

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอมพิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจาย ของมะเร็งไปตับ
ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



นายชวลิต ชยขงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

SERUM AMPHIREGULIN IN COLORECTAL CARCINOMA AND THE CORRELATION WITH
LIVER METASTASIS IN KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Mr. Chawalit Chayangsu



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอมพิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจายของมะเร็งปอดในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
โดย	นายชวลิต ชยางศุ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไชยณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกียรติ รัชชรุ่งธรรม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ณัฐ พสุธารชาติ)

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

ชวลิต ชยางศุ : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอมฟิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. (SERUM AMPHIREGULIN IN COLORECTAL CARCINOMA AND THE CORRELATION WITH LIVER METASTASIS IN KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 40 หน้า.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของระดับแอมฟิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจายของมะเร็งลำไส้ใหญ่ไปตับ

วิธีดำเนินการ ประชากรที่ศึกษาคือ ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่มาเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2557 จำนวน 120 ราย โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด (ซีรัม) ก่อนเริ่มการรักษาหลักตามระยะของโรคมะเร็ง เพื่อนำไปตรวจหาระดับแอมฟิเรกูลิน (amphiregulin, AREG) ด้วยวิธี ELISA โดยรายงานผลเป็นหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์รวมกับข้อมูลทางคลินิกพยาธิวิทยาของผู้ป่วยแต่ละราย รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่ากลางตามกลุ่มระยะของโรคมะเร็งหาค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ด้วย ROC curve ในการแยกกลุ่มผู้ป่วยระยะต้นกับระยะแพร่กระจาย วิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและการแพร่กระจายไปยังตับ ระหว่างกลุ่มที่มีค่าแอมฟิเรกูลินสูงและต่ำ โดยกำหนดความสำคัญทางสถิติไว้ที่ $p=0.05$

ผลการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่เข้าการศึกษา 120 ราย แบ่งเป็นโรคระยะที่ 1-3 จำนวน 78 ราย (ร้อยละ 65.5) และโรคระยะที่ 4 หรือโรคกลับเป็นซ้ำ 41 ราย (ร้อยละ 34.5) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคระยะที่ 4 และผู้ป่วยที่โรคกลับเป็นซ้ำ จะมีค่ากลางของระดับแอมฟิเรกูลินเท่ากับ 31.55 pg/mL ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคระยะที่ 1-3 ที่มีค่าเท่ากับ 15.48 pg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.001$ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีระดับแอมฟิเรกูลินสูง (>25 pg/mL) และกลุ่มที่มีระดับแอมฟิเรกูลินต่ำ (≤ 25 pg/mL) พบว่ากลุ่มที่มีระดับแอมฟิเรกูลินสูง จะมีความสัมพันธ์กับการมีโรคแพร่กระจายไปยังตับและเยื่อผนังช่องท้อง ($p<0.001$) และสัมพันธ์กับปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดีได้แก่ การมี poor differentiated หรือ mucinous histological grade ($p=0.014$), M1 ($p=0.001$), lymphovascular invasion ($p=0.016$) และ perineural invasion ($p<0.001$)

สรุปผลการศึกษา ระดับแอมฟิเรกูลินในเลือด (ซีรัม) ที่สูงมากกว่า 25 pg/mL มีความสัมพันธ์กับการมีโรคแพร่กระจายไปตับและเยื่อผนังช่องท้อง นอกจากนี้ยังพบว่ามี ความสัมพันธ์กับปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

ภาควิชา อายุรศาสตร์ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

5574120730 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: AMPHIREGULIN / AREG / COLORECTAL CARCINOMA / COLORECTAL
CANCER / LIVER METASTASIS

CHAWALIT CHAYANGSU: SERUM AMPHIREGULIN IN COLORECTAL
CARCINOMA AND THE CORRELATION WITH LIVER METASTASIS IN KING
CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE
SRIURANPONG, M.D., 40 pp.

Background Amphiregulin (AREG) is one of the epidermal growth factor receptor (EGFR) ligands and play important roles in several tumor progression and metastasis. Upregulations of AREG in colonic carcinoma tissue have been shown to correlate with depth of tumor invasion, nerve invasion and liver metastasis. We sought to investigate a correlation of serum AREG in colorectal cancer with clinicopathological parameters and liver metastasis.

Methods Colorectal cancer patients who came to receive treatment at our institute during August 2013 to March 2014 were enrolled. We collected baseline serum prior to start any therapy and stored till analysis. Serum AREG was measured by ELISA using Human Amphiregulin DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN). The correlation between each independent clinicopathological characteristics and serum AREG was analysed.

Results There were 120 patients enrolled to current analysis which included 78 patients (65.5%) with stage I-III and 41 patients (34.5%) in advanced stage. In advanced disease group, the median level of serum AREG was 31.55 pg/mL, which was higher than those of the localized disease group 15.48 pg/mL, $p=0.001$. With correlation analyses, serum AREG higher than 25 pg/mL (high serum AREG) had significantly correlate with liver and peritoneal metastasis ($p<0.001$). Additionally, high serum AREG had significant correlation with more poor differentiated/mucinous histological grade ($p=0.014$), M1 ($p=0.001$), lymphovascular invasion ($p=0.016$) and perineural invasion ($p<0.001$).

Conclusion High serum AREG (>25 pg/mL) has correlation with liver and peritoneal metastasis and has a potential impact as a prognostic marker in colorectal carcinoma.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

— Advisor's Signature

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

1. รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ ข้อคิด และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยมาตลอด

2. อาจารย์นายแพทย์ สืบพงศ์ ธนสารวิมล หัวหน้าหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ ที่ช่วยติดต่อประสานงาน และขอความร่วมมือจากหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

3. รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ชูชีพ สหกิจรุ่งเรือง หัวหน้าหน่วยศัลยศาสตร์ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ภาควิชาศัลยศาสตร์ ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในแผนก

4. อาจารย์แพทย์หญิง ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัย

5. นางสาว ศกวรรณ พรทิพย์ปฏิมา พยาบาลงานวิจัย ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดและแจ้งรายละเอียดงานวิจัยให้แก่ผู้ป่วยในแผนก

6. นาย ธนธรณ์ มุลริยะ ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดและแจ้งรายละเอียดงานวิจัยให้แก่ผู้ป่วยนอกแผนก

7. นางสาว ศิริพร ขุนศรี ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ช่วยตรวจและวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการทั้งหมด

8. แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยาทุกท่าน

9. ผู้ป่วยทุกท่านที่อนุญาตให้ใช้ตัวอย่างเลือดในการวิจัย

10. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีอบเงินทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา พี่สาว และขอบคุณภรรยา ที่เป็นผู้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 คำถามการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.5 กรอบความคิดในการวิจัย	3
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
1.7 คำสำคัญ.....	4
1.8 ข้อยกเว้นของการวิจัย	4
1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.10 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.11 ปัญหาทางจริยธรรม	6
บทที่ 2 การปรับทัศนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 แอมพิเรกูลิน (Amphiregulin).....	7
2.2 บทบาทของแอมพิเรกูลินในมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
3.1 รูปแบบการวิจัย	10
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย	10
3.2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	10
3.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา.....	10

3.2.3 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา	11
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	11
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล	12
3.4.1 ชั้นเตรียมการ	12
3.4.2 ชั้นดำเนินการ	12
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	13
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	14
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	22
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	24
ข้อเสนอแนะ.....	24
รายการอ้างอิง	25
ตารางปฏิบัติงาน (Administration and time schedule).....	28
Case Record Form	29
Human Amphiregulin ELISA.....	32
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	40

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย (n=120).....	15
ตารางที่ 2 แสดงระดับ serum amphiregulin และ CEA ตามระยะของโรค.....	17
ตารางที่ 3 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของค่า cut-off serum AREG.....	18
ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกพยาธิวิทยา..... (clinicopathologic factors) กับระดับ serum amphiregulin	19
ตารางที่ 5 แสดงลักษณะโรคและตำแหน่งที่มะเร็งแพร่กระจาย (n=40).....	20
ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งที่มะเร็งแพร่กระจาย..... กับระดับของ serum amphiregulin	21

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงกรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework).....	3
รูปที่ 2 แสดงวิธีคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยอาศัยโปรแกรม Power and Sample Size.....	12
รูปที่ 3 ROC Curve for AREG cut-off level.....	17



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AREG	Amphiregulin
CEA	Carcinogenic embryonic antigen
CRC	Colorectal carcinoma
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IHC	Immunohistochemistry
LM-CRC	Liver metastasis colorectal cancer
LVI	Lymphovascular invasion
mL	millilitre
ng	nanogram
pg	picogram
PNI	Perineural invasion
TNM staging system	การจัดระยะของโรคมะเร็งตาม Tumor size, Node และ Metastasis

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกปีพ.ศ. 2551 โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลก ซึ่งนำหน้าโรคหัวใจและอุบัติเหตุ ประชากรประมาณ 7.6 ล้านคนต้องเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง หรือร้อยละ 13 ของผู้เสียชีวิตทั่วโลกจำนวน 58 ล้านคน โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตาย 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก และมะเร็งเต้านม[1, 2] สถิติของโรคมะเร็งในประเทศไทยนั้น จากข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติปี พ.ศ.2554 มะเร็งลำไส้ใหญ่พบมากเป็นอันดับที่สองในเพศชาย (ร้อยละ 21.5) และเป็นอันดับที่สามในเพศหญิง (ร้อยละ 10.4) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทยเช่นเดียวกัน[3]

เมื่อผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก พบว่าร้อยละ 50-60 จะอยู่ในระยะที่ 2 และ 3 (TNM stage II, III) และมากกว่าร้อยละ 20 จะอยู่ในระยะแพร่กระจาย (TNM stage IV) ซึ่งข้อมูลจากประเทศไทยพบว่ามีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน[4] โดยตำแหน่งที่มะเร็งมักแพร่กระจายไปมากที่สุดคือ ตับ (ร้อยละ 30-40) อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีโดยรวม คิดเป็นร้อยละ 65 แต่เมื่อผู้ป่วยอยู่ในระยะแพร่กระจาย อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีจะลดเหลือเพียงร้อยละ 11[2] อย่างไรก็ตาม การผ่าตัดตัดตับในระยะแพร่กระจายมีโอกาสทำให้ชีวิตของผู้ป่วยยืนยาวขึ้นได้[5] ในทางปฏิบัตินิยมการทำ CT scan หรือ MRI เพื่อช่วยวินิจฉัยการแพร่กระจายไปยังตับของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ระยะหลังได้มีความพยายามในการหา biomarkers อื่นๆทั้งจากในซีรัม, พลาสมา หรือชิ้นเนื้อ (tissue) เพื่อช่วยพยากรณ์การแพร่กระจายไปยังตับ โดยหวังว่า biomarkers เหล่านี้ อาจเป็นปัจจัยช่วยในการเลือกการรักษา (predictive factor) ปัจจัยช่วยในการพยากรณ์โรค (prognostic factor) หรือนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ในการผลิตยารักษา (targeted therapy) ต่อไป

แอมไฟเรกูลิน (amphiregulin, AREG) เป็นหนึ่งใน epidermal growth factor (EGF) ligands ซึ่งมีบทบาทในการเกิดมะเร็งในคน AREG จะชักนำให้เกิด tyrosine phosphorylation ของ EGF receptor (EGFR) และส่งผลให้เกิด tumor proliferation, invasion, migration และ angiogenesis[6] ตามมา ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้น พบว่ามี AREG overexpression มากกว่าร้อยละ 50[7] และมีบางการศึกษาได้ยืนยันถึงบทบาทของ AREG ว่าเป็น prognostic factor ของ

การแพร่กระจายไปตบในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่ส่วนใหญ่ที่ผ่านมาจะเป็นการศึกษาที่ทำจากชิ้นเนื้อ (tissue)[8] เพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาว่าระดับ AREG จากซีรัม มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตบ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักหรือไม่ เพื่อเป็นองค์ความรู้ใหม่ในการศึกษาลำดับถัดไป

1.2 คำถามการวิจัย

คำถามหลัก

ระดับแอมพิเรกูลินในเลือดสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตบ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

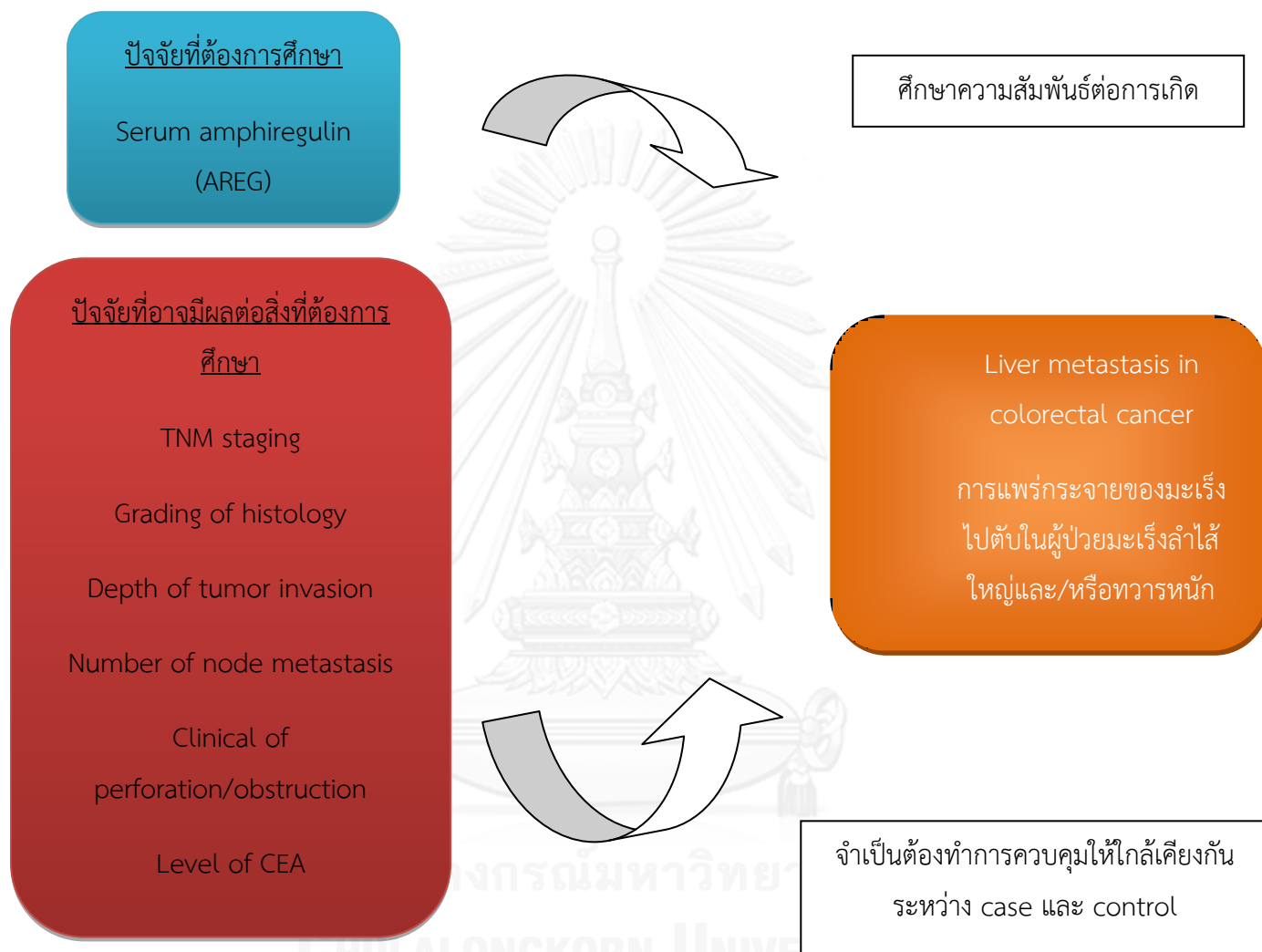
1. เพื่อหาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตบ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. เพื่อหาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่ได้รับการผ่าตัดและรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

Ho: ระดับแอมพิเรกูลินในเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตบ ในผู้ป่วย โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

Ha: ระดับแอมพิเรกูลินในเลือดมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตบ ในผู้ป่วย โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

1.5 กรอบความคิดในการวิจัย



รูปที่ 1 แสดงกรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ป่วยทุกคนที่เข้าร่วมโครงการวิจัยต้องมีผลชิ้นเนื้อ (pathology report) ยืนยันว่าเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักชนิด adenocarcinoma และลงลายมือชื่อให้ความยินยอมก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัย

1.7 คำสำคัญ

Amphiregulin
AREG
Colorectal Carcinoma
Colorectal Cancer
Liver metastasis

1.8 ข้อยกเว้นของการวิจัย

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่มีการแพร่กระจายไปตับ จัดเป็นระยะโรคที่ 4 ซึ่งอาจมีการดำเนินโรคที่แตกต่างจากผู้ป่วยที่ยังไม่มีโรคแพร่กระจาย ทำให้การวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการพยากรณ์โรคอาจได้ผลที่คลาดเคลื่อนได้

การตรวจระดับแอมไฟเรกูลินในเลือดเพื่อความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตับนั้น ยังไม่เคยมีการศึกษาขนาดใหญ่มาก่อน ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อจำกัดในบางเรื่องที่ยังไม่เคยพบข้อมูลได้

1.9 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Colorectal carcinoma (CRC) : มะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก
- Liver metastasis colorectal cancer (LM-CRC) : มะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ
- Synchronous liver metastasis : การแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ ณ เวลาเดียวกับที่วินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก
- Metachronous liver metastasis : การแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ ที่เกิดขึ้นภายหลังจากผู้ป่วยได้รับการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักไปแล้ว
- Simultaneous operation : การผ่าตัดพร้อมกันของ CRC และ LM-CRC ในรายที่เป็น synchronous liver metastasis
- Portal vein embolization (PVE) : การอุดหลอดเลือดดำพอร์ทัลที่เลี้ยงตับ เพื่อเพิ่มปริมาณเนื้อตับกลับตรงข้ามให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ป้องกันภาวะตับวาย (hepatic failure) หลังการผ่าตัดตัด

- Two-stage hepatectomy : การผ่าตัดเนื้องอกตัด 2 ครั้ง แบ่งเป็น
 - Without PVE : ทำกรณีไม่สามารถตัดเนื้องอกออกได้หมดในครั้งแรก
 - With PVE : ทำในกรณีมีก้อนเนื้องอกจำนวนมากหลายก้อนและอยู่ในตับทั้งสองกลีบ โดยจะตัดเนื้องอกกลีบที่ไม่ได้อุดหลอดเลือดก่อน แล้วจึงอุดหลอดเลือดกลีบตรงข้าม รอให้กลีบตับที่ตัดเนื้องอกออกแล้วโตขึ้น จึงไปทำการผ่าตัดเนื้องอกตัดในกลีบที่อุดเส้นเลือดไว้
- Unresectable : ศัลยแพทย์ประเมินว่าไม่สามารถผ่าตัดเนื้องอกตัดเพื่อให้ผลการรักษาที่ดีที่สุดได้
- Potentially resectable : ศัลยแพทย์ประเมินว่าอาจผ่าตัดเนื้องอกตัดเพื่อให้ผลการรักษาที่ดีที่สุดได้ แต่อาจต้องการการรักษาอื่นก่อนเช่น การให้ยาเคมีบำบัด เพื่อลดขนาดของเนื้องอก
- Right lobectomy : การผ่าตัดตับกลีบขวา (segment 5, 6, 7, 8) หรือ lateral ต่o middle hepatic vein
- Left lobectomy : การผ่าตัดตับกลีบซ้าย (segment 1, 2, 3, 4) หรือ medial ต่o middle hepatic vein
- Segmental resection : การผ่าตัดตามกายวิภาคของแต่ละ segment ของตับ
- Wedge resection : การผ่าตัดเนื้อตับตามขนาดของเนื้องอกเพื่อให้ได้ free margin
- Neoadjuvant chemotherapy : การให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดก่อนทำการผ่าตัด
- Adjuvant chemotherapy : การให้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดหลังทำการผ่าตัด เพื่อหวังทำลาย micrometastasis
- Palliative chemotherapy : การให้ยาเคมีบำบัดรักษาเพื่อหวังผลในการเพิ่มอัตราการอยู่รอด ลดขนาดของโรค รวมถึงเพิ่มคุณภาพชีวิต ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดจากโรคได้
- Pathological complete remission (pCR) : ไม่พบรอยโรคโดยการตรวจทางพยาธิวิทยา
- Complete remission (CR) : ไม่พบรอยโรคโดยการตรวจทางคลินิก และทางรังสีวิทยา
- Partial response (PR) : มีการลดลงของผลรวมของขนาดก้อนที่วัดได้มากกว่าร้อยละ 30
- Progressive disease (PD) : มีการเพิ่มขึ้นของผลรวมของขนาดก้อนที่วัดได้มากกว่าร้อยละ 20 หรือตรวจพบรอยโรคใหม่ (new lesion)
- Stable disease (SD) : การเปลี่ยนแปลงผลรวมของขนาดก้อนที่วัดได้นอกเหนือค่าจำกัดความของ PR และ PD

1.10 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบวาระดับแอมพิเรกูลินในเลือด อาจมีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก
2. ทำให้ทราบวาระดับแอมพิเรกูลินในเลือด อาจมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่ได้รับการผ่าตัดและรักษาด้วยวิธีมาตรฐานครบแล้ว
3. ระดับแอมพิเรกูลินในเลือด อาจใช้เป็นตัวติดตามโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักในอนาคต นอกเหนือไปจากการตรวจค่า CEA
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาระดับแอมพิเรกูลินในเลือดต่อไปในอนาคต

1.11 ปัญหาทางจริยธรรม

1. หลักความเคารพในบุคคล: ผู้เข้าร่วมโครงการจะได้รับข้อมูลรายละเอียดวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยและระเบียบวิธีการศึกษา รวมทั้งได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ได้รับและความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น และให้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการ ผู้ร่วมโครงการสามารถขอถอนตัวเมื่อไรก็ได้ โดยไม่ได้รับผลกระทบใดๆ
2. หลักการให้ประโยชน์และไม่ทำให้เกิดอันตราย: ข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคและวางแผนการรักษาของผู้เข้าร่วมโครงการ อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในผู้ป่วยรายอื่นๆต่อไป และการเก็บข้อมูลโดยใช้เครื่องมือที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้เข้าร่วมโครงการ
3. หลักความยุติธรรม: ผู้เข้าร่วมโครงการทุกท่านมีสิทธิ ที่ได้รับการปฏิบัติอย่างเท่าเทียมกัน และข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะเก็บเป็นความลับ โดยจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับความยินยอมจากผู้เข้าร่วมโครงการแล้วเท่านั้น

บทที่ 2

การปรับวัฏจักรชีวิตที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอมฟิเรกูลิน (Amphiregulin)

แอมฟิเรกูลิน (amphiregulin, AREG) เป็น transmembrane glycoprotein ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปีค.ศ. 1988 โดย Shoyab และคณะ ซึ่งสกัดแยกออกมาได้จาก cell line ของ human breast cancer (MCF-7) AREG ประกอบด้วย 252 amino acids มีสอง soluble form หลักคือ 78 และ 84 amino acids[9] ถูกจัดเป็นหนึ่งใน epidermal growth factor (EGF) อันได้แก่ epiregulin (EREG), transforming growth factor (TGF- α), heparin binding (HB-EGF), betacellulin และ heregulin เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้จะเป็นตัวควบคุม biological functions ต่างๆ ของ epithelial cell และ mesenchymal cell โดยไปจับกับตัวรับ EGF (EGF receptors, EGFRs)[10]

การเกิดโรคมะเร็งของมนุษย์ EGF มีส่วนร่วมในการเกิด tumor proliferation, migration, invasion และ angiogenesis[11] โดยเมื่อจับกับตัวรับ (EGFRs) แล้วจะเหนี่ยวนำให้เกิด tyrosine phosphorylation มีการส่งสัญญาณต่อไปเป็นทอดๆ (downstream signaling) เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อให้เกิดกระบวนการข้างต้น จนผลสุดท้ายกลายเป็นโรคมะเร็ง

ชื่อของ amphiregulin นั้นได้มาจากการที่มีคุณสมบัติได้ทั้งกระตุ้น (positive) หรือยับยั้ง (negative) cell proliferation ตามแต่ชนิดของเซลล์ เซลล์ที่ AREG กระตุ้นการเติบโตและเพิ่มจำนวนได้แก่ normal mammary epithelial cells, neoplastic mammary epithelial cells, fibroblasts, และ keratinocytes เป็นต้น จากการศึกษา in vitro ที่ผ่านมามีพบว่า AREG ทำหน้าที่ drive proliferation ของ malignant cells ในลักษณะของ autocrine[12]

การศึกษา in vivo พบว่าส่วนใหญ่ของมะเร็งลำไส้ใหญ่, ภาวะอาหาร, เต้านม หรือตับอ่อน จะมี AREG overexpression และระดับ AREG ที่สูงนั้นมีความสัมพันธ์กับ tumor progression และ poor survival[13]

2.2 บทบาทของแอมฟีเรกูลินในมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

การศึกษาระหว่าง AREG กับมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก (colorectal cancer, CRC) มีอยู่หลายการศึกษา และในหลายแง่มุม [14] [15] เมื่อปีพ.ศ. 2534 Ciardiello และคณะ[7] ได้ทำการตรวจ AREG, cripto (CR-1) และ EGFR-3 (HER3) ในชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ (ทั้ง primary และ liver metastasis) กับชิ้นเนื้อลำไส้ใหญ่และตับที่ปกติ พบว่ามีการแสดงออกของ AREG และ cripto ในชิ้นเนื้อมะเร็งลำไส้ใหญ่ทั้ง primary และ liver metastasis มากกว่าชิ้นเนื้อปกติ จากการศึกษาพบว่า cripto และ AREG น่าจะมีบทบาทต่อพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ รวมถึงอาจเป็น markers ที่สำคัญในการทำนาย distant metastasis โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน liver metastasis

การศึกษาของ Yamada และคณะ[8] ในปีพ.ศ.2551 ได้ทำการตรวจระดับโปรตีน AREG, EGFR และ HER2 ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วย CRC โดยตรวจใน primary tissue จำนวน 106 ตัวอย่าง และตรวจชิ้นเนื้อที่แพร่กระจายไปตับอีก 16 ตัวอย่าง วิธีการตรวจใช้เทคนิค immunohistochemistry (IHC) พบว่าชิ้นเนื้อที่แพร่กระจายไปตับ 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 81.6%) มีการติดสีของ AREG และเมื่อนำมาวิเคราะห์ multivariate analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีนแต่ละชนิดกับปัจจัยทางพยาธิคลินิก (clinicopathologic factors) พบว่ามีเพียงระดับโปรตีน AREG เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์ในการเกิดการแพร่กระจายไปตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.00296$) จากการศึกษาทำให้ AREG อาจมีบทบาทในการเป็น predictive marker ที่สำคัญของการแพร่กระจายไปตับ (liver metastasis) ใน CRC

ในปีพ.ศ.2553 มีการศึกษาของ Watanabe และคณะ[16] ซึ่งทำการศึกษาเพื่อหา predictive marker ในการเกิด liver metastasis หลังจากผู้ป่วย CRC ได้รับการผ่าตัดที่ primary lesion ไปแล้ว โดยได้พัฒนาการตรวจยีนเฉพาะ 10 ยีน (10-gene signature) ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดการแพร่กระจายไปตับ การศึกษานี้ได้ใช้เนื้อเยื่อทั้งสิ้น 189 ตัวอย่าง จาก primary lesion ของ CRC มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี microarray และ quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดย 160 ตัวอย่างใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ gene expression กับการกลับมาเป็นซ้ำของโรค (liver metastasis) พบว่ามี 14 genes ที่มีความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยทางคณะวิจัยได้เลือก 10 genes มาสร้างเป็น model ในการทำนายการเกิด liver metastasis และมาทดสอบกับเนื้อเยื่ออีก 29 ตัวอย่าง ซึ่ง AREG เป็นหนึ่งใน 10 genes นั้น ผลพบว่า model ดังกล่าวสามารถทำนายด้วยความเที่ยงตรงถึง 86.2% (predictive accuracy)

การตรวจวัด AREG สามารถตรวจได้ทั้งในเนื้อเยื่อและซีรัม (serum) จากการศึกษาของ Li และคณะ[11] ในปีพ.ศ.2553 ซึ่งต้องการศึกษาถึงความสำคัญทางคลินิกของ AREG ต่อ CRC คณะวิจัยได้ทำการตรวจ serum AREG โดยวิธี ELISA และตรวจระดับ AREG ใน tissues โดยวิธี IHC ในผู้ป่วย 73 ราย พบว่า AREG ทั้งใน serum และ tissues มีความสัมพันธ์กับ CRC หลายปัจจัย ได้แก่ depth of tumor invasion, distant metastasis, nerve invasion และ vascular invasion

Serum AREG สัมพันธ์กับ vascular invasion ซึ่ง vascular invasion เป็นหนึ่งในปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis) คณะวิจัยจึงเห็นว่า serum AREG อาจเป็นปัจจัยที่ใช้พยากรณ์โรคได้ในส่วนการตรวจ IHC ของ tissues นั้นพบว่า AREG สัมพันธ์กับ depth of tumor invasion, distant metastasis และ nerve invasion การที่ผลของ serum และ IHC ของ tissues นั้นไม่ไปด้วยกัน อาจเป็นจากข้อจำกัดทางขนาดตัวอย่าง และเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

ในปีพ.ศ.2555 Ohchi และคณะ[17] ได้รายงานผลการตรวจ AREG ใน tissues ด้วยวิธี IHC โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วย CRC ที่ได้รับการผ่าตัดทั้งหมด 174 ราย และตามผู้ป่วยไป 80 เดือน (median follow up) พบว่าการมี AREG ในชิ้นเนื้อ primary colorectal tumor สัมพันธ์กับ overall survival (OS) และ relapse free survival (RFS) ที่น้อยกว่า คณะวิจัยจึงสรุปว่า AREG อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึง prognosis และการกลับเป็นซ้ำของโรคได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อควรระมัดระวัง 2 อย่าง ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างไม่สมดุลกัน คือมี amphiregulin-positive สูงถึงร้อยละ 90 และจำนวนของการเกิด OS และ RFS ยังน้อยจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาที่ขนาดตัวอย่างมากขึ้นและติดตามนานพอเพื่อยืนยันผลดังกล่าว

และการศึกษาล่าสุดในปีพ.ศ.2555 ทำโดย Kuramochi และคณะ[18] ศึกษาในผู้ป่วย CRC ที่มี liver metastasis (synchronous หรือ metachronous) ได้ตรวจ AREG mRNA ในชิ้นเนื้อทั้ง primary colorectal tumor และ liver metastases ผลพบว่า ไม่มีความแตกต่างของระดับ AREG ในชิ้นเนื้อทั้งสองตำแหน่ง AREG expression นั้นไม่สัมพันธ์กับสถานะของ KRAS และไม่ว่าค่าสูงหรือต่ำก็ไม่ได้สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิต

ดังนั้นจากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันอาจบอกได้ว่า AREG เป็นตัวบ่งชี้ที่บอก poor prognosis และ การเกิด liver metastasis ของ CRC แต่ยังไม่มีการศึกษาที่เป็น RCT และขนาดตัวอย่างมากพอ รวมถึงข้อมูลที่ทำใน serum AREG ยังมีน้อย จึงเป็นที่มาของการทำการศึกษานี้ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอมฟิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจายของมะเร็งไปตับ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแอมพิเรกูลินในเลือดกับการแพร่กระจายของมะเร็ง
ไปตับ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักแบบ case-control study และวิจัยเชิง
สหสัมพันธ์ (correlation) โดยกลุ่มที่ศึกษา (case) คือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวาร
หนักที่มีการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง ส่วนกลุ่มควบคุม (control) คือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้
ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่ไม่มีการแพร่กระจายของโรค

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก ทั้งที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย
ของโรคมะเร็งและที่มีการแพร่กระจายแล้ว ซึ่งมาเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่าง
เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 – มีนาคม พ.ศ. 2557

3.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา

1. ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก โดยยืนยันการวินิจฉัยทาง
พยาธิวิทยาว่าเป็นเนื้องอกชนิด adenocarcinoma
2. อายุตั้งแต่ 15 ปีบริบูรณ์ขึ้นไป
3. กรณีที่มีการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง ให้ใช้เกณฑ์วินิจฉัยได้จากการตรวจทางรังสี
วิทยา หรือทางพยาธิวิทยา และแพทย์ผู้ดูแลลงความเห็นว่าเป็นการแพร่กระจาย
ของมะเร็ง
4. ไม่เคยได้รับการรักษาจำเพาะของมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักมาก่อนเข้า
การศึกษา ไม่ว่าจะเป็นการผ่าตัด การฉายรังสีรักษา หรือยาเคมีบำบัด รวมถึงยา
สมุนไพร หรือยาอื่นใดที่ใช้เพื่อจุดประสงค์ในการรักษาโรคมะเร็ง

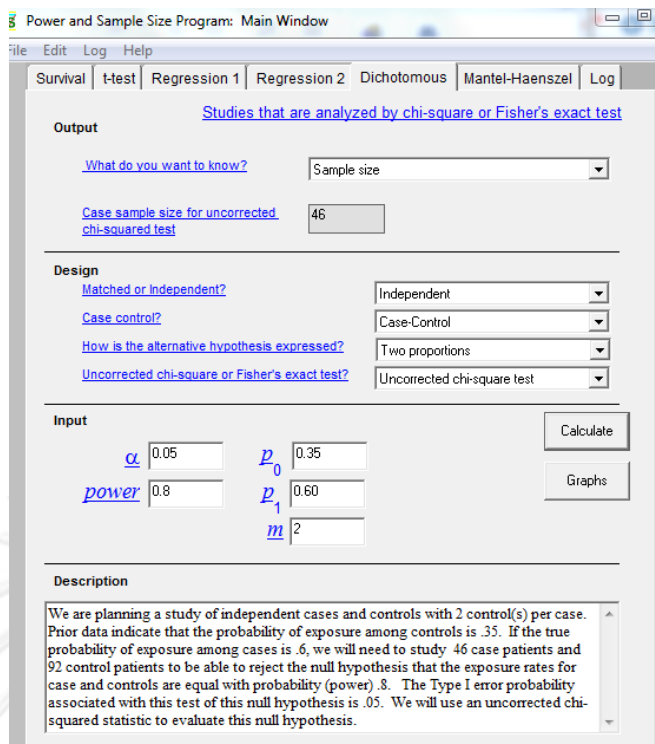
3.2.3 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา

1. เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นๆภายใน 5 ปีก่อนเข้ารับการศึกษา
2. ตรวจพบว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นๆร่วมด้วย พร้อมกับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก
3. ผู้ป่วยหรือญาติไม่ยินยอมเข้าการศึกษา

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากค่า cut-off ของ serum amphiregulin (AREG) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่กระจายไปตับ ยังไม่เคยมีการศึกษาใดทำมาก่อน ข้อมูลที่มีในปัจจุบันทำในโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (advanced non-small cell lung cancer) พบว่ามีค่ากลางอยู่ที่ 9.5 pg/mL[19] อีกการศึกษาหนึ่งทำในผู้หญิงที่สุขภาพแข็งแรงดี ไม่มีโรคมะเร็ง จำนวน 85 ราย พบว่า 54 ราย (64%) มีค่าต่ำกว่า 20 pg/mL[20] และพบว่าชุดการตรวจ serum AREG ที่มีในห้องตลาดจะมีค่า sensitivity อยู่ระหว่าง 10-20 pg/mL ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่า cut-off ที่ 20 pg/mL คือถ้ามีค่ามากกว่า 20 pg/mL ขึ้นไปจะถือว่าเป็น high serum AREG หรืออาจใช้ค่า cut-off ตาม ROC curve

หลักการเบื้องต้นคิดว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่มีการแพร่กระจายของโรคแล้วจะมีสัดส่วน high serum AREG มากกว่ากลุ่มที่ยังไม่มีการแพร่กระจายของโรคน้อย 25% และในกลุ่มที่ยังไม่มีการแพร่กระจายนั้น ประมาณสัดส่วน high serum AREG อยู่ที่ 35% เมื่อนำไปคำนวณขนาดตัวอย่างโดยอาศัยโปรแกรม Power and Sample Size (PS) (รูปที่ 2) พบว่าต้องการผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจายของโรคจำนวน 46 ราย และที่ยังไม่มีการแพร่กระจายของโรค 92 ราย เพื่อพิสูจน์ความแตกต่างดังกล่าวข้างต้น ($\alpha = 0.05$ และ power 80%)



รูปที่ 2 แสดงวิธีคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยอาศัยโปรแกรม Power and Sample Size

(Dupont WD, Plummer WD: 'Power and Sample Size Calculations for studies Involving Linear Regression', Controlled Clinical Trials 1998; 19:589-601.)

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 ชั้นเตรียมการ

1. ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่มีการแพร่กระจายไปตับ, ปัจจัยที่ได้รับการศึกษาในด้านการพยากรณ์โรค, ปัจจัยในการเกิดโรคแพร่กระจายและแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักตามมาตรฐานปัจจุบัน
2. เสนอโครงการงานวิจัย และขอความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

3.4.2 ชั้นดำเนินการ

1. เริ่มเก็บรวบรวมรายชื่อผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักรายใหม่ ซึ่งมารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 จนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2557
2. เก็บข้อมูลจากทั้งเวชระเบียนผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน และจากตัวผู้ป่วย โดยผู้ดำเนินการวิจัยบันทึกลงในแบบบันทึก (case record form) ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐาน

ของผู้ป่วย, อาการและอาการแสดง, ลักษณะของโรค, ตำแหน่งตัวโรค และตำแหน่งการแพร่กระจาย, ข้อมูลทางรังสีวินิจฉัย, การรักษาที่ได้รับ และมีการเจาะเลือดเพื่อตรวจระดับแอมไฟเรกูลินปริมาณ 10 มิลลิกรัม ก่อนเริ่มการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก (จำนวน 1 ครั้ง)

หมายเหตุ การตรวจ serum amphiregulin อาศัยเทคนิค antibody sandwich ELISA

3. ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจะถูกรับบันทึกโดยปกปิดชื่อ-สกุล และจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์โดยใช้ record number และมีรหัสการเข้าสู่ข้อมูลโดยผู้บันทึกเท่านั้น

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม SPSS version 16.0 แสดงข้อมูลเป็นกราฟและตารางโดย

- Baseline characteristics: frequency, proportion (percentage), mean/median และเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มโดยใช้ unpaired t-test หรือ Chi-square
- Primary end point: วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระดับแอมไฟเรกูลินในเลือดของทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ unpaired t-test หรือ Mann-Whitney U test และ correlation

บทที่ 4 ผลการศึกษา

ในช่วงระยะเวลาที่คัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษาตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2556 ถึง 1 มีนาคม พ.ศ. 2557 มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่เข้าเกณฑ์การศึกษานี้ จำนวนทั้งสิ้น 120 ราย เป็นเพศชาย 64 ราย (ร้อยละ 53.3) และเพศหญิง 56 ราย (ร้อยละ 46.7) โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 64 ปี ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยที่สุดและมากที่สุดในการศึกษาเท่ากับ 16 ปี และ 88 ปี ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 97) มีสภาพร่างกาย (performance status, PS) อยู่ในระดับ 0-1 ตามเกณฑ์ของ ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ส่วนอาการแสดงที่นำมาสู่การวินิจฉัยโรค 3 อันดับแรกได้แก่ lower gastrointestinal bleeding, LGIB (ร้อยละ 32.4), bowel habit change (ร้อยละ 22.9) และ abdominal pain (ร้อยละ 18.1)

สำหรับตำแหน่งของมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบเป็นที่ส่วนของ colon (cecum ถึง rectosigmoid) 64 ราย (ร้อยละ 54.7) และ rectum (upper ถึง lower part) 53 ราย (ร้อยละ 45.3) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 94.9) มี well หรือ moderate differentiated histological grade ในแง่ระยะของโรคมะเร็งตาม TNM staging system พบว่าสองในสามหรือร้อยละ 65.5 อยู่ในระยะที่ 1-3 (localized disease) ส่วนระยะที่ 4 และ recurrent disease (advanced disease) พบร้อยละ 34.5

ลักษณะข้อมูลพื้นฐานอื่นๆ ได้แก่ depth of tumor invasion, nodal status, lymphovascular invasion และ perineural invasion ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก (n=120)

Age, mean (range), years	63.94 (16-88)
Characteristics	Patients (valid %)
Gender	
Male	64 (53.3%)
Female	56 (46.7%)
Clinical presentation	
LGIB	34 (32.4%)
Bowel habit change	24 (22.9%)
Abdominal pain	19 (18.1%)
Anemia	6 (5.7%)
Gut obstruction	7 (6.7%)
Screening	14 (13.3%)
Other	1 (1%)
Unknown	105
Histological grade	
Well/moderate	93 (94.9%)
Poor/mucinous	5 (5.1%)
Unknown	22
Site	
Colon	64 (54.7%)
Rectum	53 (45.3%)
Unknown	3
Depth of tumor invasion	
pT ₁ -pT ₃	72 (82.8%)
pT ₄	15 (17.2%)
Unknown	33
Lymph nodes	
pN ₀	49 (57%)
pN ₁₋₂	37 (43.0%)
Unknown	34
Metastases	
M ₀	79 (66.4%)
M ₁	40 (33.6%)

Unknown	1
Lymphovascular invasion (LVI)	
Positive	45 (54.9%)
Negative	37 (45.1%)
Unknown	38
Perineural invasion (PNI)	
Positive	32 (39.0%)
Negative	50 (61.0%)
Unknown	38
Stage	
I	16 (13.4%)
II	35 (29.4%)
III	27 (22.7%)
IV	29 (24.4%)
Recurrent	12 (10.1%)
Unknown	1

จากตารางที่ 2 พบว่าค่ากลางของ serum amphiregulin ในผู้ป่วยกลุ่ม localized disease และ กลุ่ม advanced disease เท่ากับ 15.48 pg/mL และ 31.55 pg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p=0.001$ ในส่วนค่ากลางของ serum CEA (ซึ่งมีข้อมูลในการศึกษานี้ 97 ราย) พบว่า กลุ่ม advanced disease มีค่าสูงกว่ากลุ่ม localized disease อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันที่ $p<0.001$

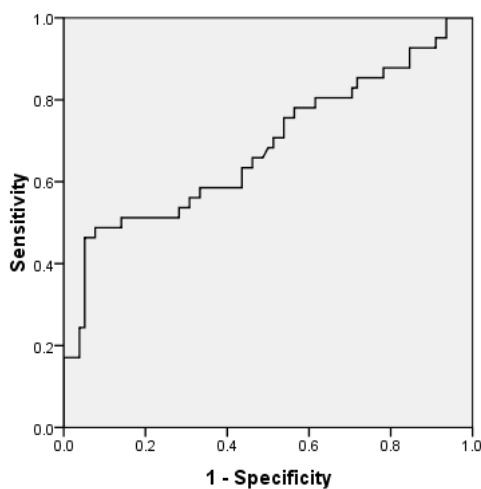
ตารางที่ 2 แสดงระดับ serum amphiregulin และ CEA ตามระยะของโรค

	Localized (Stage I-III)	Advanced (Stage IV/Recurrent)
AREG (pg/mL)		
N	78	41
Mean \pm S.D.	23.11 \pm 31.87	91.27 \pm 131.72
Median (IQ1,IQ3)	15.48 (8.84,22.92)	31.55 (13.84,98.91)
$p = 0.001^*$		
CEA (ng/mL)		
N	58	39
Mean \pm S.D.	32.88 \pm 133.09	303.20 \pm 663.96
Median (IQ1,IQ3)	3.93 (2.14,10.53)	72.90 (16.69,161.10)
$p < 0.001^*$		

*Mann-Whitney U test AREG = Amphiregulin CEA = Carcinoembryonic Antigen

ในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้ใช้ ROC curve (รูปที่ 3) เพื่อที่จะหาค่า cut-off ของระดับ AREG ในการบอกว่าเป็น localized (TNM stage I-III) หรือ advanced disease (TNM stage IV และ recurrent disease) พบว่าเมื่อเลือกค่า AREG ที่มากกว่า 25 pg/mL (high AREG group) และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 pg/mL (low AREG group) จะได้ sensitivity 51.2% และ specificity 76.9% (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมกับการศึกษานี้

รูปที่ 3 ROC Curve for AREG cut-off level



Diagonal segments are produced by ties.

ตารางที่ 3 แสดงค่า sensitivity และ specificity ของค่า cut-off serum AREG ที่ระดับ 10-25 pg/mL

Cut-off serum AREG (pg/mL)	Sensitivity	Specificity
10	82.9%	28.2%
15	70.7%	48.7%
20	58.5%	66.7%
25	51.2%	76.9%

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามค่า AREG ข้างต้น พบว่า ผู้ป่วย 81 ราย จัดอยู่ในกลุ่ม low AREG และ 39 รายจัดอยู่ในกลุ่ม high AREG จากตารางที่ 4 พบว่า กลุ่ม high AREG มีสัดส่วนของ poorly differentiated/mucinous histological grade, M₁, lymphovascular invasion (LVI), perineural invasion (PNI) และ stage IV/recurrent disease ที่มากกว่ากลุ่ม low AREG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.014, p=0.001, p=0.016, p<0.001 และ p=0.003 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกพยาธิวิทยา (clinicopathologic factors) กับระดับของ serum amphiregulin

Clinicopathologic factor	Serum AREG		
	Low (≤ 25 pg/mL)	High (> 25 pg/mL)	p
Gender			
Male	41/81 (50.6%)	23/39 (59.0%)	0.390
Female	40/81 (49.4%)	16/39 (41.0%)	
Clinical presentation			
LGIB	22/71 (30.6%)	12/33 (36.4%)	0.497
Bowel habit change	15/71 (20.8%)	9/33 (27.3%)	
Abdominal pain	13/71 (18.1%)	6/33 (18.2%)	
Anemia	4/71 (5.6%)	2/33 (6.1%)	
Gut obstruction	4/71 (5.6%)	3/33 (9.1%)	
Screening	13/71 (18.1%)	1/33 (3.0%)	
Site			
Colon	39/79 (49.4%)	25/38 (65.8%)	0.095
Rectum	40/79 (50.6%)	13/38 (34.2%)	
Histological grade			
Well/moderate	67/68 (98.5%)	26/30 (86.7%)	0.014*
Poor/mucinous	1/68 (1.5%)	4/30 (13.3%)	
Depth of tumor invasion			
pT ₁ -pT ₃	56/66 (84.8%)	16/21 (76.2%)	0.360
pT ₄	10/66 (15.2%)	5/21 (23.8%)	
Lymph nodes			
pN ₀	40/66 (60.6%)	9/20 (45.0%)	0.217
pN ₁₋₂	26/66 (39.4%)	11/20 (55.0%)	
Metastases			
M ₀	61/80 (76.2%)	18/39 (46.2%)	0.001*
M ₁	19/80 (23.8%)	21/39 (53.8%)	
Lymphovascular invasion (LVI)			
Positive	30/63 (47.6%)	15/19 (78.9%)	0.016*
Negative	33/63 (52.4%)	4/19 (21.1%)	

Perineural invasion (PNI)			
Positive	18/63 (28.6%)	14/19 (73.7%)	<0.001*
Negative	45/63 (71.4%)	5/19 (26.3%)	
Stage			
I	15/80 (18.8%)	1/39 (2.6%)	0.003*
II	26/80 (32.5%)	9/39 (23.1%)	
III	19/80 (23.8%)	8/39 (20.5%)	
IV/recurrent	20/80 (25.0%)	21/39 (53.9%)	

*significant, $p < 0.05$

ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนักที่พบมีการกระจายของโรคไปตำแหน่งอื่นๆ ใน การศึกษานี้พบว่า ตับ (liver) เป็นตำแหน่งที่พบมากที่สุด ร้อยละ 50.9 รองลงมาเป็น ปอด (lung) และเยื่อผนังช่องท้อง (peritoneum) ร้อยละ 26.3 และ 19.3 ตามลำดับ ผู้ป่วยประมาณหนึ่งใน สาม (ร้อยละ 37.5) มีการกระจายของโรคที่มากกว่า 1 ตำแหน่งขึ้นไป (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะโรคและตำแหน่งที่มะเร็งแพร่กระจาย (n=40)

Metastasis lesion(s)	Patients, n
1	25 (62.5%)
2	13 (32.5%)
3	2 (5.0%)
Site of metastasis	
Liver	50.9%
Lung	26.3%
Peritoneum	19.3%
Others	3.5%

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีการกระจายของโรค 3 ตำแหน่ง ทั้งสองราย และผู้ป่วยที่มีการกระจายของโรค 2 ตำแหน่ง จำนวน 12 ราย อยู่ในกลุ่ม high serum AREG

เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ serum AREG และตำแหน่งการกระจายของโรคมะเร็งพบว่า high AREG มีความสัมพันธ์กับการกระจายของโรคไปยัง liver และ peritoneum อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งที่มะเร็งแพร่กระจาย กับระดับของ serum amphiregulin

Site of metastasis	Serum AREG		
	Low (≤ 25 pg/mL)	High (> 25 pg/mL)	p
Liver			
Yes	10/81 (12.3%)	19/38 (50.0%)	<0.001
No	71/81 (87.7%)	19/38 (50.0%)	
Lung			
Yes	8/81 (9.9%)	7/38 (18.4%)	0.19
No	73/81 (90.1%)	31/38 (81.6%)	
Peritoneum			
Yes	2/81 (2.5%)	9/38 (23.7%)	<0.001
No	79/81 (97.5%)	29/38 (76.3%)	
Other			
Yes	1/81 (1.2%)	1/38 (2.6%)	0.58
No	80/81 (98.8%)	37/38 (97.4%)	

*missing data 1

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

ผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า advanced disease (TNM stage IV และ recurrent disease) ของ colorectal carcinoma (CRC) จะมีค่ากลางที่สูงกว่า localized disease อย่างมีนัยสำคัญ และกรณีที่เป็น localized disease การมี serum amphiregulin ที่มากกว่า 25 pg/mL (high serum AREG) มีความสัมพันธ์กับปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognostic parameters) ได้แก่ poor differentiated/mucinous histological grade, M₁, lymphovascular invasion (LVI) และ perineural invasion (PNI) ที่มากกว่ากลุ่ม low serum AREG

นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากรณีที่มี high serum AREG ยังมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งของการกระจายของโรคมะเร็งไปที่ liver และ peritoneum ด้วย แต่ในแง่ของ peritoneum อาจต้องระวังในการสรุปผลเนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่มีการกระจายไปยังอวัยวะดังกล่าวมีเพียง 11 ราย และ 9 ราย นั้นก็มีการกระจายไปที่ liver ร่วมด้วยเช่นกัน ผู้ป่วยที่มีการกระจายของอวัยวะมากกว่า 1 ชนิด จำนวน 15 ราย มี 14 ราย (ร้อยละ 93.3) มีค่า serum AREG >25 pg/mL จากผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้เชื่อได้ว่า serum AREG น่าจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก

การศึกษาก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกันกับ AREG และ CRC ได้แสดงให้เห็นว่า AREG expression ในชั้นเนื้อของ colon tissue มีความสัมพันธ์กับปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และบางการศึกษาได้แสดงถึงความสัมพันธ์ต่อการกระจายของโรคมะเร็งไปยังตับเช่นเดียวกัน [7, 8, 16, 17, 21] แต่การศึกษาที่ผ่านมาจะทำการตรวจระดับ AREG ใน colon tissue เท่านั้น ไม่ได้ทำการศึกษาใน serum หรือ plasma ในปีพ.ศ. 2553 Li และคณะ [11] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ AREG กับปัจจัยพยากรณ์โรคทั้งใน serum และ tissue ซึ่งพบว่า serum AREG ที่สูงมีความสัมพันธ์กับ vascular invasion ส่วนใน tissue นั้นมีความสัมพันธ์กับ depth of tumor invasion, distant metastasis และ nerve invasion แต่ด้วยข้อจำกัดของขนาดตัวอย่างและเทคนิคในการตรวจ ELISA ทำให้ไม่สามารถทราบความสัมพันธ์ระหว่าง serum AREG และ AREG tissue expression ได้

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจ serum AREG ในผู้ป่วย CRC จำนวน 120 ราย ซึ่งจัดเป็นการศึกษา serum AREG ใน CRC ที่มากที่สุดเท่าที่ทางผู้วิจัยทราบในปัจจุบัน และได้แสดงให้เห็นว่าระดับ serum AREG นั้น สามารถบอกถึง poor prognostic parameters และปัจจัยทำนายการ

กระจายของโรคมะเร็งไปตับได้ ไม่แตกต่างจาก colon tissue expression ในหลายๆการศึกษาที่ผ่านมา

ข้อได้เปรียบของการตรวจ AREG จาก serum ได้แก่ 1.ไม่จำเป็นต้องใช้ชิ้นเนื้อ กรณีที่ผู้ป่วยที่ไม่สามารถตัดชิ้นเนื้อใหม่ได้, ชิ้นเนื้อสูญหาย หรือชิ้นเนื้อเหลือไม่เพียงพอต่อการตรวจเพิ่ม 2.อาศัยเทคนิคในการตรวจหรือความชำนาญที่น้อยกว่า 3.ใช้เวลาตรวจและค่าใช้จ่ายน้อยกว่ากรณีที่จำนวนตัวอย่างเท่าๆกัน 4.หลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากเลือกตำแหน่งชิ้นเนื้อที่ตรวจไม่เหมาะสม 5. กรณีถ้าเป็น biomarker ที่ดี อาจนำมาใช้ติดตามผลการรักษาได้ แต่ข้อเสียที่พบในปัจจุบันก็มีเช่นเดียวกันคือ ยังไม่มีมาตรฐานของการตรวจ serum AREG, การศึกษาที่ตรวจจาก serum ยังมีน้อย เมื่อเทียบกับ tissue expression ดังนั้นความน่าเชื่อถืออาจลดน้อยลง และยังไม่พบการศึกษาถึงความผันแปรของระดับ serum AREG ในแต่ละช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ 1.จำนวนผู้ป่วยที่เข้าการศึกษาน้อยกว่าที่วางแผนไว้ 2.ยังไม่มี การตรวจ serum AREG ที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน 3.ยังไม่ได้มีการศึกษาต่อในระยะยาวที่จะบ่งบอก ว่า การมี high serum AREG ถึงแม้จะมีความสัมพันธ์กับปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี นั้นจะส่งผลไปถึง การมีอัตราการกำเริบของโรค หรืออัตราการรอดชีวิตที่แย่กว่า low serum AREG 4.ทางผู้วิจัยไม่ได้ ทำการตรวจ AREG ใน tissue ทำให้ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่าง serum และ tissue ได้

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้สรุปผลได้ว่า

1. ผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก ที่มี TNM stage IV หรือ recurrent disease จะมีค่า serum amphiregulin ที่สูงกว่า localized disease (TNM stage I-III)

2. ระดับ serum amphiregulin ที่สูง (high serum AREG) มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และ/หรือทวารหนัก ได้แก่ การมี poor differentiated หรือ mucinous histological grade, metastasis, lymphovascular invasion และ perineural invasion ที่มากกว่า

3. ระดับ serum amphiregulin ที่สูง (high serum AREG) มีความสัมพันธ์ต่อการกระจายของโรคมะเร็งไปยังตับและเยื่อปอดช่องท้อง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บตัวอย่างข้อมูลเพิ่มเติมให้ครบถ้วนสมบูรณ์เพื่อยืนยันผลสรุปที่ได้
2. ควรมีการติดตามผู้ป่วยอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ทราบถึงการพยากรณ์โรคที่แท้จริงทางคลินิก ได้แก่ อัตราการกำเริบของโรคมะเร็ง (progression free survival), อัตราการรอดชีวิต (overall survival) เป็นต้น
3. ควรมีการตรวจ AREG expression ใน tissue ของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาร่วมด้วย เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของตัวอย่างใน serum และ tissue

รายการอ้างอิง

1. Organization, W.H. *Cancer*. Fact sheet N°297 2012; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
2. Society, A.C. *Cancer facts and figures*. 2010; Available from: <http://www.cancer.org>.
3. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, รายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล (*Hospital - Based Cancer Registry*), พ.ศ.2554.
4. Rerknimitr, R., et al., *Differences in characteristics of colorectal neoplasm between young and elderly Thais*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(47): p. 7684-9.
5. Vigano, L., et al., *Liver surgery for colorectal metastases: results after 10 years of follow-up. Long-term survivors, late recurrences, and prognostic role of morbidity*. *Ann Surg Oncol*, 2008. **15**(9): p. 2458-64.
6. Ma, L., et al., *Expression of amphiregulin and epidermal growth factor receptor in human breast cancer: analysis of autocriny and stromal-epithelial interactions*. *J Pathol*, 2001. **194**(4): p. 413-9.
7. Ciardiello, F., et al., *Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7792-6.
8. Yamada, M., et al., *Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(8): p. 2351-6.
9. Shoyab, M., et al., *Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family*. *Science*, 1989. **243**(4894 Pt 1): p. 1074-6.
10. Yotsumoto, F., et al., *Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **365**(3): p. 555-61.
11. Li, X.D., et al., *Amphiregulin and epiregulin expression in colorectal carcinoma and the correlation with clinicopathological characteristics*. *Onkologie*, 2010. **33**(7): p. 353-8.
12. Johnson, G.R., et al., *Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon*. *J Cell Biol*, 1992. **118**(3): p. 741-51.

13. Johansson, C.C., et al., *The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway in various cell types*. *Endocrinology*, 2004. **145**(11): p. 5177-84.
14. Alvarado, M.D., E.H. Jensen, and T.J. Yeatman, *The potential role of gene expression in the management of primary and metastatic colorectal cancer*. *Cancer Control*, 2006. **13**(1): p. 27-31.
15. Khambata-Ford, S., et al., *Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(22): p. 3230-7.
16. Watanabe, T., et al., *Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(11): p. 2119-26.
17. Ohchi, T., et al., *Amphiregulin is a prognostic factor in colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 2012. **32**(6): p. 2315-21.
18. Kuramochi, H., et al., *Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 88.
19. Vollebergh, M.A., et al., *Ligands of epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor family as serum biomarkers for response to epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2010. **5**(12): p. 1939-48.
20. Peterson, E.A., S. Shabbeer, and P.A. Kenny, *Normal range of serum Amphiregulin in healthy adult human females*. *Clin Biochem*, 2012. **45**(6): p. 460-3.
21. Nishimura, T., et al., *Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon*. *Oncol Rep*, 2008. **19**(1): p. 105-10.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)

การดำเนินงาน	พ.ศ. 2556												พ.ศ. 2557			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
1. การเตรียมงาน	X	X	X	X	X	X	X									
2. รวบรวมข้อมูล								X	X	X	X	X				
3. วิเคราะห์ข้อมูล													X	X		
4. สรุปเขียนรายงาน																X
5. รายงานผล																X

Case Record Form

Serial number

.....

Date HN

Demographic data

Age years

Gender Male FemalePS (ECOG) 0 1 2 3 4Smoking Current (.....pack-year, duration.....years) Ex-smoker (.....pack-year, duration.....years, stop.....years) Non-smokerPrimary lesion (colon, rectum)Histology grade well differentiate moderate poor undifferentiateShape ulcerative protrude othersSite colon rectumpT T1 T2 T3 T4pN N0 N1 N2M M0 M1 (only liver metastasis)Margin R0 R1 R2Vascular invasion positive negativeNerve invasion positive negative

TNM Staging I II III IV Recurrent

Date of 1st diagnosis

Type of operation

Date of operation

Secondary lesion (liver or other metastasis)

Histology grade well differentiate moderate

poor undifferentiate

Margin R0 R1 R2

Vascular invasion positive negative

Nerve invasion positive negative

Date of 1st diagnosis

Type of operation

Date of operation

Factors

Pre-op AREG (date))

Pre-op CEA (date))

} Before standard treatment

If patient receive Chemotherapy

Aim neoadjuvant/pre-op adjuvant palliative

Regimen 5FU/LV FOLFOX FOLFIRI others (ระบุ.....)

Amount cycles

Date of 1st cycle

Date of last cycle

If patient receive intervention

Type Date

When Recurrence

Date

Mode local distant (ระบุ.....)

CEA

When Progression

Date

Mode local distant (ระบุ.....)

CEA

Human Amphiregulin ELISA

Catalog Number: DY262

This DuoSet ELISA Development kit contains the basic components required for the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Amphiregulin. DuoSets are designed for the analysis of cell culture supernates. Other sample types, such as serum and plasma, need to be validated prior to use in this DuoSet. Each kit contains sufficient materials to run ELISAs on approximately fifteen 96-well plates, provided that the following conditions are met:

- The assay is run as summarized in the General ELISA protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

MATERIALS PROVIDED

Bring all reagents to room temperature before use.

Capture Antibody (Part 840877, 1 vial) 360 μ g/mL of mouse anti-human Amphiregulin when reconstituted with 1.0 mL of PBS. After reconstitution, store at 2-8 $^{\circ}$ C for up to 60 days or aliquot and store at -20 $^{\circ}$ C to -70 $^{\circ}$ C in a manual defrost freezer for up to 6 months. Dilute to a working concentration of 2.0 μ g/mL in PBS, without carrier protein.

Detection Antibody (Part 840878, 1 vial) 18 μ g/mL of biotinylated goat anti-human Amphiregulin when reconstituted with 1.0 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). After reconstitution, store at 2-8 $^{\circ}$ C for up to 60 days or aliquot and store at -20 $^{\circ}$ C to -70 $^{\circ}$ C in a manual defrost freezer for up to 6 months. Dilute to a working concentration of 100 ng/mL in Reagent Diluent.

Standard (Part 840879, 1 vial) 30 ng/mL of recombinant human Amphiregulin when reconstituted with 0.5 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). Allow

the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Aliquot and store reconstituted standard at -70°C for up to 6 months. A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent, and a high standard of 1000 pg/mL is recommended.

Streptavidin-HRP (Part 890803, 1 vial) 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Store at $2-8^{\circ}\text{C}$ for up to 6 months after initial use. **DO NOT FREEZE**. Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent (see Solutions Required section).

SOLUTIONS REQUIRED

PBS 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered.

Wash Buffer 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4

(R&D Systems Catalog # WA126).

Reagent Diluent 1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 μm filtered (R&D Systems Catalog # DY995).

Quality of BSA is critical (see Technical Hints).

Substrate Solution 1:1 mixture of Color Reagent A (H_2O_2) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999).

Stop Solution 2 N H_2SO_4

(R&D Systems Catalog # DY994).

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate with 100 μL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 μL of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 μL of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well.
Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 μL of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 μL of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature.

Avoid placing the plate in direct light.

6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.

7. Add 100 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature.

Avoid placing the plate in direct light.

8. Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.

9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to

450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

TECHNICAL HINTS AND LIMITATIONS

- The use of high quality Bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.
- We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent (Catalog # DY995) or the use of Millipore Bovine Serum Albumin, Fraction V, Protease free (Catalog # 82-045), to prepare your own Reagent Diluent.
- This DuoSet should not be used beyond the expiration date on the label.

- It is important that the diluents selected for reconstitution and for dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured. The diluent suggested in this protocol should be suitable for most cell culture supernate samples. Validate diluents for specific sample types prior to use.
- The type of enzyme and substrate and the concentrations of capture/detection antibodies used can be varied to create an immunoassay with a different sensitivity and dynamic range. A basic understanding of immunoassay development is required for the successful use of these reagents in immunoassays.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Use a fresh reagent reservoir and pipette tips for each step.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers. This may interfere with the sensitivity of the assay. Buffers containing a large quantity of protein should be made under sterile conditions and stored at 2-8° C or be prepared fresh daily.

PRECAUTION

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density. Create a standard curve by

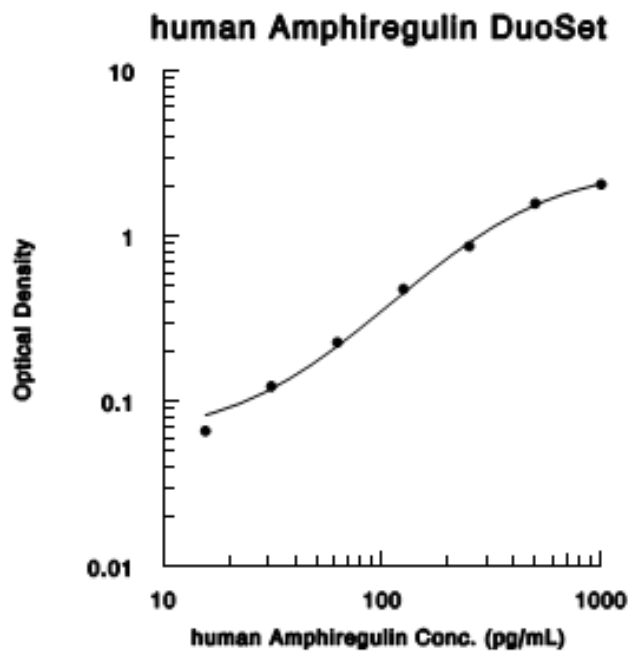
reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the Amphiregulin concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This

procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

The graph below represents typical data generated when using this human Amphiregulin DuoSet. The standard curve was calculated using a computer generated 4-PL curve-fit.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference.

Recombinant human: EGF, EGFR, HB-EGF, TGF

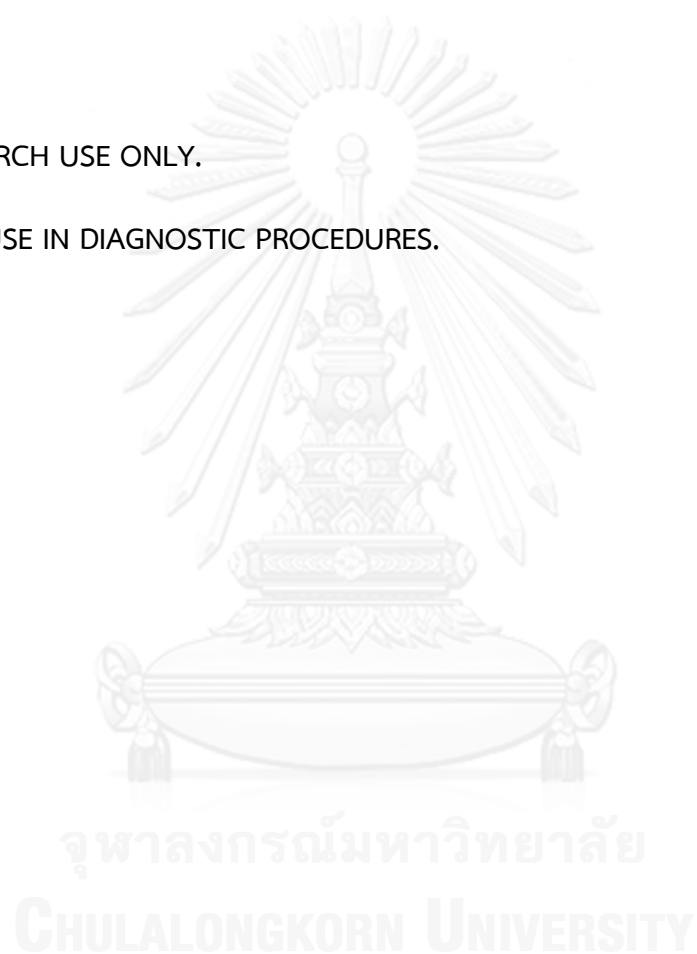
Recombinant mouse: Amphiregulin

CALIBRATION

This DuoSet is calibrated against a highly purified E. coli-expressed recombinant human Amphiregulin produced at R&D Systems.

FOR RESEARCH USE ONLY.

NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ขวลิต ขยางศู เกิดเมื่อวันที่ 7 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่เขตบางคอแหลม จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี แพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 จากนั้นปฏิบัติงานเป็นแพทย์เพิ่มพูนทักษะ 1 ปี ที่โรงพยาบาลสุรินทร์ ต่อมาได้ทำงานเป็นแพทย์ประจำและดำรงตำแหน่งหัวหน้าหน่วยงานเวชระเบียน และสารสนเทศ โรงพยาบาลกาบเชิง อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ เป็นเวลา 2 ปี

ระหว่างปี พ.ศ. 2551-2554 ได้เข้ารับการฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และสอบผ่านวุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญทางวิชาชีพเวชกรรมสาขา อายุรศาสตร์ทั่วไปเมื่อปีพ.ศ. 2554 หลังจากนั้นได้กลับไปทำงานเป็นแพทย์ประจำ กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลสุรินทร์ เป็นเวลา 1 ปี ปัจจุบันอยู่ระหว่างการฝึกอบรมหลักสูตรแพทย์ประจำบ้าน ต่อยอดสาขาอายุรกรรมมะเร็ง ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY