreas. Factors of prognostic relevance. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 1998;5:450-4.
- [48] Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. **JAMA** 2007;297:267-77.
- [49] อติยา สิริสิงห. **optimal management in gastrointestinal oncology**. กรุงเทพฯ: มะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย; 2552.
- [50] Neoptolemos JP, Stocken DD, Tudur Smith C, Bassi C, Ghaneh P, Owen E, et al. Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials. **Br J Cancer** 2009;100:246-50.
- [51] Neoptolemos J, Büchler M, Stocken DD, Ghaneh P, Smith D, C. Bassi C. A multicenter, international, open-label, randomized, controlled phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid (5-FU/FA) versus gemcitabine (GEM) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma **J Clin Oncol** 2009;27:Abstract LBA4505.
- [52] Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Gastrointestinal Tumor Study Group. **Cancer** 1987;59:2006-10.
- [53] Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. **Ann Surg** 1999;230:776-82; discussion 82-4.

- [54] Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. **Lancet** 2001;358:1576-85.
- [55] Willett CG, Czito BG, Bendell JC, Ryan DP. Locally advanced pancreatic cancer. **J Clin Oncol** 2005;23:4538-44.
- [56] Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, O'Connell MJ, Reitemeier RJ, Rubin J, et al. Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. **Cancer** 1981;48:1705-10.
- [57] Klaassen DJ, MacIntyre JM, Catton GE, Engstrom PF, Moertel CG. Treatment of locally unresectable cancer of the stomach and pancreas: a randomized comparison of 5-fluorouracil alone with radiation plus concurrent and maintenance 5-fluorouracil--an Eastern Cooperative Oncology Group study. **J Clin Oncol** 1985;3:373-8.
- [58] Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. **J Clin Oncol** 1997;15:2403-13.
- [59] Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. **J Clin Oncol** 2009;27:5513-8.
- [60] Heinemann V, Hinke A, Bock S, editors. Benefit of gemcitabine-based combination treatment in advanced pancreatic cancer: a meta analysis of randomized trials. **Gastrointestinal Cancers Symposium**; 2007.
- [61] Cartwright TH, Cohn A, Varkey JA, Chen YM, Szatrowski TP, Cox JV, et al. Phase

- II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:160-4.
- [62] Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML, Hochster H, Mitchell E, et al. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009;27:3778-85.
- [63] Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, Biglietto M, Rabitti P, Uomo G, et al. Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale. *Cancer* 2002;94:902-10.
- [64] Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, editors. A double-blind placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine (G) plus bevicizumab (B) versus gemcitabine plus placebo (P) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (PC): A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 80303. *Gastrointestinal Cancers Symposium*; 2007.
- [65] Furukawa T, Sunamura M, Horii A. Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci* 2006;97:1-7.
- [66] Hruban RH, Maitra A, Schulick R, Laheru D, Herman J, Kern SE, et al. Emerging molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2008;2:S10-5.
- [67] Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8:27-32.
- [68] Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997;57:3126-30.

- [69] Wilentz RE, Su GH, Dai JL, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, et al. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation. **Am J Pathol** 2000;156:37-43.
- [70] Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. **Virchows Arch** 2001;439:798-802.
- [71] Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, et al. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. **Am J Pathol** 1993;142:1534-43.
- [72] Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. **Cancer Res** 1994;54:3025-33.
- [73] Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. **Science** 1996;271:350-3.
- [74] Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. **Cancer Res** 2000;60:2002-6.
- [75] Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996;93:3636-41.
- [76] Shi C, Eshleman SH, Jones D, Fukushima N, Hua L, Parker AR, et al. LigAmp for sensitive detection of single-nucleotide differences. **Nat Methods** 2004;1:141-7.
- [77] Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, et al. Analysis

- of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. **Gastroenterology** 1996;110:227-31.
- [78] Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. **Mol Carcinog** 1998;21:81-6.
- [79] Calhoun ES, Jones JB, Ashfaq R, Adsay V, Baker SJ, Valentine V, et al. BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. **Am J Pathol** 2003;163:1255-60.
- [80] Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, Brune K, de Andrade M, Goggins M, et al. The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007;16:342-6.
- [81] Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. **Cancer Res** 2002;62:3789-93.
- [82] Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, et al. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. **Am J Pathol** 1998;152:1501-7.
- [83] van der Heijden MS, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Fanconi anemia gene mutations in young-onset pancreatic cancer. **Cancer Res** 2003;63:2585-8.
- [84] Schumperli D, McFadden G, Wyler R, Dales S. Location of a new endonuclease restriction site associated with a temperature-sensitive mutation of vaccinia virus. **Virology** 1980;101:281-5.
- [85] Canto MI, Goggins M, Hruban RH, Petersen GM, Giardiello FM, Yeo C, et al.

- Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:766-81; quiz 665.
- [86] Ozcelik H, Schmocker B, Di Nicola N, Shi XH, Langer B, Moore M, et al. Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet* 1997;16:17-8.
- [87] Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:5360-4.
- [88] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913-7.
- [89] Lynch HT, Brand RE, Lynch JF, Fusaro RM, Smyrk TC, Goggins M, et al. Genetic counseling and testing for germline p16 mutations in two pancreatic cancer-prone families. *Gastroenterology* 2000;119:1756-60.
- [90] Lynch HT, Brand RE, Hogg D, Deters CA, Fusaro RM, Lynch JF, et al. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 2002;94:84-96.
- [91] Fusaro RM, Lynch HT. The FAMMM syndrome: epidemiology and surveillance strategies. *Cancer Invest* 2000;18:670-80.
- [92] Gorry MC, Gabbaizedeh D, Furey W, Gates LK, Jr., Preston RA, Aston CE, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1063-8.
- [93] Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Jr., Perrault J, et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:442-6.

- [94] Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. **N Engl J Med** 1987;316:1511-4.
- [95] Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2000;6:2969-72.
- [96] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977;74:5463-7.
- [97] Bains W, Smith GC. A novel method for nucleic acid sequence determination. **J Theor Biol** 1988;135:303-7.
- [98] Brenner S, Williams SR, Vermaas EH, Storck T, Moon K, McCollum C, et al. In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000;97:1665-70.
- [99] Chen DC, Saarela J, Nuotio I, Jokiaho A, Peltonen L, Palotie A. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. **J Mol Diagn** 2003;5:243-9.
- [100] Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat** 2002;19:479-85.
- [101] ยุทธนา เพ็งแจ่ม. ไพโรซีควนซิ่ง เทคโนโลยี. วารสารวิทยาศาสตร์และการประยุกต์: หลักการและการประยุกต์ 2551;16:91-7.
- [102] Lamb N. Pyrosequencing technology in Clinical Genetics Applications. 2010; Available from: www.pyrosequencing.com.
- [103] Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. **J Mol Diagn** 2005;7:413-21.
- [104] Whitehall V, Tran K, Umapathy A, Grieu F, Hewitt C, Evans TJ, et al. A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. **J Mol Diagn** 2009;11:543-52.

- [105] Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequent glycine-to aspartic acid mutations at codon 12 of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. **Jpn J Cancer Res** 1990;81:135-40.
- [106] Shibata D, Almoguera C, Forrester K, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove MM, et al. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas. **Cancer Res** 1990;50:1279-83.
- [107] Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O, et al. Detection of K ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. **J Gastroenterol** 2004;39:56-60.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (record form)

ID No.

Base line characteristics

สิทธิการรักษา ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ 30 บาท ประกันสังคม เงินสด

AGEyrs Birthdate.../...../.... Gender 1. male 2. female

Performance status 0 1 2 3 4Comorbidity DM HT Dyslipidemia CVD OtherDiabetes yes no

Time for diagnosis DMmonth

Smoking yes no if yes pack/yr.....History of Chronic pancreatitis yes noStage of disease 1. early 2. advanced or unresectable

TNM.....stage AJCC=.....

site of Invasion SMA SMV GDA IVC Aorta Celiac axisAdrenal MesocolonKidneyResectability resectable unresectable Metastasissite of metastasis liver peritoneum lungbonelymphnode noneclinical presentation : abdominal pain mass jaundicewt.loss loss of appetite asymptomatic S/S

Time of symptom presentation.....month

Primary tumor Location : head body tailComplication : 1. Obstructive jandice 2.perforation 3.infection4. Mixed5.gut obstructionDiagnosis by 1. FNA 2. tissue biopsyPrimary site LN Metastatic siteระบุ.....Procedure of diagnosis ERCP EUS FNA intervention Surgery

Histopathology collection date//.....//..... for diagnosis

Histology grade

- GX grade cannot be assessed G1 well differentiated
- G2 Moderately differentiated G3 Poorly differentiated
- G4 unidentified

Amylase NA

Surgery date..... Type of surgery

- curative Palliative.....

Prognosis factor :

1.1 mass size pathological 1. < 3 cms. 2. >3 cms.

1.2 Nodal status positive negative NA

1.3 margin : positive R1 R2
 negative
 NA

1.4 Post op CA 19-9 before 3 week after surgeryU/ml

1.5 Pre op CA19-9.....U/ml

K-ras part

1. K-ras mutation tissues yes no
2. Date of collect specimen//.....//.....
 i. Primary site LN metastatic site.....
3. Date for test specimen in tissue//.....//.....
4. K-ras mutation in serum yes no NA
5. Date for test specimens in serum//.....//.....
6. Status at serum collection Surgery preoperative post operative
7. Radiation yes concurrent sequential/palliative
 Dose.....Gy
 no
8. Chemotherapy yes no
 Adjuvant 1st 2nd 3rd
 Cycle of chemotherapy
 1ststart date..... end state.....
 2ndstart date..... end state.....
 3rd..... start date..... end state.....
 Type of chemotherapy 1st.....
 2nd

3rd.....

9. Palliative treatment

- Biliary obstruction yes no
biliary stent PTBD Open biliary enteric bypass
- Gastric outlet obstruction yes no gastrojejunostomy (surgery bypass) enteral stent
- Severe abdominal pain yes no celiac plexus block medical control
- Thromboembolic disease yes no

10. Previous treatment 1. surgery 2. chemotherapy 3. Combined treatment

11. Response best response 1. CR 2. PR 3. PD 4. SD (measurable lesion)

1. significantly improve 2. not improve (evaluable clinical disease)

Date of last follow up

12. Status last follow up Death alive recurrence

13. Time to progression/DF Adjuvant

1st mo

2nd mo

3rd mo

14. Overall survival mo. (since diagnosis)

Date of death

Date of diagnosis

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

เอกสารข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย

ผู้สนับสนุนการวิจัย วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพทย์ผู้ทำวิจัย ชื่อ วิทวัส จิตต์ผิวงาม

ที่อยู่ หอพักนิสิตแพทย์ 4240 รพ.จุฬา ถ.พระราม 4 แขวง ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 เบอร์โทรศัพท์ 081-6537725

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นมะเร็งตับอ่อน ที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา เนื่องจากมะเร็งตับอ่อนเป็นโรคซึ่งการพยากรณ์โรคไม่ดี ปัจจุบันมีความพยายามที่จะเข้าใจความผิดปกติซึ่งนำไปสู่การก่อมะเร็งตับอ่อนมากขึ้น ในรายงานต่างประเทศพบว่า มีการกลายพันธุ์หลายชนิดเกิดขึ้น ยีนที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ ยีนก่อมะเร็งเคราส ซึ่งมีความชุกร้อยละ 70-90 ในข้อมูลต่างประเทศ สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการกลายพันธุ์ดังกล่าวอย่างชัดเจน การศึกษานี้จึงต้องการทราบถึงการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยไทย

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน ในผู้ป่วยไทย จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย คือ 38 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ทางผู้วิจัยขอความร่วมมือในการตรวจชิ้นเนื้อเพิ่มเติมทางด้านารกลายพันธุ์ ร่วมกับทบทวนข้อมูลจากเวชระเบียนผู้ป่วยนอก รวมทั้งช่วงที่ทำการรักษา จะมีการเจาะเลือดประมาณ 5 ซีซี ก่อนและหลังการผ่าตัดเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ในเลือดร่วมด้วยโดยจะทำการขอเลือดของอาสาสมัครในช่วงที่ท่านเข้ารับบริการการตรวจเลือดเพื่อทำการรักษาหรือในช่วงที่ท่านได้รับการเจาะเลือดเพื่อให้ยาเคมีบำบัด

เลือดที่ได้จากผู้เข้าร่วมโครงการจะถูกเก็บแช่แข็งไว้เพื่อนำไปศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส เลือดที่เหลือหลังจากตรวจการกลายพันธุ์ แล้วทางผู้วิจัยมิได้เก็บไว้เพื่อศึกษาต่อแต่อย่างใด จะทำลายตามวิธีมาตรฐาน

จำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัย 38 ราย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

การเจาะเลือดจะทำในช่วงก่อนได้รับการผ่าตัด โดยจะพยายามขอเลือดในช่วงที่แพทย์มีการสัง่ตรวจเลือดของท่าน ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด _ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ

เลือดออก ซ้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ค่าใช้จ่ายสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

ค่าใช้จ่ายมีเกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโมเลกุล ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด ผู้สนับสนุนโครงการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด ทางผู้วิจัยไม่ได้สนับสนุนงบประมาณในด้านค่าเดินทางค่าเสียเวลาแก่ผู้เข้าร่วมวิจัย

แหล่งทุนวิจัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยมะเร็งวิทยาเป็นผู้สนับสนุนค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่ความเข้าใจการก่อมะเร็งและการพัฒนายาและการใช้ยาในอนาคต

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่านจากการ ลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยมีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้ตลอดเวลาแม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ นพ.วิทวัส จิตต์ผิงงาม หน่วยมะเร็งวิทยา รพ.จุฬา โทร 02-2564333 081-6320984

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อ

ประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
5. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
6. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ภาคผนวก ค

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อน ใน
ผู้ป่วยไทย

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ที่อยู่

..... โทรศัพท์.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่
..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลง
นาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ
ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา
ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะ
เกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอ
ในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็ม
ใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะ
ได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย (และจะได้รับการชดเชยจาก.....)

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้ง
เหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้า
จะพึงได้รับต่อไปผู้วิจัยรับรองว่า จะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้

เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจสอบและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบ ความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบ ข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้า ขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ ทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและ สามารถเลิกการให้สิทธิ ในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในเอกสารยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย

หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนาม

ข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความ
เต็มใจ

..... ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

..... ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

ศูนย์วิทยพัชการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

Performance status ใช้หลักเกณฑ์ตาม Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

ECOG PERFORMANCE STATUS*

Grade	ECOG
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed or chair
5	Dead

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายแพทย์วิวัฒน์ จิตต์ผิวงาม

วันเดือนปีเกิด 27 มกราคม พ.ศ.2520 จังหวัดสตูล

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิสิตคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์ 2537-2543

แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก 2543-2546

แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2546-2549

แพทย์รพ.มหาวิทยาลัยนเรศวร 2549-2552

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญอายุรศาสตร์

ศูนย์วิทยพัชร์พยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย