

ระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่เกิด
พิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในระยะที่ยังไม่มีอาการแสดงของระบบ
ข้างเคียงต่อระบบหัวใจ



นางสาว อัจฉรา สุภาวเวช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LEVEL OF mRNA OF ACADVL GENE IN PLASMA IN ASYMPTOMATIC
ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY IN BREAST CANCER PATIENTS



Miss Archara Supavavej

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้
ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทรา
ซัยคลินในระยะที่ยังไม่มีอาการแสดงของระบบข้างเคียงต่อ
ระบบหัวใจ

โดย

นางสาว อัจฉรา สุภาวเวช

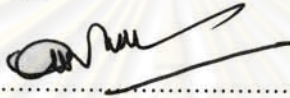
สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

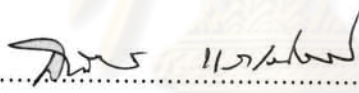
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)



อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)



อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์แพทย์หญิงศรียุภา ภูวนันท์)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์เถลิงศักดิ์ กาญจนบุษย์)



กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เอกภพ สิริชัยนันท์)

อัจฉรา สุภาวเวช:ระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม
ที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในระยะเวลาที่ยังไม่มีอาการแสดงของระบบข้างเคียง
ต่อระบบหัวใจ.(LEVEL OF mRNA OF ACADVL GENE IN PLASMA IN ASYMPTOMATIC
ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY IN BREAST CANCER)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์,
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.พญ.ศรียุญา ภูวนันท์, 85 หน้า


ที่มา ยาเคมีบำบัดกลุ่มแอนทราซัยคลินเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม แต่
ข้อจำกัดการใช้ยากกลุ่มนี้ที่สำคัญคือ ปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ซึ่งยังไม่มีวิธีการรักษาที่
จำเพาะต่อการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ ปัจจุบันมีความพยายามศึกษาไบโอมาร์คเกอร์ที่มีจำเพาะต่อการเกิด
พิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

โครงการวิจัยเรื่อง Genetic susceptibility of cardiotoxicities from Doxorubicin in breast cancer
patients ศึกษาหาพื้นที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับยาดีออกโซรูบิซินโดยวิธีไมโครเอเรย์ ผู้วิจัยเลือก
ศึกษายีนเอซีเอทีวีแอลเนื่องจากผลิตภัณฑ์ของยีนนี้อยู่ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มี
การสลายของกรดไขมัน ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินได้

วิธีการวิจัย ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการรักษาในพ.จุฬาลงกรณ์ในปี 2552-2553 ที่ได้รับการรักษาด้วยยา
เคมีสูตรดีออกโซรูบิซิน 60 มก./ม² และไซโคลฟอสฟาไมด์ 600 มก./ม² ทุก 3 สัปดาห์จำนวน 4 รอบ โดยมีการ
ตรวจechocardiogramก่อนและหลังให้ยา และมีการเก็บเลือดผู้ป่วยก่อนให้ยาเคมีบำบัดทุกครั้ง เพื่อนำมา
ศึกษาแบบตัดขวาง หาระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยด้วยวิธีเรียลไทม์พีซี
อาร์ โดยมียื่นควบคุมภายในคือยีนแกบตีเอช

ผลการวิจัย มีผู้ป่วย 51 คนที่เข้าร่วมการวิจัย โดยเลือกตัวอย่างเลือดผู้ป่วย 3 คนจากกลุ่มทดลอง และ 3
คนจากกลุ่มควบคุม โดยใช้เลือดก่อนให้ยาครั้งแรกและก่อนให้ครั้งที่สอง ผลคือไม่สามารถวัดปริมาณเอ็ม
อาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยก่อนเริ่มยาและหลังให้ยาได้ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่ม
ทดลอง แต่ยื่นควบคุมภายในสามารถตรวจวัดได้ ได้มีการยืนยันผลการทดลองด้วยการทำอิลเลกโตโฟเรซิส
แสดงว่าไม่พบยีนนี้ในพลาสมาจริง ผู้วิจัยจึงตัดสินใจหยุดการศึกษา

สรุป ไม่มียีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมจากการวัดด้วยเรียลไทม์พีซีอาร์ แสดงว่ายีนนี้
อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน แต่ยีนชนิดนี้อาจจะเป็นตัวชี้ว่าการ
เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินได้ ในอนาคตอาจจะการศึกษาหาพื้นที่เป็นไบโอมาร์ค
เกอร์ต่อไป

ภาควิชา...อายุรศาสตร์.....	ลายมือชื่อ.....	ผู้ส่ง	ศกษว
สาขาวิชา.. อายุรศาสตร์....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....		
ปีการศึกษา..2553.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....	ศรียุญา	ภูวนันท์

5274842930 MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: CARDIOTOXICITY / ANTHRACYCLINE / DOXORUBICIN / PLASMA MRNA

Archara Supavavej: LEVEL OF mRNA OF ACADVL GENE IN PLASMA IN ASYMPTOMATIC ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY IN BREAST CANCER ADVISOR: ASST.PROF. Virote Sriuranpong, M.D.,Ph.D., Co-advisor: Sarinya Puwanant M.D., 85 pp.

Background. Anthracycline is widely used in cancer treatment. Life threatening cardiotoxicity compromise their usefulness. No specific treatment of anthracycline cardiotoxicity is available. So we would like to investigate for biomarker of anthracycline cardiotoxicity

The project named Genetic susceptibility of cardiotoxicities from Doxorubicin in breast cancer patients presented microarray data of gene expression of anthracycline cardiotoxic. We selected ACADVL gene to this study due to its function. The product of this gene presented at inner wall of mitochondria where the lipid peroxidation occurred. This may related to anthracycline cardiotoxicity.

Patients and methods. 51 female breast cancer patients who receiving doxorubicin and cyclophosphamide (AC) regimen every 3 weeks for 4 cycles were evaluated for cardiac function by echocardiography at baseline and after the 4th cycle chemotherapy. Serial blood sampling were collected and cross sectionally measured for messenger RNA of ACADVL gene in plasma by Real time PCR. Internal control was GAPDH gene.

Results. First, We selected 3 samples in cardiotoxic group and 3 samples in normal group, both before and after 1st cycle chemotherapy. Total 12 samples were studied for level of messenger RNA of ACADVL gene. The result revealed no expression of mRNA of ACADVL gene in plasma of both cardiotoxic and non cardiotoxic group (before and after sample). But GAPDH gene level can be detected in all specimens. We decided to stop the further laboratory examination.

Conclusion. No expression of ACADVL gene in breast cancer patients plasma. This gene may not related to Anthracycline cardiotoxicity. The further study may focus in other gene that functions compatible with anthracycline cardiotoxicity mechanism.

DepartmentMedicine..... Student's signature *Archara Supavavej*
 Field of Study.....Medicine.....Advisor's signature..... *Virote Sriuranpong*
 Academic Year.....2010.....Co-advisor's signature..... *Sarinya Puwanant*

กิตติกรรมประกาศ

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

อ.พญ.ศิริธัญญา ภูวนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัย

อ.พญ.ชนิดา วินะยานุวัติคุณ อาจารย์ที่ให้ปรึกษาเรื่องการทดลองในการวิจัย

อ.พญ.นภา ปริชญานัติกุล อาจารย์แพทย์ในหน่วยมะเร็งวิทยา

อ.นพ.ณัฐพงษ์ ไตพิบูลย์พงษ์ อาจารย์แพทย์ในหน่วยมะเร็งวิทยา

ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.วิฑูรย์ โฉมสุทธกร อาจารย์ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันที่ให้คำแนะนำเรื่องสถิติ

เจ้าหน้าที่ทุกท่านรายนามดังนี้

คุณจุฑามาศ ประสิทธิ์เม นักวิทยาศาสตร์โครงการวิจัย anthracycline cardiotoxicity

คุณชวลิต แซ่ล้อ เจ้าหน้าที่โครงการวิจัย anthracycline cardiotoxicity

คุณชลอ คณา เจ้าหน้าที่ห้องประสานงานฝ่ายโรคหัวใจ

บิดามารดา และ ครอบครัวที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. มะเร็งเต้านมกับยาเคมีบำบัดชนิดแอนทราซัยคลิน.....	7
3. ผลของยาแอนทราซัยคลินกับระบบหัวใจ.....	11
4. วิธีทางอณูชีววิทยาที่นำมาประยุกต์ใช้ในคลินิก.....	25
5. ปรีทอร์ศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	33
6. วัตถุประสงค์และวิธีการ.....	38
7. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
8. อภิปรายผลการวิจัย.....	55
9. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	60
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก.....	68
ภาคผนวก ข.....	70
ภาคผนวก ค.....	72
ภาคผนวก ง.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงนิยามของ ECOG Performance status.....	5
ตารางที่ 2 แสดงพิษของระบบหัวใจตาม National Cancer Institute.....	5
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อภาวะหัวใจล้มเหลว 5% ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย ที่ ECOG PS < 2 มีการแพร่กระจายอวัยวะในร่างกาย มากกว่า 1 อวัยวะ และไม่เคยได้รับยาเคมีบำบัดเสริมในมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น.....	18
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อภาวะหัวใจล้มเหลว 5% ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย ที่ ECOG PS > 2 มีการแพร่กระจายอวัยวะในร่างกาย มากกว่า 2 อวัยวะ.....	18
ตารางที่ 5 แสดงรายชื่อยีนที่มีการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบ หัวใจ.....	33
ตารางที่ 6 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ.....	45
ตารางที่ 7 แสดงลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม.....	47
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะมะเร็งเต้านมของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม.....	48
ตารางที่ 9 แสดงลักษณะผลการตรวจหัวใจของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม.....	50
ตารางที่ 10 แสดงลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาทำ RT-PCR.....	50
ตารางที่ 11 แสดงปริมาณซีดีเอ็นเอที่วัดได้จากการทำเรียลไทม์พีซีอาร์.....	51
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณ ซีดีเอ็นเอที่วัดได้เมื่อ normalized ด้วย GAPDH.....	52
ตารางที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเท่าของปริมาณซีดีเอ็นเอหลังให้ยาเทียบกับก่อนให้ ยา.....	53

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย.....	4
รูปที่ 2 แสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ	6
รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลยากลุ่มแอนทราซัยคลิน	8
รูปที่ 4 แสดงวิธีการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน.....	16
รูปที่ 5 แสดงจำนวนผลิตภัณฑ์ที่เกิดเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประดับหนึ่งเป็นเวลา	26
รูปที่ 6 แสดงการวัดปริมาณfluorescence จาก standard ในเรียลไทม์พีซีอาร์	29
รูปที่ 7 แสดงการวัด fluorescence จาก PCR product	30
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของโปรตีน ACADVL 001	35
รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างของโปรตีน ACADVL 201	35
รูปที่ 10 โครงสร้างของโปรตีนเอซี ACADVL 202	35
รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA โดยเครื่อง RevertAID.....	40
รูปที่ 12 แสดงผลการทำอิลีกโทรโฟเรซิสของการทำพีซีอาร์.....	54
รูปที่ 13 แสดงรูปแบบของreal time ในการยืนยันยืนยันในแบบที่พิษสะสมแสดงความสัมพันธ์กับ เวลา.....	58
รูปที่ 14 ภาพแสดงการศึกษากการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค DNA microarray.....	79

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DNA	Deoxyribonucleic acid
cDNA	complimentary Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	messenger Ribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
ACADVL	Acyl CoA Dehydrogenase Very Long Chain
mg/m ²	milligram per metre square of Body surface area
ng	nanogram
μL	microlitre
mM	millimole
LVEF	Left ventricular ejection fraction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหาการในการวิจัย (background and rationale)

ในปัจจุบันโรคมะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์เกิดเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปอกมดลูก โดยมีอุบัติการณ์โดยอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมในของประเทศไทยในปีพ.ศ.2539 ประมาณ 17.2 คนต่อประชากร 100,000 คน (1) และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้น ในบางพื้นที่ของประเทศไทย เช่นกรุงเทพมหานคร และ สงขลา มะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์ที่สูงเป็นอันดับหนึ่งมากกว่ามะเร็งปอกมดลูก ในกรุงเทพมหานคร อุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมเท่ากับ 25.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มะเร็งปอกมดลูกมีอุบัติการณ์ 20.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ในบางพื้นที่ เช่น เชียงใหม่ ขอนแก่น ลำปาง อุบัติการณ์มะเร็งเต้านม ยังพบเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปอกมดลูก (2)

ยากกลุ่มแอนทราซัยคลินเป็นยาเคมีบำบัดที่มีการใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมค่อนข้างมาก เนื่องจากให้ประสิทธิภาพที่สูงและให้ผลการรักษาที่น่าพอใจ ตั้งแต่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจาย โดยใช้เป็นยาตัวเดียว หรือให้คู่กับยาเคมีอื่น ต่อมาจึงมีการนำมาใช้ในการรักษาเสริมแก่ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น โดยสูตรยาแรกของกลุ่มแอนทราซัยคลินที่นิยมใช้ทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยด้วย คือ ยาดีออกโซรูบิซิน (Doxorubicin) และ ซัยโคลฟอสฟาไมด์ (cyclophosphamide) ที่นิยมใช้ในมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น

ข้อจำกัดของการใช้ยาแอนทราซัยคลินที่สำคัญ คือ การที่มีพิษต่อระบบหัวใจ ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งแบบระยะสั้น (short term) เช่น หัวใจเต้นผิดจังหวะ (cardiac arrhythmia) หรือ กล้ามเนื้อหัวใจหรือเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (myocarditis and pericarditis) หรือ การบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายลดลง (decreased LV systolic function) และแบบระยะยาว (longterm) การทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายที่ลดลงเรื่อยๆจนเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว เนื่องจากปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น ให้ผลการรักษาเป็นที่น่าสนใจ มีผู้ป่วยที่มีชีวิตอยู่ได้ยาวนานขึ้นหรือหายขาดมากขึ้น บางรายอาจจะอยู่โดยปราศจากโรคได้ถึง10 ปี ดังนั้นผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัดต่อระบบหัวใจ อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจของผู้ป่วยในระยะยาวได้มากขึ้น โดยลักษณะสำคัญของพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน เป็นภาวะที่เกิดขึ้นถาวรและไม่สามารถฟื้นคืนได้ (irreversible) โดยพิษสะสมจะเพิ่มขึ้นแปรตามปริมาณยาสะสมที่ได้รับ (cumulative dose relation)โดยพบว่าผู้ป่วยที่ได้ยาสะสมDoxorubicinที่มีขนาดยาสะสม ขนาด 450-550 mg/m² จะมีโอกาสเกิดโรคหัวใจล้มเหลว 0-1.6 เปอร์เซ็นต์ และโอกาสจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.1 เปอร์เซ็นต์เมื่อได้รับ

ยาแพคลิตาเซล(Paclitaxel)ตามหลัง นอกจากนี้มีข้อมูลของอัตราการเกิดการลดลงของการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายมากกว่า 10เปอร์เซ็นต์ โดยผู้ป่วยไม่มีอาการแสดง พบได้ระหว่าง 10 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่ได้รับยาแอนทราซัยคลิน (3) ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดของผลระยะยาวที่เกิดกับกลุ่มที่มีการลดลงของการบีบตัวของหัวใจกับการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวในระยะยาว

มีการศึกษาเกี่ยวข้องกับการหาตัวชี้หน้าที่แสดง(predictive biomarker)ถึงภาวะพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน เริ่มตั้งแต่การตรวจหาโปรตีนในเลือด เช่น cardiac troponin และ brain natriuretic peptides ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดอาจจะเป็นตัวชี้หน้าที่แสดงถึงภาวะพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน (4) แต่การแปลผลค่า brain natriuretic peptide ในผู้ป่วยที่อ่อน, โรคไตวายเรื้อรัง, ผู้ป่วยที่มีการทำงานของหัวใจผิดปกติอยู่เดิม, ผู้ป่วยโรคไทรอยด์ และผู้ป่วยโรคถุงลมโป่งพองเรื้อรัง ทำให้มีผลต่อการแปลผลค่า brain natriuretic peptide ได้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล คือ การเปลี่ยนแปลงของ เมสเซนเจอร์RNA (messenger RNA, mRNA) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บต่อหัวใจในระดับโมโตคอนเดรีย

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง Genetic susceptibility of cardiotoxicities from Doxorubicin in breast cancer patients โดยผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ โดยใช้ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนของสารพันธุกรรมในน้ำเหลืองจากผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่ได้รับยาแอนทราซัยคลินด้วยเทคนิคโครเออเรย์ โดยพบว่ามียีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) หลังได้ยาในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจำนวน 5 ยีน และ พบยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) หลังได้ยาในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจำนวน 55 ยีน จากยีนเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงเลือกยีนที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินมาศึกษาต่อ

ยีนเอซีเอทีวีแอลคือยีนเอซิลโคเอทีไฮโดรจีเนสเวรีลองเชน (acyl CoA dehydrogenase very long chain, ACADVL) ของสปีชีส์มนุษย์ โดยโปรตีนที่สร้างโดยยีนนี้จะอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นตำแหน่งแรกของกระบวนการเกิดการสลายตัวของกรดไขมันของกล้ามเนื้อหัวใจ (mitochondrial fatty acid Beta oxidation) การลดลงของโปรตีนนี้สัมพันธ์กับการลดลงของการสลายตัวของกรดไขมันในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ สัมพันธ์กับการทำงานของหัวใจที่ลดลง (cardiomyopathy)(5) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของยีนนี้ในพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับยาแอนทราซัยคลินที่เกิดภาวะพิษต่อระบบหัวใจในระยะที่ยังไม่มีอาการเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

2. คำถามการวิจัย (research question)

การเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมา ก่อนและหลังได้รับยาของกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งเต้านม ที่เกิดผลพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน มีความแตกต่างกับการเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมา กลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจหรือไม่

3. วัตถุประสงค์การวิจัย (objective)

การเปลี่ยนแปลงของระดับของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ก่อนและหลังให้ยาแอนทราซัยคลิน สามารถแสดงถึงภาวะการเป็นพิษต่อหัวใจจากแอนทราซัยคลิน ในระยะที่ไม่มีอาการแสดง

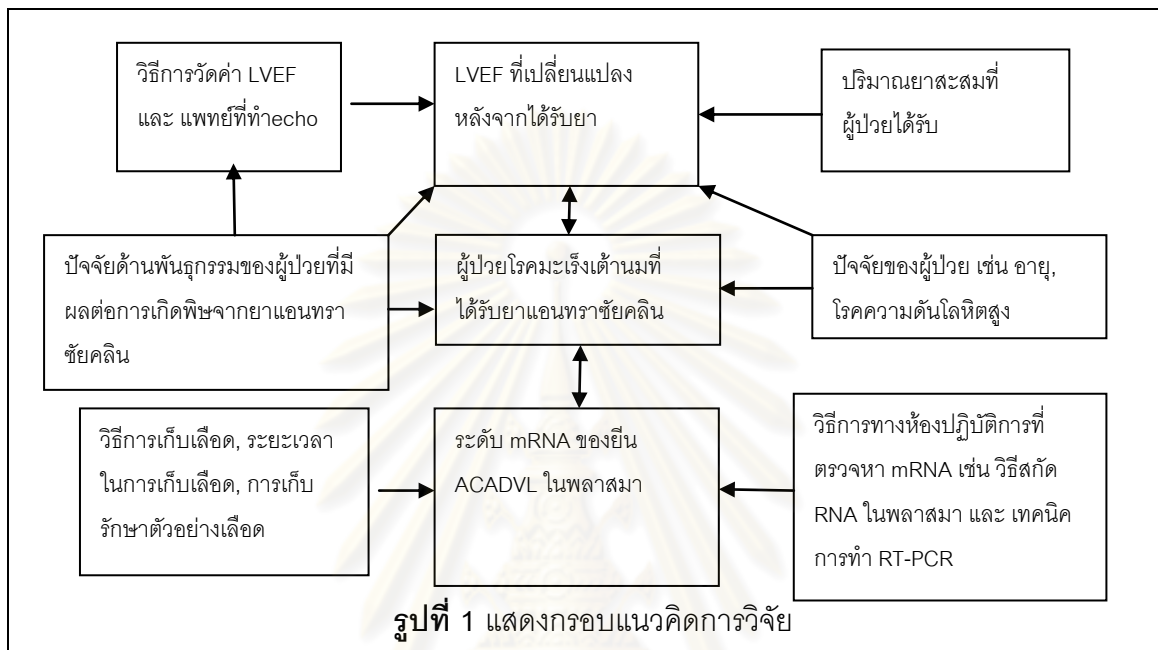
4. สมมติฐานการวิจัย (hypothesis)

H0: การเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมา ก่อนและหลังให้ยาของกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งเต้านม ที่เกิดผลพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน ไม่แตกต่างกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

Ha: การเปลี่ยนแปลงของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมา ก่อนและหลังให้ยาของกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งเต้านม ที่เกิดผลพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน แตกต่างกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

5. กรอบแนวคิดการวิจัย (conceptual frameworks)

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาไบโอมาร์คเกอร์ที่มีความไวและความจำเพาะต่อการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ จากยาแอนทราซัยคลินในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่ไม่มีอาการแสดงของภาวะหัวใจล้มเหลว โดยเลือกที่จะศึกษา ระดับพลาสมา mRNA ของยีน ACADVL



6. ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับยาแอนทราซัยคลินจะมีการปลดปล่อย สารพันธุกรรม mRNA จากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เกิดพิษจากยาเข้าไปในกระแสเลือด

ผู้เข้าร่วมวิจัยที่ไม่มีประวัติที่มีนัยสำคัญเกี่ยวกับโรคหัวใจมาก่อนและมีระดับการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายอยู่ในเกณฑ์ปกติถือว่าไม่มีโรคหัวใจที่มีนัยสำคัญ

7. ข้อจำกัดการวิจัย

ด้วยข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาในการทำวิจัยจึงศึกษาได้เพียงผลข้างเคียงของยาแอนทราซัยคลินต่อหัวใจในระยะสั้น (short term cardiotoxicity) เท่านั้น ไม่สามารถติดตามข้อมูลถึงข้อมูลระยะยาว (long term cardiotoxicity) ได้

8.การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในงานวิจัย

Eastern Cooperative oncology group (ECOG, Zubrod) performance status

Performance status	Definition
0	Fully active; no performance restrictions
1	Strenuous physical activity restricted; fully ambulatory and able to carry out light work
2	Capable of all selfcare but unable to carry out any work activities, Up and about > 50 percent of waking hours
3	Capable of only limited selfcare; confined to bed or chair > 50 percent of waking hours
4	Completely disabled ; cannot carry out any selfcare; totally confined to bed or chair

ตารางที่ 1 แสดงนิยามของ ECOG performance status

Cardiotoxicity grading ใช้ตาม National Cancer Institute (NCI) clinical toxicity criteria , version 2.0 ซึ่งเป็นมาตรฐานการประเมินผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด

Adverse event	Grade 0	1	2	3	4
Cardiac Left ventricular function	normal	Asymptomatic decline resting ejection fraction of $\geq 10\%$ but $< 20\%$ of baseline value; shortening fraction $\geq 24\%$ but $< 30\%$	Asymptomatic but resting ejection fraction below LLN for laboratory or decline of resting ejection fraction $\geq 20\%$ of baseline value; shortening fraction $< 24\%$	CHF responsive to treatment	Severe or refractory CHF or requiring intubation

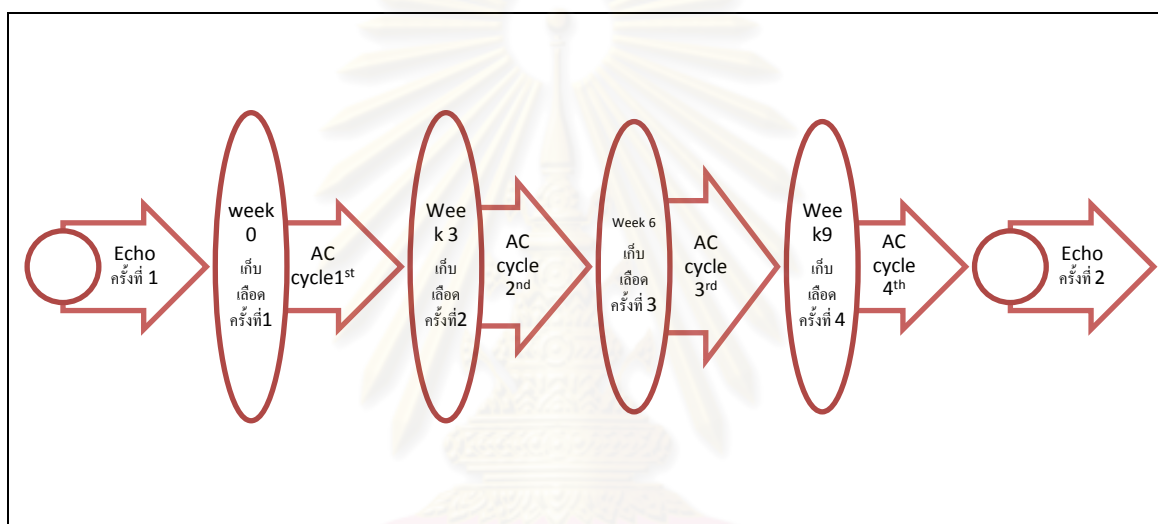
ตารางที่ 2 แสดงพิษต่อระบบหัวใจตาม National Cancer Institute version 2.0

9. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อหาเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะ สามารถใช้เป็นตัวติดตามระหว่างการรักษา ด้วยแอนทราซัยคลินเพื่อเฝ้าระวังภาวะเป็นพิษต่อหัวใจตั้งแต่ยังไม่มีอาการ

10. วิธีการดำเนินการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบตัดขวางศึกษาหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของพลาสมา mRNA ของ ยีน ACADVL



รูปที่ 2 แสดงวิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

บทที่ 2

มะเร็งเต้านมกับยาแอนทราซัยคลิน

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบอันดับที่สองรองจากมะเร็งปากมดลูกในสตรีไทย โดยมีอุบัติการณ์ประมาณ 17.2 ต่อประชากร 100,000 คน โดยมีอุบัติการณ์สูงสุดในพื้นที่กรุงเทพมหานคร โดยพบถึง 25.4 คน ต่อประชากร 100,000 คน โดยเกือบครึ่งหนึ่งพบในกลุ่มอายุที่มากกว่า 40 ปี ขึ้นไป โดยพบสูงสุดในกลุ่มอายุ 45-49 ปี(1) จากการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งเต้านมทั้งจากการผ่าตัด การฉายแสงและให้การรักษาโดยยา ทั้ง ยาต้านฮอร์โมน ยาเคมีบำบัด ยารักษาเฉพาะที่(ยาต้านฮอร์โมน, ยายับยั้งเส้นเลือด) ทั้งหมดนี้ล้วนแต่เป็นสิ่งที่ทำให้อัตรการรอดชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ จากการติดตามผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มต้นไปจนถึง 15 ปี พบว่าการให้เคมีบำบัดกลุ่มแอนทราซัยคลินและยาต้านฮอร์โมนสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดโดยปราศจากโรคได้ถึงครึ่งหนึ่ง(6)ทำให้ผู้ป่วยมีอายุที่ยาวนานมากขึ้นและผู้ป่วยเหล่านี้เพิ่มความเสี่ยงการเกิดโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด จากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจในระยะยาวได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัดจึงมีบทบาทสำคัญไม่ด้อยไปกว่าประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดแต่เพียงอย่างเดียว

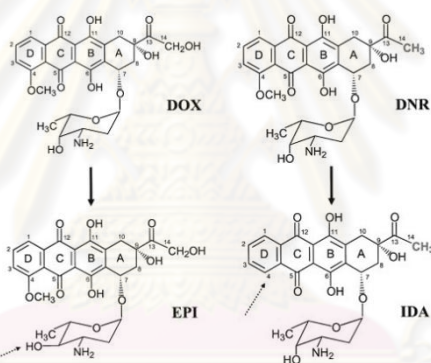
แอนทราซัยคลิน (anthracycline)

แอนทราซัยคลินเป็นยาเคมีที่มีการใช้มากทั่วโลก มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งทั้งในมะเร็งโรคเลือด และ มะเร็งของอวัยวะต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งของเนื้อเยื่ออ่อนและกระดูก เป็นต้น แอนทราซัยคลินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดยสกัดจากแบคทีเรียชื่อ *Streptomyces peucetius* ชนิดที่สร้างสีแดงได้ โดยได้ชื่อว่า Doxorubicin และ Daunorubicin โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 3 ความแตกต่างโครงสร้างโมเลกุลของ Doxorubicin และ คือ สายด้านข้างของ Doxorubicin จะปิดด้วยแอลกอฮอล์ แต่ Daunorubicin จะปิดด้วยหมู่เมทิล(methyl) ความแตกต่างนี้มีผลต่อขอบเขตของประสิทธิภาพของยา กล่าวคือยา Doxorubicin จะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม มะเร็งก้อนทุมในเด็ก มะเร็งของเนื้อเยื่ออ่อน และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง แต่ Daunorubicin จะมีประสิทธิภาพในการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันทั้งชนิดมัยอีลอยด์และลิมโฟยด์ แต่ข้อจำกัดการใช้ยาเหล่านี้คือ การเกิดต่อต้อตาของเซลล์มะเร็งและการเกิดพิษต่อเซลล์ปกติในร่างกายเช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น ทำให้เกิดการทํางานของหัวใจที่ผิดปกติ และหัวใจล้มเหลวได้ ปัจจุบันได้มีการแนะนำว่าปริมาณยาสะสมของ Doxorubicin ไม่ควรเกิน 450-600

มิลลิกรัมต่อตารางเมตรของพื้นที่ผิวของร่างกาย(มก./ม²)และ Daunorubicin ไม่ควรเกิน 500 มิลลิกรัมต่อตารางเมตรของพื้นที่ผิวของร่างกาย(7)

ในสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการศึกษาหายากลุ่มแอนทราซัยคลินตัวอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า Doxorubicin และ Daunorubicin โดยให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่มีพิษต่อระบบหัวใจลดลง เช่น Epirubicin, Idarubicin เป็นต้น (7)

จากการศึกษา ในห้องทดลองพบว่า ขนาดยาสะสมที่จะเกิดพิษต่อระบบหัวใจของยา Epirubicin เท่ากับ 935 มก./ม² เทียบเท่ากับยา Doxorubicin 468 มก./ม² แต่การใช้ยา Epirubicin ต้องใช้ขนาดยาที่สูงกว่า Doxorubicin เช่นกัน ปัจจุบันแนะนำปริมาณยาสะสมของ Epirubicin ไม่เกิน 900 มก./ม² การใช้ Epirubicin แทน Doxorubicin จึงไม่ได้ลดความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ(7)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของยากลุ่มแอนทราซัยคลิน (7)

กลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในร่างกายของยาแอนทราซัยคลิน มีดังนี้(8)

- 1) แทรกเข้าไปในสายดีเอ็นเอยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ (intercalate into DNA and inhibition of macromolecule)
- 2) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) นำไปสู่การทำลายดีเอ็นเอและการสลายไขมัน (lipid peroxidation)
- 3) ทำให้สายดีเอ็นเอติดกันและการเชื่อมข้ามสายดีเอ็นเอ (DNA adduction formation and DNA crosslinking)
- 4) เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของสายดีเอ็นเอ (interference with DNA strand separation) helicase activity
- 5) มีผลกับเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง (direct membrane effect)

- 6) ทำให้เกิดการทำลายสายดีเอ็นเอโดยผ่านการยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสทู (topoisomerase II)
- 7) ทำให้เกิดเซลล์ตาย (apoptosis) โดยการตอบสนองของเซลล์ต่อการยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสทู

บทบาทของยาแอนทราซัยคลินและมะเร็งเต้านม

เริ่มมีการนำแอนทราซัยคลินมาใช้ในโรคมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย โดยจุดมุ่งหมายของการรักษาผู้ป่วยระยะแพร่กระจาย คือ ลดอาการเจ็บป่วย, ทำให้โรคดำเนินช้า, เพิ่มคุณภาพชีวิตแก่ผู้ป่วย และ เพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิต

ในช่วงปี ค.ศ. 1986-1989 โดยมีการศึกษาที่เปรียบเทียบการใช้ยา Doxorubicin ตัวเดียว เปรียบเทียบกับการใช้ยาไมโทแซนโทน (Mitoxantone) ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายที่ไม่เคยได้รับยาแอนทราซัยคลินมาก่อน หรือ เคยได้รับแต่หยุดมากกว่า 12 เดือน ผลการศึกษา พบว่า อัตราการตอบสนองของยา Doxorubicin ประมาณ 35-50% และยา Doxorubicin สามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้มากกว่ายา Mitoxantone แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (273 วัน เทียบกับ 268 วัน, $p = 0.4$) (9, 10)

ในปี ค.ศ. 1993 -1995 เริ่มมีการค้นพบยา Paclitaxel เป็นยากลุ่มใหม่ (ยาที่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์) จึงมีการศึกษาที่เปรียบเทียบการใช้ Paclitaxel เปรียบเทียบกับการใช้ Doxorubicin และการให้ยา Doxorubicin ร่วมกับยา Paclitaxel พบว่า อัตราการตอบสนองของกลุ่มที่ได้ยาสองตัวร่วมกันสูงกว่าการได้รับยาตัวเดียว แต่ อัตราการตอบสนองของยา Doxorubicin ใกล้เคียงกับยา Paclitaxel แต่ระยะเวลาการรอดชีวิตทั้งสามกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัด พบมากที่สุดในกลุ่มที่ได้รับยาผสม (11) ในปัจจุบัน จึงนิยมเลือกใช้เลือกให้ยาตัวเดียว มากกว่า ยาสองตัว และ พิจารณาการใช้ยา Paclitaxel ในกลุ่มที่เคยได้ Doxorubicin มาก่อน เมื่อมีการใช้ผู้ป่วยระยะแพร่กระจายได้ผลดี จึงมีการนำยา Doxorubicin มาใช้ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้นโดยพิจารณาให้เป็นการรักษาเสริมเพื่อป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำหลังจากได้รับการรักษาหลักคือ ผ่าตัด

ยาเคมีบำบัดสูตรเริ่มแรกที่เป็นที่ยอมรับของการรักษาเสริมโรคมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้นคือ Classical CMF ซึ่งประกอบด้วยยา 3 ชนิด คือ cyclophosphamide 100 mg/m^2 oral วันที่ 1-14 ของแต่ละรอบ, Methotrexate 40 mg/m^2 และ Fluorouracil 600 mg/m^2 ให้วันที่ 1 และ วันที่ 8 ของแต่ละรอบ ให้ทุก 4 สัปดาห์ ทั้งหมด 6 เดือนโดยมีการศึกษาในปี 1973 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น เปรียบเทียบการใช้ยา oral CMF เป็นเวลา 12 เดือน เปรียบเทียบกับการสังเกตอาการ พบว่าเมื่อติดตามไป 10 ปี กลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัด oral CMF มีการรอดชีวิตโดยปราศจากโรคสูงกว่าที่สูงกว่า

กลุ่มที่สังเกตอาการเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (43.4%เทียบกับ 31.4%, $p < 0.001$) และ อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้เคมีบำบัดมากกว่ากลุ่มที่สังเกตอาการ 55.2% เทียบกับ 47.3% ($P = 0.10$) มีการศึกษาต่อมาที่เปรียบเทียบการให้ oral CMF จำนวน 12 cycles เปรียบเทียบกับการการให้ 6 cycles เมื่อติดตามไป 8 ปีพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของการรอดชีพโดยปราศจากโรคและอัตราการรอดชีพทั้งหมด (12)

เมื่อมีการค้นพบยาDoxorubicin จึงมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการให้ยาผสม คือ Doxorubicin และ Cyclophosphamide กับ ยาสูตร classical CMF โดยมี 2 การศึกษาที่ทำในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง และ กลุ่มที่ไม่มีโรคแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง โดยให้Doxorubicin 60 mg/m^2 Cyclophosphamide 600 mg/m^2 ให้ทุก 3 สัปดาห์ ทั้งหมด 4 รอบ พบว่าไม่มีความแตกต่างของระยะเวลาการอยู่โดยปราศจากการกลับเป็นซ้ำของโรค และระยะเวลาการรอดชีวิตทั้งหมด(13, 14) ทำให้Doxorubicin และ Cyclophosphamideเป็นสูตรมาตรฐานการรักษา มะเร็งเต้านมต่อมา

ต่อมาได้มีการพัฒนาสูตรยาผสมสำหรับมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น โดยมียากกลุ่มแอนทราซัยคลินเป็นส่วนประกอบ เช่น FAC (Fluorouracil, Doxorubicin and Cyclophosphamide), CEF (Fluorouracil, Epirubicin and Cyclophosphamide) เป็นต้น ซึ่งสูตรเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรเดิมเช่น CMF มีประโยชน์ด้านการรอดชีพโดยปราศจากโรค (15, 16) มากกว่าสูตร CMF (15, 16) แต่ปัจจุบันไม่มีข้อมูลการเปรียบเทียบโดยตรงของสูตรยาแอนทราซัยคลินรุ่นใหม่ กับสูตรแอนทราซัยคลินดั้งเดิม คือ Doxorubicin และ Cyclophosphamide

จากข้อมูล meta-analysis ของ Early breast cancer Clinical Trials groups พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการให้เคมีบำบัดหลายตัวที่มี แอนทราซัยคลินเป็นส่วนประกอบ ให้ประโยชน์ด้านลดการเกิดเป็นซ้ำของโรคและ การเสียชีวิตจากมะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการให้ CMF เป็นส่วนประกอบ(HR ประมาณ 0.8; $p < 0.0001$)จึงทำให้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เลือกลงใช้สูตร Doxorubicin และ Cyclophosphamideเป็นสูตรหลักในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น ทั้งในกลุ่มที่มีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองและกลุ่มที่ไม่มีโรคแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง แต่กลุ่มที่มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลืองอาจจะพิจารณายากกลุ่มแทคเซน (Taxane) เพิ่มไปด้วย

บทที่ 3

ผลของแอนทราซัยคลินต่อระบบหัวใจ (Anthracycline induced cardiotoxicity)

เนื่องจากยาแอนทราซัยคลินมีที่ใช้ในมะเร็งหลายชนิด แต่ข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ภาวะเป็นพิษต่อระบบหัวใจที่สัมพันธ์กับปริมาณยาสะสมที่ได้รับ ทำให้การใช้ยากลุ่มนี้จึงต้องมีการระมัดระวังในการติดตามผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับประโยชน์มากที่สุด โดยได้รับผลข้างเคียงน้อยที่สุด

การแบ่งระยะเวลาที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เกิดในระยะสั้น และ กลุ่มที่เกิดอาการระยะยาว

กลุ่มที่เกิดอาการในระยะสั้น (acute to subacute or short term cardiotoxicity) มักเกิดหลังจากการให้ยาครั้งแรก ส่วนใหญ่แสดงอาการเป็นหัวใจเต้นผิดจังหวะ ส่วนใหญ่มักไม่เกิดเป็นภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบเฉียบพลัน หรือ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบเฉียบพลัน จากข้อมูลการศึกษาในประเทศเยอรมันจากกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองที่ได้รับยาเคมีสูตร Doxorubicin พบมีผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจระยะสั้น 55 คน แบ่งเป็น หัวใจเต้นผิดจังหวะแบบ atrial fibrillation 12 คน, กล้ามเนื้อหัวใจและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบเฉียบพลัน 2 คน กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน 1 คน หัวใจล้มเหลวเฉียบพลัน 5 คน (17) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักอาการไม่ถึงแก่ชีวิต เมื่อหยุดยาอาการมักจะดีขึ้นในหนึ่งสัปดาห์

กลุ่มที่เกิดอาการในระยะยาว (chronic cardiotoxicity) กลุ่มนี้เป็นส่วนใหญ่ของผู้ที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน โดยอัตราการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณยาสะสมที่ได้รับ บางรายอาจเกิดอาการและอาการแสดงของภาวะหัวใจล้มเหลวภายใน 1 ปีแรกหลังจากแอนทราซัยคลินครบ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการแสดงหัวใจล้มเหลวอาจเกิดหลังจากได้ยาแอนทราซัยคลินครบตั้งแต่ 4-20 ปี(18) จากการศึกษา meta-analysis เรื่อง anthracycline cardiotoxicity ของ 8 การศึกษา พบว่า เมื่อใช้แอนทราซัยคลิน จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ ทั้งในระดับที่มีอาการ odds ratio [OR] 5.43, 95% CI (2.34-12.62) และ ระดับไม่มีอาการแสดง OR 6.25, 95% CI (2.58-15.13) และจากการวิเคราะห์ 4 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเสียชีวิตจากโรคหัวใจ พบว่าการใช้แอนทราซัยคลิน จะเพิ่มความเสี่ยงการเสียชีวิตจากโรคหัวใจ ถึง 4.94 เท่า (OR 4.94, 95% CI 1.23-19.87) (19)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวเนื่องกับการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ แต่ปัจจัยหลักที่มีความสำคัญมากที่สุด คือ ปริมาณยาสะสมที่ได้รับ มีการศึกษาย้อนหลังในผู้ป่วย 399 ราย พบว่าการเกิดภาวะพิษต่อหัวใจจากยาDoxorubicin สัมพันธ์กับปริมาณยาที่ได้รับ ภาวะพิษต่อหัวใจจะเพิ่มสูงอย่างรวดเร็ว เมื่อได้รับปริมาณยาสะสมมากกว่า 550 mg/m² อัตราการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวเมื่อได้รับปริมาณยาสะสม 500-550 mg/m² มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ และ เพิ่มอย่างรวดเร็วเป็นมากกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณยาสะสม 551-600 mg/m² และเพิ่มเป็นมากกว่า 36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณยาสะสมมากกว่า 600 mg/m² (20, 21) จึงเป็นที่มาของการแนะนำไม่ให้ปริมาณยาสะสมของ Doxorubicin ไม่ให้เกิน 500 mg/m² ปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ที่มีผล เช่น อายุมากกว่า 70 ปี, เป็นโรคความดันโลหิตสูงอยู่เดิม, การเป็นโรคตับ, การเป็นโรคหัวใจอยู่เดิม เช่น ลิ้นหัวใจรั่ว หรือ กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด หรือ หัวใจเต้นผิดจังหวะ, การเคยฉายได้รับรังสีรักษาบริเวณหน้าอกมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเต้านมด้านซ้าย ซึ่งเป็นบริเวณของหัวใจ, การได้รับยาเคมีบำบัดหลายชนิดร่วมกัน (18)

เนื่องจากปัจจุบันมีการใช้ยารักษาโรคมะเร็งแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) โดยในโรคมะเร็งเต้านมมีการค้นพบยาต้านเฮอรัท (trastuzumab, trastuzumab) ซึ่งถือว่าเป็นการเปลี่ยนโฉมหน้าการรักษารโรคมะเร็งเต้านมและสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีพในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีเฮอรัทได้ทั้งในระยะแพร่กระจายและระยะเริ่มต้น (22-24) แต่ยา trastuzumab นี้มีผลข้างเคียงที่สำคัญคือ พิษต่อระบบหัวใจ ในการศึกษาแรกของนายแพทย์ Denis Slamon พบว่าการใช้ยา trastuzumab ร่วมกับยาDoxorubicin ทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลว มากกว่าการใช้ยา trastuzumab ร่วมกับยาเคมีบำบัดสูตรอื่นๆ เช่น Paclitaxel โดยการให้ Doxorubicin ร่วมกับยา trastuzumab พบว่าภาวะหัวใจล้มเหลวถึง 16% แต่เมื่อใช้ Paclitaxel ร่วมกับ trastuzumab พบภาวะหัวใจล้มเหลวเพียง 2 % และในการศึกษานี้พบว่า กลุ่มที่ได้แต่ Doxorubicin มีภาวะหัวใจล้มเหลวเพียง 3% กลุ่มที่ได้แต่ Paclitaxel มีภาวะหัวใจล้มเหลว 1% (24) จึงทำให้ปัจจุบันแนะนำให้ trastuzumab หลังให้ยา Doxorubicin ครบแล้ว เพื่อลดการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวจากยา trastuzumab

กลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากแอนทราซัยคลิน

เนื่องจากกลไกที่แอนทราซัยคลินทำลายเซลล์มะเร็ง คือ แทรกเข้าไปในสาย ดีเอ็นเอ ในช่วงแบ่งตัว ทำให้ ดีเอ็นเอ หลุดเป็นชิ้น และ ยับยั้งการสร้างโปรตีนโมเลกุลใหญ่, ทำให้เซลล์ตาย และ ที่สำคัญคือ ทำให้เกิด อนุมูลอิสระ (toxic oxygen free radical) ทำให้เกิดการสลายของไขมัน เป็นต้น

ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ แต่เชื่อกันว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ คือการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งทำให้เกิด oxidative stress. และ การสลายตัวของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิด vacuolation, การแทนที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยเส้นใย (fibrous tissue) ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจถูกทำลายอย่างถาวรและ กลไกเกี่ยวข้องกับการ apoptosis (25)

การอธิบายเรื่องกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจในระดับเซลล์ เรื่อง แอนทราซัยคลินทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตาย (anthracycline induced myocyte cell death) (26)

จากการตัดชิ้นเนื้อของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในมนุษย์หลังให้ยาแอนทราซัยคลินภายในหนึ่งชั่วโมง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีการบวมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial swelling) และ การหดตัวของสายโครมาติน (chromatin contraction) ซึ่งเป็นสิ่งแสดงถึงการตั้งเวลาเกิดเซลล์ตาย (apoptosis) มีการทดลองที่ทำในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เพาะเลี้ยง พบว่า การเกิดเซลล์ตายสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยาแอนทราซัยคลิน โดยกลไกเซลล์ตายจะแตกต่างกันตามปริมาณความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นต่ำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะตายจาก apoptosis ถ้าความเข้มข้นสูงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะตายจาก necrosis ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในสัตว์และมนุษย์ที่พบว่า เซลล์มีการตายแบบ apoptosis ตั้งแต่เริ่มได้รับแอนทราซัยคลิน

สิ่งสำคัญที่เป็นศูนย์กลางการเกิดพิษต่อระบบหัวใจอีกหนึ่งกลไก คือ เรื่อง cellular oxidative stress เมื่อเซลล์ได้รับแอนทราซัยคลิน จะเพิ่มการสร้าง reactive oxygen species(ROS) เช่น เมื่อได้รับแอนทราซัยคลิน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จะเพิ่มการสร้าง Hydroxyl radical formation และสามารถถูกยับยั้งเมื่อได้รับ Superoxide dismutase, catalase และ Iron chelator e.g. Dexrazoxane (Dexrazoxane) แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายแบบ necrosis จะไม่ถูกยับยั้งด้วย antioxidant เหล่านี้ ในหนูทดลองที่มีการแสดงออกของ Manganese Superoxide Dismutase มากกว่าปกติ จะป้องกันการทำลายไมโทคอนเดรีย และลดระดับการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ (27)

Cellular stress หรือ จำเพาะว่าเป็น oxidative stress กระตุ้น host kinase pathway ที่มีความสำคัญต่อการดำเนินของเซลล์ และ pathway เหล่านี้ควบคุม การตอบสนองของหัวใจต่อการได้รับแอนทราซัยคลิน โดย Mitogen/stress Activated Protein Kinases (MAPKs and SAPKs) เป็นตัวที่ทำให้เกิด apoptosis หลังได้รับแอนทราซัยคลิน MAPKs นำสัญญาณจากนอกเซลล์ จากตัวรับที่ถูกกระตุ้น ไปสู่โปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น transcriptions factor เพื่อควบคุมการแสดงออกของ

ยืนโดยตรง หรือ ความคุมหน้าที่อื่นของเซลล์ เช่น การอยู่รอด(survival) การเจริญเติบโต (proliferation) และ การตาย (apoptosis) ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

จากภาพที่ 4 ERK ถูกกระตุ้นด้วย growth factor และ ส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ SAPKs, JNK และ p38 ถูกกระตุ้นโดย cellular stress และ สัมพันธ์กับการเกิด apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดย Reactive Oxygen Species สามารถกระตุ้น pathway เหล่านี้ได้ Akt เป็น serine/threonine kinase ที่สนับสนุนสัญญาณที่ยับยั้ง apoptosis ส่งผลให้รอดชีวิตของเซลล์ Akt อยู่ที่cytosol ในภาวะ catalytically inactive state โดย ได้รับการกระตุ้นจาก growth factor เช่น Insulin like growth factor-1 (IGF-1), Epidermal growth factor(EGF), interleukin-3, interleukin-6 and neuregulin PI3K/Akt pathway สามารถเพิ่มการทำงานให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดระยะสั้นๆได้ ดังนั้นในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับแอนทราซัยคลิน สัญญาณของ PI3K/Akt pathway ลดการเกิด anthracycline induced apoptosis ได้

Pathwayอื่นที่เกี่ยวข้องกับ anthracycline induced apoptosis เกี่ยวข้องกับpathway ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เกี่ยวกับ Bax, chromosome c และ caspase-3 หลังจากได้รับยาแอนทราซัยคลิน cytochrome C ซึ่งปกติอยู่ในmitochondria จับกับเยื่อหุ้มชั้นใน เมื่อcytochrome C ออกมา จะทำปฏิกิริยากับ Apaf-1 และ procaspase-9 ทำให้เกิด caspase-9 ซึ่งไปกระตุ้น caspase-3 ทำให้สาย ดีเอ็นเอ หลุดเป็นชิ้น และ เกิด apoptosis การเกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hydrogen peroxide ทำให้ cytochrome c ถูกปล่อยออกมา ดังนั้นเกิด anthracycline induced myocyte apoptosis ได้

ระดับของBax ที่เพิ่มขึ้น นำไปสู่การสร้าง mutlimers, ทำให้ไมโทคอนเดรียอยู่นิ่ง (stabilize mitochondria) และ เพิ่มการปล่อย cytochrome C ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดจาก แอนทราซัยคลิน จะมีการเพิ่มของอัตราส่วน Bax/Bcl-2 เหมือนกับapoptosis ที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดที่ได้เลือดกลับมาเลี้ยงใหม่

เนื่องจากยาแอนทราซัยคลินเป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการคลายตัวของสาย DNA ยาแอนทราซัยคลินจึงมีผลต่อการทำลายสาย DNA และทำให้การเติบโตของเซลล์หยุดชะงัก ใน G1 และ G2 ทำให้เกิด apoptosis ตามมาได้

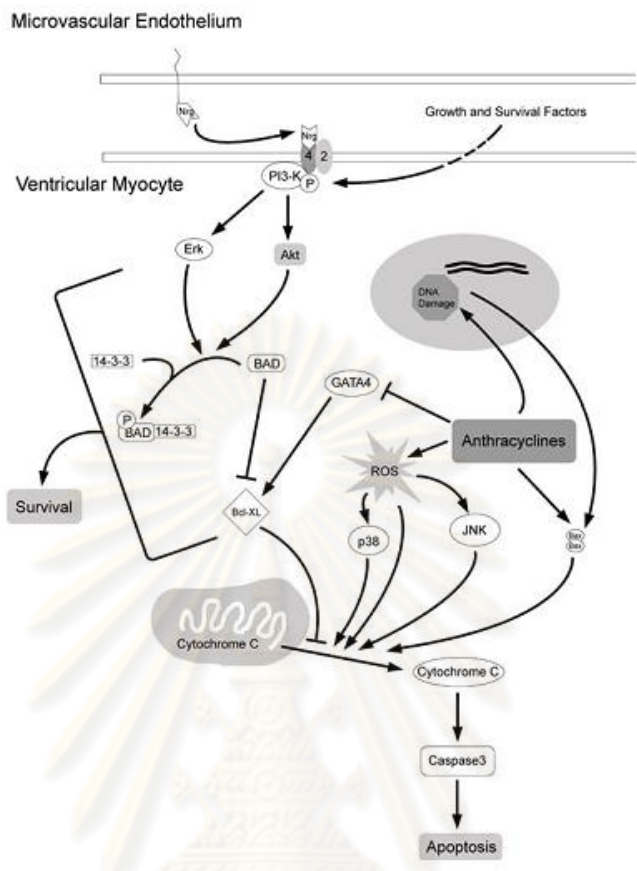
อีกกลไกหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ ลดการสร้างโปรตีนซาร์โคเมอร์ริค (sarcomeric protiens) การลดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง sarcomere สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์ได้

GATA4 เป็นสมาชิกของ Zinc Finger transcription factor มีความสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์, การสร้างซาร์โคเมอร์ และสัญญาณการอยู่รอดของเซลล์ GATA4 มีในหัวใจ ควบคุมยีนหลายชนิดที่จำเพาะกับหัวใจ รวมถึงยีนที่ต้านการ apoptosis ด้วย GATA4 เป็น ปัจจัยอยู่รอดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เปลี่ยนไปหลังจากตอนแรกเกิด และ เป็นตัวกระตุ้นด้านการ apoptosis ของ ยีน Bcl-XL ยีนที่ควบคุมโดย GATA4 เช่น cardiac adriamycin-responsive protein (CARP) atrial natriuretic peptide และ alpha myosin heavy chain จะลดลงหลังได้ยาแอนทราซัยคลิน จึงน่าจะมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอนทราซัยคลินและ GATA4 และเช่นเดียวกับ Zinc finger transcription factor ทั่วไป การจับของ ดีเอ็นเอ ของ GATA4 ถูกยับยั้งโดยการสร้าง ROS

ข้อสังเกตอื่น ๆ ที่น่าสนใจเกี่ยวกับ oxidative stress และ anthracycline cardiotoxicity มีดังนี้

- การแสดงออกที่มากเกินไปของ Metallothionein ซึ่งเป็นตัวทำลาย free radical จากการศึกษานี้พบว่ามีผลลดการเกิด anthracycline induced cardiotoxicity ได้(28)
- การยับยั้งการสร้าง Peroxynitrite ซึ่งเป็น reactive oxidant ที่สร้างจาก Nitric oxide และ Super oxide สามารถเพิ่มการทำงานของหัวใจในหนูทดลองที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจบาดเจ็บจากยาแอนทราซัยคลินได้(29)
- Dexrazoxane เป็นสารที่จับเหล็กได้แน่นหนา (potent iron chelator) ซึ่งสามารถป้องกันการบาดเจ็บของหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินได้ เนื่องจาก จับกับ Iron ซึ่งเป็น cofactor สำหรับ free radical (รายละเอียดของ Dexrazoxane อธิบายในหัวข้อ)(30)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4 แสดงวิธีการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน (26)

การป้องกันการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

เมื่อทราบถึงกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินแล้ว การศึกษาต่อมาจึงเน้นที่การหาวิธีป้องกันการบาดเจ็บต่อหัวใจ ซึ่งนอกเหนือไปจากการจำกัดปริมาณยาสะสมไม่เกินที่กำหนดแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีอื่นๆ เช่น

- วิธีการให้ยา
- การปรับโครงสร้างของยา เช่น Epirubicin, liposomal form of Doxorubicin
- การให้ยา Derazoxane
- การให้ยา Beta Blocker
- การให้ยา Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs)

วิธีการให้ยา (infusion protocol)

จากการศึกษา meta-analysis มี 4 การศึกษาที่เปรียบเทียบการให้แอนทราซัยคลิน (Doxorubicin และ Epirubicin) แบบให้อย่างรวดเร็ว (bolus) กับ การให้เดินยาอย่างช้าๆ (continuous infusion) พบว่า การให้อย่างรวดเร็วเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดพิษต่อระบบหัวใจแบบมีอาการ และ ไม่มีอาการ odd ratio 4.13 (95% CI 1.75,9.42 p = 0.001;) และ odd ratio 3.04 (1.66, 5.58; p < 0.0001) ตามลำดับ แต่การให้ทั้งสองวิธี ไม่มีความแตกต่างของการตอบสนองของหัวใจ และ การรอดชีวิตของผู้ป่วยในแต่ละการศึกษา (19) แต่ในการปฏิบัติจริง การให้แอนทราซัยคลินแบบเดินยาช้าๆ ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และ ต้องให้ยาทางเส้นเลือดใหญ่ ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงการติดเชื้อมากกว่าประโยชน์ที่ได้รับ

การปรับโครงสร้างของยา

Epirubicin เป็นยาเคมีบำบัดกลุ่มแอนทราซัยคลินที่ถูกพัฒนาเพื่อลดการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาในกลุ่มนี้ เมื่อเทียบ mg ของ Epirubicin ต่อ mg ของ Doxorubicin จะพบว่าการเกิดพิษต่อระบบหัวใจต่ำกว่า Doxorubicin จากการศึกษาค้นคว้า meta-analysis มี 9 การศึกษาที่เปรียบเทียบการให้ Epirubicin กับ Doxorubicin พบว่า Epirubicin ลดการเกิดพิษต่อหัวใจได้ทั้งในระดับมีอาการ และ ไม่มีอาการ odd ratio 0.39 (95% CI 0.2,0.78) p = 0.429 และ 0.30 (95% CI 0.16, 0.57) ตามลำดับ องค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดให้ปริมาณยาสะสมของ Epirubicin ไม่เกิน 900 mg/m² (19)

แต่มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับปริมาณยาสะสมของ Epirubicin โดยพิจารณาตามความเสี่ยงอื่นๆ ของการเกิดโรคหัวใจของผู้ป่วย เนื่องจากปริมาณยาสะสมที่แนะนำไม่ควรเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจเกินกว่า 5% เมื่อพิจารณาร่วมกับความเสี่ยงอื่นๆ โดยทำในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายที่ได้รับยา Epirubicin จำนวน 1,097 คน พบว่ามีผู้ป่วย 11.4% เกิดพิษต่อระบบหัวใจ เมื่อพิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่นๆของผู้ป่วย เช่น อายุ, ความเสี่ยงอื่นๆของการเกิดโรคหัวใจ เช่น การสูบบุหรี่ การเป็นเบาหวาน ความดันโลหิตสูง การเป็นโรคอ้วน, ประวัติการได้ยาต้านฮอร์โมน หรือ ยาเคมีบำบัดสูตรอื่นมาก่อน จะพบว่าปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจจะต่ำกว่า 900 mg/m² ดังตาราง (31)

Patient characteristics	Age at epirubicin start, y			
	40	50	60	70
Patients treated with first-line epirubicin as the only risk factor for CHF: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease†: no	806/844	739/782	673/722	609/665
Patients also treated previously with antihormonal drugs† for metastatic disease: Previous antihormonal therapy: yes Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	626/670	561/610	496/552	434/496
Patients also treated previously with CMF for metastatic disease: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF treatment: yes Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	864/883	828/850	793/818	759/786
Patients also treated previously with antihormonal drugs and CMF: Previous antihormonal therapy: yes Previous CMF treatment: yes Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	769/790	734/757	699/725	665/694
Patients also treated previously with mediastinal irradiation‡: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: yes Predisposition to heart disease: no	NA/640	NA/581	NA/523	NA/467
Patients also with predisposition to heart disease‡: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: yes	491/539	427/481	364/424	303/369

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อภาวะหัวใจล้มเหลว 5% ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย ที่ ECOG PS < 2 มีการแพร่กระจายอวัยวะในร่างกายมากกว่า 1 อวัยวะ และ ไม่เคยได้รับยาเคมีบำบัดเสริมในมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้น (31)

Patient characteristics	Age at epirubicin start, y			
	40	50	60	70
Patients treated with first-line epirubicin as the only risk factor for CHF: Previous antihormonal therapy†: no Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease‡: no	890	835	783	732
Patients also treated previously with CMF for metastatic disease: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF treatment: yes Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	908	878	848	820
Patients also treated previously with antihormonal drugs† for metastatic disease: Previous antihormonal therapy: yes Previous CMF treatment: no Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	723	670	620	571
Patients also previously treated with adjuvant CMF: Previous antihormonal therapy: no Previous CMF for metastatic disease: no Previous CMF as adjuvant for primary tumor: yes Previous mediastinal irradiation: no Predisposition to heart disease: no	917	865	815	767

* The epirubicin dose is evaluated for patients with performance status more than 2 and two or more metastatic sites. CHF = congestive heart failure; CMF = cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil.
† The antihormonal treatment was for metastatic disease was tamoxifen until 2000, where aromatase inhibitors became first choice in treatment for relapse.
‡ History of diabetes mellitus, hypertension arterialis, thyrotoxicosis, obstructive lung disease, alcoholism, or obesity.

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณยาสะสมที่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อภาวะหัวใจล้มเหลว 5% ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย ที่ ECOG PS > 2 มีการแพร่กระจายอวัยวะในร่างกายมากกว่า 2 อวัยวะ (31)

ปัจจุบัน จึงแนะนำให้พิจารณาปริมาณยาสะสมสูงสุดของ Epirubicin ตามปัจจัยของผู้ป่วย คืออายุ และ ความเสี่ยงการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว

Liposomal encapsulation of Doxorubicin การทำให้อยู่ใน liposomal form ทำให้ยา มี ประสิทธิภาพใกล้เคียงเดิม แต่สามารถลดปริมาณยาที่จะไปทำให้เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ทำให้ผู้ป่วย เกิดพิษต่อระบบหัวใจน้อยกว่าDoxorubicin (32-34) ในการศึกษา meta-analysis เมื่อเปรียบเทียบ liposomal Doxorubicin กับ Doxorubicin พบว่าการเกิดภาวะพิษต่อหัวใจน้อยกว่า ทั้งในระดับที่มี อาการและ ไม่มีอาการแสดง Odd ratio 0.18 (0.08, 0.38) และ 0.30 (0.20, 0.46) ตามลำดับ (19)

Dexrazoxane เป็น ตัวจับเหล็กที่คล้าย EDTA (EDTA liked iron chelator) ซึ่งจะป้องกัน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไม่ให้ถูกทำลายจากแอนทราซัยคลิน Dexrazoxane ไม่มีผลกับการสลายตัวของ ยาแอนทราซัยคลินโดยตรง แต่ป้องกันเกิดพิษต่อระบบหัวใจโดยจับกับเหล็ก (Fe^{2+}) ที่ถูกปล่อย ออกมาจากในเซลล์หลังจากเกิดการสลายไขมัน (lipid peroxidation) (30) จากการศึกษา meta-analysis มี 5 การศึกษาที่เปรียบเทียบการให้ Dexrazoxane กับไม่ให้ ร่วมกับเคมีบำบัด Doxorubicin หรือ Epirubicin พบว่าสามารถลดการเกิดพิษต่อระบบหัวใจทั้งในระดับที่มีอาการและ ไม่มีอาการ odd ratio เท่ากับ 0.21 (0.13, 0.33) และ 0.30 (0.18, 0.49) ตามลำดับ(19) จากข้อมูล ของ Cochrane Database เพื่อศึกษาการป้องกันการเกิดพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน พบว่า มี 6 การศึกษาที่เกี่ยวข้อง Dexrazoxane สามารถลดการเกิดผลข้างเคียงต่อระบบหัวใจได้(Relative Risk (RR) = 0.28, 95% Confidence Interval (CI) 0.18 to 0.42, $P < 0.00001$). ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการตอบสนองระหว่างกลุ่มที่ได้และไม่ได้ Dexrazoxane (RR = 0.88, 95% CI 0.77 to 1.01, $P = 0.06$), แต่มีข้อสังเกตว่าผู้ป่วยที่ได้รับ Dexrazoxane จะมีการตอบสนองของโรคมะเร็งต่อยาน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ จากการวิเคราะห์การอยู่รอดโดยรวม ไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้และไม่ได้ Dexrazoxane ผู้ป่วยส่วนใหญ่ของการศึกษานี้เป็นโรคมะเร็ง เต้านมระยะแพร่กระจาย (35) นอกจากนี้ผลในการ ป้องกันหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน ของDexrazoxane จะพบเมื่อได้ปริมาณยาสะสม มากกว่า 300 mg/m^2 ซึ่งผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายส่วนใหญ่จะได้อัตราแอนทราซัยคลินก่อนที่ปริมาณ ยาสะสมมากกว่า 300 mg/m^2

อ้างอิง ASCO (American Society of Clinical Oncology) Guidelines ปี 2008 เรื่องการใช้ยา ป้องกันผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัด (36)

การใช้ Dexrazoxane พิจารณาในกรณีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายที่ได้รับ Doxorubicin ที่ปริมาณสะสมมากกว่า 300 mg/m² และคาดว่าผู้ป่วยยังได้รับประโยชน์จากยา Doxorubicin อยู่ โดยการติดตามการทำงานของหัวใจควรเริ่มทำเมื่อปริมาณสะสมของ Doxorubicin มากกว่า 400 mg/m² และติดตามเมื่อปริมาณยาสะสมเพิ่มมากกว่าเดิมทุกๆ 50 mg/m² และควรหยุดใช้ทั้ง Dexrazoxane และ Doxorubicin เมื่อการทำงานของหัวใจลดต่ำกว่าค่าปกติในแต่ละสถาบัน กำหนด โดยปริมาณของ Dexrazoxane ให้เทียบเป็นอัตราส่วน 10:1 ของ Doxorubicin ให้ทางหลอดเลือดดำอย่างรวดเร็ว หรือ ให้ในเวลา 15-30 นาที ก่อนให้ Doxorubicin

Beta-Blocker มีข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าการให้ carvediol อาจจะช่วยป้องกันการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินได้ จึงมีการศึกษาที่ทำในมนุษย์ โดยนำผู้ป่วย 50 คนที่มีแผนการให้แอนทราซัยคลิน (ทั้ง Doxorubicin และ Epirubicin) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือให้ยา carvediol 12.5 mg/day ก่อนให้เคมีบำบัดและให้ต่อเนื่องจนครบ 6 เดือน ในช่วงที่รับเคมีบำบัด 6 เดือน เปรียบเทียบกับอีกกลุ่มที่ได้รับยาหลอก พบว่ากลุ่มที่ได้ยาหลอกมีผู้เสียชีวิต 5 คนและได้รับยา carvediol เสียชีวิต 1 คน ผู้ป่วยที่หลังได้รับยา มีการบีบตัวของหัวใจต่ำกว่า 50% ในกลุ่มที่ได้ carvediol 1 คน และ กลุ่มยาหลอก 5 คน ค่าเฉลี่ยการทำงานของหัวใจในกลุ่มที่ได้ยา carvediol ก่อนและหลังให้ยา ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (70.5 vs. 69.7; p = 0.3) แต่ในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกมีการทำงานของหัวใจที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (68.9 vs. 52.3; p < 0.001) เนื่องจากเป็นการศึกษาขนาดเล็ก และไม่มีการควบคุมขนาดยาแอนทราซัยคลินที่ให้ และเป็นยา 2 ชนิดคือ Doxorubicin และ Epirubicin จึงยังไม่สามารถให้ carvediol เป็นมาตรฐานในการป้องกันการเกิดพิษต่อหัวใจได้ จำเป็นต้องรอข้อมูลการศึกษานานใหญ่ต่อไป (37)

Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) มีการศึกษาที่ทำในผู้ป่วยมะเร็งที่ ได้รับยาเคมีบำบัดขนาดสูงหลายชนิด ที่ทำให้ troponin I เพิ่มขึ้นหลังได้รับยา โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับยา enalapril 20 mg/day และ กลุ่มที่ได้รับยาหลอกมีผู้ป่วยที่มีระดับ troponin I สูงกว่าปกติ จำนวน 114 คน โดยอยู่ในกลุ่ม enalapril 56 คน อยู่ในกลุ่มยาหลอก 58 คน โดยเริ่มให้ enalapril หลังให้ยาเคมีบำบัด 1 เดือน ให้ระยะเวลา 1 ปี โดยเป้าหมายการศึกษาคือ การลดลงของการทำงานของหัวใจมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มที่ได้ยาหลอกมีการทำงานของหัวใจลดลงมากกว่ากลุ่มที่ได้ enalapril อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (38) แต่เนื่องจากการศึกษานี้มีทั้งยาที่ไม่ใช่กลุ่มแอนทราซัยคลินร่วมด้วย จึงจำเป็นต้องรอข้อมูลการศึกษานานใหญ่ต่อไป

การประเมินการทำงานของหัวใจก่อนและระหว่างการรักษายาแอนทราซัยคลิน

การตรวจติดตามการทำงานของหัวใจ ก่อน ระหว่างและหลังให้ยาแอนทราซัยคลิน มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เทียบเท่ากับการควบคุมปัจจัยเสี่ยงอื่นๆของโรคหัวใจ เช่น การควบคุมความดันโลหิต และการควบคุมระดับไขมัน วิธีการที่ใช้ประเมินการทำงานของหัวใจมีดังนี้ (39)

การตรวจคลื่นเสียงสะท้อนการทำงานของหัวใจ (echocardiography)

การตรวจด้วยรังสีนิวเคลียร์ (radionuclide angiography)

การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (electrocardiography)

การตรวจหัวใจด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (cardiac magnetic resonance imaging)

การตรวจเลือดหาระดับการทำงานของหัวใจ (serum cardiac biomarker)

การตัดชิ้นเนื้อกล้ามเนื้อหัวใจ (endomyocardial biopsy)

การตรวจคลื่นเสียงสะท้อนของหัวใจ(echocardiogram)

เป็นการตรวจที่สามารถประเมินได้ทั้งความสามารถการบีบตัวและคลายตัวของหัวใจ (systolic and diastolic function) การวัดการเปลี่ยนแปลงในการคลายตัวของหัวใจเป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของหัวใจที่มีความไวสูงสุด สามารถวัดได้ในรูปแบบ E/A ratio (peak early atrial/ peak atrial late velocities) และเทคนิคอื่นๆ การวัดความเร็วของ early diastolic, strain and strain rate แต่ปัจจุบันการใช้คลื่นเสียงสะท้อนของหัวใจเพื่อวัดการบีบตัวของหัวใจในช่วงการรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นวิธีการตรวจที่นิยมใช้มากที่สุด แต่การตรวจวิธีนี้ขึ้นกับประสบการณ์ของผู้ทำการตรวจในการปฏิบัติและการแปลผล

การตรวจด้วยรังสีนิวเคลียร์ (radionuclide angiography, MUGA scintigraphy)

เป็นการตรวจการบีบตัวของหัวใจโดยใช้สารนิวเคลียร์ สามารถตรวจซ้ำได้ และไม่ขึ้นกับผู้ปฏิบัติ การตรวจ MUGA scintigraphy ถือเป็นมาตรฐานในการตรวจการทำงานของหัวใจคู่กับการตรวจคลื่นสะท้อนเสียงหัวใจ แต่ข้อจำกัดคือ ไม่สามารถประเมินการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของกล้ามเนื้อหัวใจได้, ไม่สามารถตรวจการคลายตัวของหัวใจได้ และ ผู้ป่วยได้รับสารรังสีนิวเคลียร์

การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (electrocardiography)

เป็นการตรวจที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง สามารถประเมินการนำไฟฟ้าของหัวใจที่ผิดปกติได้ เช่น repolarization, QT prolongation และ ภาวะที่หัวใจทำงานผิดปกติได้ (cardiomyopathy) แต่ หลักฐานการใช้คลื่นไฟฟ้าหัวใจในการประเมินผลข้างเคียงจากเคมีบำบัดค่อนข้างน้อย เพราะ ความจำเพาะค่อนข้างต่ำ

การตรวจหัวใจด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (cardiac magnetic resonance imaging)

เป็นวิธีการที่เชื่อถือได้และสามารถทำซ้ำได้ในการประเมินโครงสร้างการทำงานของหัวใจ ตั้งแต่หลอดเลือดแดงของหัวใจ เยื่อหุ้มหัวใจ และสามารถคำนวณการบีบตัวของหัวใจได้ เมื่อใช้ ร่วมกับการฉีด Gadolinium สามารถ แสดง จุดของ กล้ามเนื้อหัวใจ ที่ถูกทำลายอย่างถาวร ในระดับ เล็กน้อยได้ เอ็กซเรย์แม่เหล็กไฟฟ้าจึงเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในการตรวจโรคหัวใจ รวมถึงการประเมิน การทำงานของหัวใจจากยาเคมีบำบัดด้วย แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องรอหลักฐานที่เพียงพอต่อไปข้อจำกัดที่สำคัญคือ ราคาแพง เครื่องยังมีจำนวนจำกัด และห้ามทำการตรวจในผู้ป่วยที่มีโลหะในร่างกาย

การตรวจระดับการทำงานของหัวใจจากในเลือด (serum cardiac biomarker)

การวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของหัวใจจากเลือด เป็นวิธีการที่น่าสนใจมาก เนื่องจาก สามารถทำได้โดยการเจาะเลือดตรวจ และ มีการแปรผันตามผู้ตรวจค่อนข้างต่ำ มีการตรวจหลายชนิด ได้แก่

Troponin T หรือ Troponin I สัมพันธ์กับความรุนแรงการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจถูกทำลายใน ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบเฉียบพลัน

Natriuretics peptide (N-terminal pro brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide และ atrial natriuretic peptide) มีการใช้ตรวจการเกิดและระดับความรุนแรงของการเกิด ภาวะหัวใจล้มเหลว เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อมีการยืดของผนัง กล้ามเนื้อหัวใจ จึงมีการนำมาศึกษาในภาวะพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน จึงขอยกตัวอย่าง บางการศึกษาของ natriuretic peptide และ troponin ดังนี้

Suzuki และคณะ ได้ศึกษา serum B-type Natriuretic Peptide และ echocardiogram ก่อนและหลังให้ยาแอนทราซัยคลินในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือด 27 คน โดย ค่าเฉลี่ยขนาดยาแอนทรา ซัยคลินที่ได้รับ 221.4 ± 53.7 mg/m² พบว่าหลังจากให้ยา ค่าเฉลี่ยของ B-type Natriuretic Peptide เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากก่อนให้ยา 31.1 ± 7.16 และหลังให้ยาเพิ่มเป็น 58.1 ± 12.8

pg/ml [normal reference <19 pg/ml]) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่ามีค่าความแตกต่างของ LVEF ก่อนและหลังให้ยา (40)

Dodos และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคหัวใจหลายชนิดที่ได้รับยาเคมีบำบัดที่มีแอนทราซัยคลินเป็นส่วนประกอบ จำนวน 100 คน โดยทำการตรวจ troponin T และ NT-pro-BNP ร่วมกับการตรวจ echocardiogram ก่อนและหลังจากให้ยา พบว่าค่าเฉลี่ยของ LVEF หลังให้ยาลดลงต่ำกว่าก่อนให้ยา และ ไม่มีผู้ป่วยรายใดเลยที่มีการเพิ่มขึ้นของ Troponin T เกินกว่าค่าปกติ (> 0.1 ng/ml) และ ค่าเฉลี่ยของ NT-Pro-BNP ก่อนและหลังให้ยา ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (41)

Meinardi และคณะ ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคหัวใจเต้านมที่ได้รับยา Epirubicin จำนวน 40 คน โดยปริมาณยาสะสมของ Epirubicin 360-450 mg/m² พบว่าหลังจากได้รับยาไป 1 ปีมีการเพิ่มขึ้นของระดับ N-terminal atrial natriuretic peptide (NT-ANP) และ brain natriuretic peptide (BNP) อย่างชัดเจนก่อนและหลังให้ยา (42)

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น troponin อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการเป็นตัวแสดงพิษต่อหัวใจ และ ความเป็นไปได้ที่ใช้ natriuretic peptide เป็นตัวแสดงถึงการเกิดพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน จึงมีการศึกษาที่ทำในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 50 คนที่ได้รับยา Doxorubicin พบว่าความชุกการเกิดภาวะพิษต่อระบบหัวใจจากยา Doxorubicin ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นพิษระดับที่หนึ่ง 17.4 เปอร์เซ็นต์ พิษระดับที่สอง 3.8 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบผู้ป่วยที่มีระดับพิษต่อหัวใจระดับที่สามและสี่เลย และได้ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า NT-Pro-BNP ในเลือดกับการเกิดต่อระบบหัวใจจากยา พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า NT-Pro-BNP ในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ หลังจากได้รับยา 3 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ (ภาคผนวก ก.)

แต่ข้อจำกัดของ NT-proBNP ที่สำคัญ คือ มีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อ NT-proBNP เช่น ภาวะอ่อน ภาวะความดันโลหิตสูง การทำงานของไตที่ลดลง เป็นต้น และยังมีค่า ที่บอก ขอบเขต สูงสุดที่ชัดเจน (cut off level)

การตัดชิ้นเนื้อกล้ามเนื้อหัวใจ (endomyocardial biopsy)

เป็นวิธีการประเมินการเกิดพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน มีความไวและความจำเพาะสูงสุด ลักษณะที่จำเพาะจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คือ vacuolar

degeneration of sarcoplasmic reticulum, การบวมและกระจัดกระจายของไมโทคอนเดรีย (swelling and disruption of mitochondria) และ การเรียงตัวไม่เป็นระเบียบของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ (disorganization and disruption of myofibrils/ myofibrillar protein) (43) แต่เป็นวิธีการที่มีความเสี่ยงสูง ต้องใช้เข็มเข้าทางสายเส้นเลือดดำ อาศัยเครื่องมือและผู้ที่มีประสบการณ์ ยังไม่สามารถทำได้ในทุกโรงพยาบาล

ในปัจจุบันจึงนิยมใช้การตรวจอัลตราซาวด์หัวใจ หรือ การตรวจทางนิวเคลียร์ เพื่อประเมินการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายแทน

การรักษา

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่จำเพาะสำหรับภาวะหัวใจล้มเหลวจากยาแอนทราซัยคลิน ข้อมูลทั่วไปอ้างอิงจากการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลวทั่วไป การใช้ยา Angiotensin converting enzyme หรือ Beta blocker นั้นยังไม่มีข้อมูลชัดเจน ปัจจุบันจึงเน้นไปที่การป้องกัน โดยจำกัดปริมาณยาสะสมของแอนทราซัยคลิน และ ติดตามผู้ที่มีภาวะการบีบตัวของหัวใจลดลงมากกว่าปกติ ในระยะที่ยังไม่มีอาการแสดงต่อไป ในระยะยาว

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิธีการอณูชีววิทยาที่นำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิก

การศึกษาเกี่ยวกับพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในระดับโมเลกุล เริ่มจากการศึกษาในหนูทดลอง มุ่งเน้นไปที่การศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene expression) โดยวิธีที่ศึกษาที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction จึงแสดงหลักการเบื้องต้นของวิธีการทางอณูชีววิทยาวิธีนี้ อนึ่งหลักการของวิธีการทำไมโครเอเรย์จะกล่าวในภาคผนวก

หลักการของการทำ Real time Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain reaction (PCR) คือปฏิกิริยาการสร้างสายนิวคลีโอไทด์ต่อไปเรื่อยๆ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้วิธีการของ PCR หลักการในทางทฤษฎี คล้ายๆกับ การสร้างสายDNA (Deoxyribonucleic Acid replication) ภายในเซลล์ กล่าวคือ เป็นวิธีการที่ เอนไซม์ DNA polymerase สร้าง DNA จาก DNA ต้นแบบ โดยการต่อสาย primer (Oligonucleotide primer) แต่กระบวนการ PCR อาศัย oligonucleotide primer 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะ จับเข้าคู่ (hybridize) หรือ anneal กับ DNA เส้นตรงข้ามกัน เนื่องจาก primer จะหันปลาย 3'-OH ของ primer เข้าหากัน ถ้ามี เอนไซม์ DNA polymerase อยู่ด้วย จะเกิดการสร้าง DNA ขึ้น โดยต่อปลายจาก primer ทั้งสองเส้น ตาม DNA ต้นแบบ จนกระทั่งสุดปลายเทมเพลต (template) โดยการสร้าง DNA เกิดได้ทิศทางเดียว คือ จาก 5' ไป 3' ผลที่ได้คือ DNA เส้นคู่ใหม่ที่เกิดจาก DNA เส้นที่เป็นเทมเพลต การสร้าง DNA ทำซ้ำได้อีก คือ นำปฏิกิริยามาทำให้อุ่น (90-95 องศาเซลเซียส) ก็จะเป็นการแยกสาย DNA เส้นคู่ที่ได้ใหม่ ให้กลายเป็นเส้นเดี่ยว ถ้าวัดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสม คือที่อุณหภูมิที่ primer จะเข้าไปจับเข้าคู่กับสาย DNA เป้าหมาย (target DNA) ทั้งเส้นเก่าและเส้นที่สร้างใหม่ จากนั้นก็จะเกิดการสร้าง DNA โดย DNA polymerase โดยอาศัยวิธีการทำเป็นรอบๆซ้ำๆกัน คือ ทำให้ DNA กลายเป็นเส้นเดี่ยว ให้ primer เข้าไปจับสาย DNA เป้าหมายและการต่อสายหรือสร้าง DNA โดย DNA polymerase ในที่สุดจะได้ DNA เพิ่มเป็นทวีคูณ (44)

โดยสรุป ขั้นตอนการทำ PCR มี 3 ขั้นตอนคือ (45)

1. Denaturation คือที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นการทำลายพันธะของนิวคลีโอไทด์ ทำให้สาย DNA ที่มีวนเกลียวอยู่แยกออกเป็นสองเส้นตรงแยกจากกัน และที่อุณหภูมินี้ ปฏิกิริยาจากเอนไซม์ในปฏิกิริยาก่อนหน้าจะหยุดลงหมด

2. Annealing ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเพื่อให้ primer เกาะติดกับเทมเพลต เพื่อให้เตรียมตั้งต้นต่อสายคู่ของเทมเพลต

3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase ทำให้มีการนำเบสต่างๆมาต่อด้าน 3' ของโดยต่อให้เข้ากันกับลำดับของเบสบนสายเทมเพลต ที่ primer เกาะไว้นั่นเอง

ธรรมชาติปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา มาสร้างเป็นกราฟเข้ากับเวลา จะได้กราฟรูปตัว S กล่าวคือในช่วงแรกจำนวนผลิตภัณฑ์จะเพิ่มไม่มาก เรียกว่า lag phase แต่เมื่อเพิ่มจำนวนมากถึงระดับหนึ่ง จำนวนผลิตภัณฑ์จะเพิ่มแบบทวีคูณ เรียกว่า exponential phase และเมื่อเพิ่มถึงระดับหนึ่ง ไม่มี primer หรือ DNA polymerase เหลืออยู่ผลิตภัณฑ์ จะเพิ่มน้อยมาก จนเกือบเป็นเส้นตรง เรียกว่า plateau phase ดังภาพ



รูปที่ 5 แสดงจำนวนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประดับหนึ่งของเวลา

Real time PCR

การที่เราสามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงๆ ทำให้สามารถติดตามช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณได้

ความแตกต่างระหว่าง Conventional PCR กับ Realtime PCR

ในปฏิกิริยา PCR แบบธรรมดา เราไม่สามารถรู้ว่าเกิดอะไรระหว่างทาง เราต้องประมาณเองว่า ต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่รอบ จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เพียงพอต่อการวัด และต้องมีการ run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดูทั้งปริมาณและขนาดของผลิตภัณฑ์หลังสิ้นปฏิกิริยา

แต่ใน Realtime PCR เราสามารถติดตามปฏิกิริยาได้ตลอดระยะที่ดำเนินปฏิกิริยาอยู่ สามารถกำหนดจุดที่จะเก็บข้อมูลที่จะนำมาวิเคราะห์ภายหลังได้ นอกจากนี้เรามีวิธีพิสูจน์ผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธีดู melting curve หลังสิ้นปฏิกิริยา โดยไม่ต้องนำมา run gel อีก

ข้อดีของ Real time PCR

- สามารถติดตามผลได้ขณะเกิดขึ้นจริง
- ไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR
- การทำงานแต่ละรอบมักจะเร็วกว่าแบบธรรมดา
- วัดผลได้มากถึง 10^{10} เท่า (wider dynamic range)
- วัดความแตกต่างได้ถึงขั้นที่แตกต่างกันเพียง 1 เท่า
- สามารถตรวจยืนยันผลิตภัณฑ์ได้ด้วย melting point
- มีความจำเพาะสูงสุด ไวที่สุด และสามารถทำซ้ำได้มากที่สุด
- สำหรับงานทาง RNA ใช้ปริมาณ RNA ตั้งต้นน้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1,000 เท่า
- ค่าใช้จ่ายไม่ได้แพงกว่าการทำ PCR แบบดั้งเดิม

ข้อด้อยของ Real time PCR

ยังไม่ดีที่สุดสำหรับ Multiplexing

การเริ่มต้นต้องการความชำนาญและการสนับสนุนดูแล

เครื่องมือราคาสูง

มีความผันแปรภายในและภายนอก (intravariation and internal variation)ค่อนข้างสูง

ส่วนประกอบของ Real time PCR

1. Generic dye based ใช้สารสีที่สามารถจับกับ DNA ทั่วๆไปได้
2. Probe based ใช้ probe ซึ่งเป็นสาย DNA เส้นเดียวที่มีลำดับที่เรากำหนดแล้วติดด้วยสารเรืองแสง (fluorophore) ลักษณะต่างๆกันออกไป มีการออกแบบ probe ชนิดเหล่านี้มากมาย เพื่อเอื้อต่อการตรวจวัดโดย Real time PCR เช่น Taqman probe, Molecular Beacons, Light Cyclers เป็นต้น

การแบ่งประเภทของ probe สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.1 hydrolysis probes

2.2 Hybridization probes

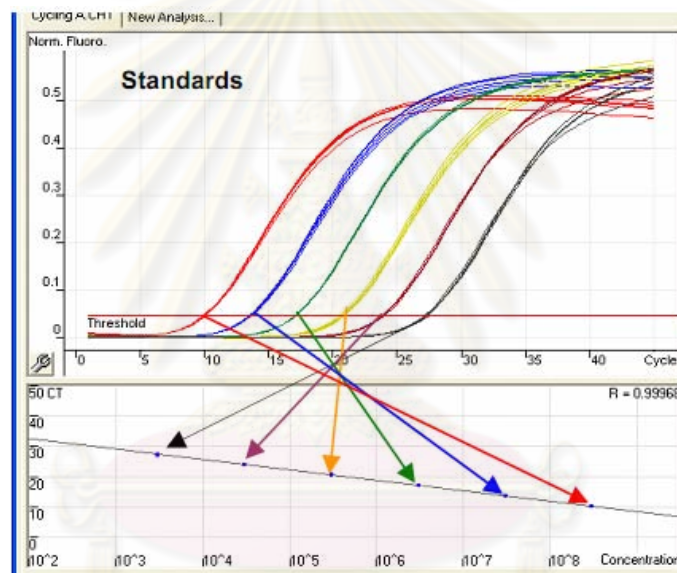
2.1 Hydrolysis probes เช่น Taqman, Beacon และ scorpion ในสาย oligonucleotide เส้นเดียว มีทั้งตัวระงับสัญญาณ (quencher fluorophore) และตัวบันทึกสัญญาณ (reporter fluorophore) อยู่บนเส้นเดียว ในภาวะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ตัว quencher จะดูดซับพลังงานของ reporter ไว้ แต่เมื่อมีการเพิ่มลำดับสายที่เราต้องการ (amplify target sequence) polymerase ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ 5'-exonuclease activity จะไฮโดรไลซ์ probe ทำให้เกิดการแยกตัวของ reporter และ quencher ดังนั้น fluorescence ของ fluorophore จะถูกวัดได้ ในระหว่างแต่ละรอบของ PCR แสง fluorescence จะเพิ่มขึ้น เนื่องจาก จำนวน reporter ที่เป็นอิสระสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ

2.2 hybridization probes เช่น light cyclers probe ลักษณะนี้เป็นเส้นคู่ เส้นหนึ่งติดไว้ด้วย donor fluorophore ที่ปลายสาย 3' อีกเส้นมี acceptor fluorophore ติดอยู่ เมื่อสองเส้นอยู่ใกล้กัน (ภายใน 1-5 nucleotide) donor fluorophore จะกระตุ้น acceptor fluorophore ทำให้เกิดสัญญาณ fluorescent (FRET-fluorescent Resonance Energy Transfer) ที่สามารถวัดได้ ในช่วง annealing phase และ ช่วงต้น extension phase ของ PCR reaction ในแต่ละรอบของ PCR cycle จะมีการ anneal โดย hybridization probe มากขึ้น ทำให้สัญญาณ fluorescence เพิ่มขึ้น

ลักษณะการใช้งาน Real time PCR

มี 2 ชนิด

1.การวิเคราะห์ปริมาณ มีพื้นฐานที่การวัด fluorescence ของตัวเปล่งแสง ในปฏิกิริยาเชิงปริมาณ เราสามารถติดตามการเพิ่มของผลิตภัณฑ์ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกรอบระหว่าง PCR (s-shape curve) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆ ทำโดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด สัญญาณในช่วง exponential phase สัมพันธ์กับปริมาณเทมเพลตเป้าหมาย (target template) ตั้งต้น ดังภาพที่ 4.3 แสดง standard 5 เมื่อนำความเข้มข้นมา plot เป็นกราฟจะได้กราฟเส้นตรง ทำให้เทียบหาความเข้มข้นของ unknown ซึ่ง amplify โดยใช้ภาวะเดียวกันได้

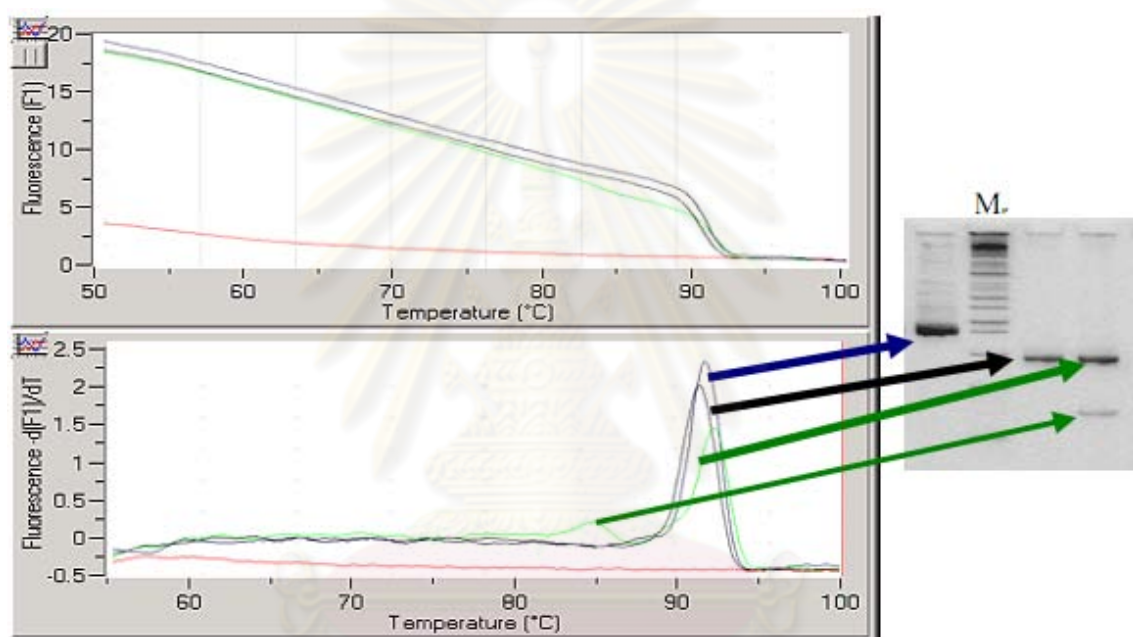


รูปที่ 6 แสดงการวัดปริมาณ fluorescence จาก standard ใน Real time PCR

กราฟเส้นตรงที่ได้ แสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ standard ณ ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา

2.การวิเคราะห์ melting curve analysis เป็นการใช้เพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น โดยมักจะทำทันทีหลังจากจบ PCR โดยกำหนดให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 95 องศาเซลเซียส และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา จะพบว่าสัญญาณจะค่อยๆ ลดลงดังแสดงในรูปที่ 4.4 ด้านบน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เป็นสายคู่แยกตัวออกจากกัน ซึ่ง DNA จากผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด จะมีอุณหภูมิสลาย (melting temperature) เฉพาะตัว คือจุดที่คู่เบสของ นิวคลีโอไทด์ที่แยกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างฉับพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นอยู่กับความยาวและปริมาณของ G และ C เบส ที่มีใน DNA แต่ละชนิด

ดังนั้นจึงสามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ปนเปื้อนได้ ดังตัวอย่างในภาพที่ 4.4 เมื่อ software นำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ที่แต่ละอุณหภูมิมาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง dF/dT กับอุณหภูมิตั้งในกรอบล่างของรูป 4.4 จะได้เป็นรูป peak สำหรับผลิตภัณฑ์แต่ละตัว ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80°C) ในขณะที่ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะหรือ การเข้าคู่ของ primer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า ดังนั้น melting curve analysis ของผลิตภัณฑ์ PCR จึงมักใช้เพื่อยืนยันว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้องมีการ run gel electrophoresis หลังจากการ PCR



รูปที่ 7 แสดงการวัด fluorescence จาก PCR product

เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ ในกรอบบน และเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น dF/dT จะได้กราฟดังรูปในกรอบล่าง ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting temperature ของ PCR product แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้

ลักษณะของการวัดปริมาณใน real-time PCR

Absolute quantification: ใช้ เทมเพลตที่ทราบความเข้มข้นสร้าง standard curve เพื่อหาค่าของ unknown, standards ต้องมีการวัดปริมาณอย่างถูกต้องแม่นยำ ใช้ได้ดีกับการหาปริมาณไวรัส

Relative quantification: มีได้หลายลักษณะ เช่นเทียบสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมหรือสัดส่วนความเปลี่ยนแปลงระหว่าง calibrator กับ unknown แต่หลักการคือจะได้ผลเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลง (fold change) ไม่ใช่ค่าความเข้มข้นที่แท้จริง

Comparative quantification (Normalization): เป็นการเทียบเทมเพลตเป้าหมายกับ reference gene ในระบบนั้นๆ เป็นการควบคุมภายใน (Internal control) โดยทั่วไปจะใช้ housekeeping gene ที่มีมาก และสม่ำเสมอ แต่ควรทำการทดสอบ endogenous control ที่เลือก ว่าเหมาะสมหรือไม่ ก่อน หรืออาจใช้มากกว่า 1 ตัว

Multiplexing: คือการเพิ่มจำนวนเป้าหมายมากกว่า 1 ชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งสามารถทำได้ทั้งใน generic dye based และ probes based โดยในลักษณะแรก เช่น การใช้ SYBR green I ใช้วิธีเลือก different melting points ของเป้าหมายแต่ละตัว ส่วนใน probes based ใช้ fluorophore ต่างๆกันสำหรับเป้าหมายแต่ละตัว (FAM, TET, VIC and JOE) ซึ่งในปัจจุบันเว็บไซต์ต่างๆของผู้ผลิต Real-time chemistries มักจะมีรายละเอียดให้ว่าควรใช้ donor และ acceptor คู่ไหนสำหรับงานอะไร

วิธีการเลือกใช้เทคนิคใน real-time PCR

SYBR Green: มีข้อด้อยคือไม่ specific ต้องเสียเวลา optimize ,ต้องทำ melting point curve determination, amplicon ยาวทำให้ signal มากขึ้น ,อาจทำ multiplex ได้หากทำร่วมกับ melting point analysis ไม่ควรเลือกใช้ SYBR Green กับ allelic discrimination assays, multiplex reaction (แต่ถ้าออกแบบดีอาจทำได้ แต่ไม่ง่าย), การ amplify rare transcripts, การตรวจหา pathogen ที่มีปริมาณน้อยๆ

Assay Development (การเริ่มพัฒนา assay)

- เลือก sequence
- เลือก primer และ probe
- เลือก quencher dye และ internal reference
- ตั้งค่าสำหรับ thermocycler

Assay Validation (การตรวจสอบ assay)

- ทดสอบ primer pair ทุกคู่กับ probe ด้วย known template (plasmid clone, sDNA, RNA)
- ใช้ assay conditions มาตรฐาน คือ 300-400 nM primers, 100 nM probe, 3mM MgCl₂
- ใช้ dilution ต่างๆ ของ template (อาจเป็น sDNA, sRNA หรือ total RNA) เพื่อสร้าง standard curve
- Correlation coefficient ของ standard curve ควรจะมากกว่า 0.99
- ถ้า slope ของ standard curve ของ primer pair ที่ดีที่สุด คือ ประมาณ -3.5 ให้เพิ่ม MgCl₂ เป็น 5 mM
- ถ้า slope สูงกว่า -3.6 ให้เปลี่ยน primers (เพราะ efficiency จะน้อยกว่า 0.8957)
- Assay ที่ดีที่สุดจะต้องมี slope = -3.3 (efficiency = 1.0092)

Real-time PCR systems ที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน

- ABI Prism 7900HT Sequence Detection System
- BioRad iCycler
- Corbett Research Rotor-Gene 3000
- SmartCycler
- MJ Research Chromo4
- Idaho Technology Rapid Cycler
- Roche LightTyper & LightCycler
- Stratagene Mx3000P
- Stratagene Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System

บทที่ 5

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาระดับโมเลกุลเรื่องพิษของแอนทราซัยคลินต่อระบบหัวใจ ข้อมูลเกือบทั้งหมดเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ยังไม่ชัดเจน

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย Genetic susceptibility of cardiotoxicities from Doxorubicin in breast cancer patients ซึ่งได้มีการทดลองทำ microarray เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในผู้ป่วยกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ พบมียีนที่แสดงออกทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ผู้วิจัยเลือกศึกษายีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ โดยยีนที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) มีจำนวน 5 ยีน ยีนที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) มีจำนวน 55 ยีน ดังนี้ (รายละเอียดของผลไมโครแอเรย์อยู่ในภาคผนวก)

	ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)	ยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)
รายชื่อยีน	CBWD7 C8ORF58 FLJ46836 HS.575465 LOC644612	ACADVL C2ORF47 C8ORF58 CBWD7 CEACAM8 DAP FANCB FLJ45513 FLJ46836 GPN3 HBM HS.105791 HS.130048 HS.132585 HS.519750 HS.545780 HS.575465 KTELC1 LNX1 LOC100132369

		LOC100133005
		LOC100134773
		LOC342979
		LOC391205
		LOC401351
		LOC401622
		LOC441964
		LOC642237
		LOC644268
		LOC644612
		LOC644841
		LOC645689
		LOC645941
		LOC730994
		MAP1LC3A
		MIR326
		MIR663B
		NR2C2
		PHB
		POLDIP3
		PRR11
		PSMB10
		RBM3
		RFX1
		RNF169
		SELS
		SLC38A5
		STX12
		SYPL1
		SYT11
		TMEM123
		TRRAP
		TSEN15

- ตารางที่ 5 แสดงรายชื่อยีนที่มีการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ผู้วิจัยเลือกศึกษา ยีน ACADVL (Acyl CoA deficiency , very long chain) เนื่องจากโปรตีนของยีนนี้ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์สลายชั้นแรกของเบต้าออกซิเดชันที่ไม่โตคอนเดรียของกรดไขมันสายยาวที่มีความยาวสายคาร์บอน 14 ถึง 20 สาย(5) ซึ่งไมโตคอนเดรียเป็นหนึ่งในตำแหน่งของกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน

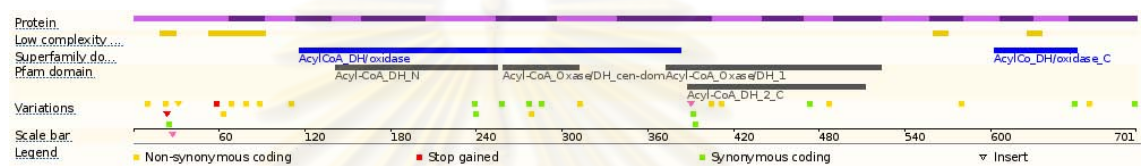
โครงสร้างของยีน ACADVL (46)

ชื่อเต็ม Acyl CoA dehydrogenase, very long chain [Homo Sapiens]

ชนิดของยีน เป็นยีนที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็นโปรตีนได้ (Protein Coding) มี โปรตีน 3 รูปแบบ ได้แก่

ACADVL 001 มี 20 exons ความยาว 2,312 basepairs มี amino acid 701 ตัวจาก mRNA

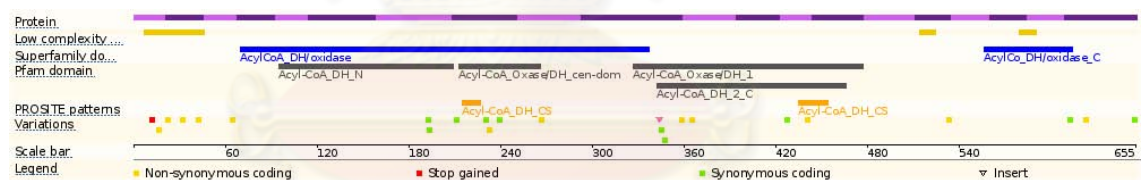
[NM_000018.2](#) ตรงกับ mitochondrial isoform1 precursor



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของโปรตีน ACADVL 001

ACADVL 201 มี 20 exons ความยาว 2,287 basepairs มี amino acid 655 ตัวจาก mRNA

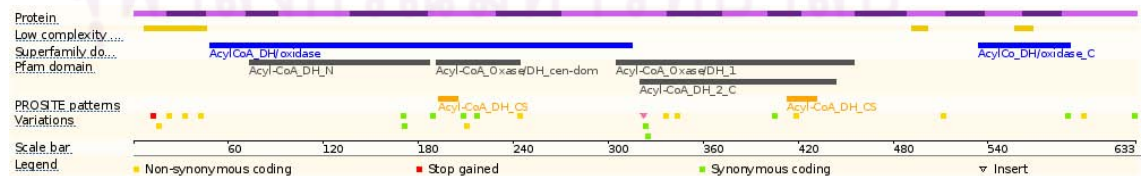
[NM_001033859.1](#) ตรงกับ mitochondrial isoform2 precursor



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างของโปรตีน ACADVL 201

ACADVL 202 มี 19 exons ความยาว 2,221 basepairs มี amino acid 633 ตัวจาก mRNA

[AK056083.1](#) ตรงกับ mitochondrial isoform2 precursor



รูปที่ 10 โครงสร้างของโปรตีน ACADVL 202

โดยผู้ที่ขาดโปรตีนนี้มีอาการแสดง 3 ชนิด คือ

1. severe early onset, cardiac and multiorgan failure ส่วนใหญ่มีอาการในช่วงอายุ 1 เดือนแรกโดยมีอาการโรคหัวใจเด่นเช่น hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, pericardial effusion และ arrhythmias การให้การดูแลอย่างใกล้ชิด ปรับอาหารให้เหมาะสม อาจทำให้การเรียนรู้ของเด็กเป็นปกติได้
2. hepatic or hypoketotic hypoglycemia ส่วนใหญ่เริ่มมีอาการในวัยเด็กตอนต้น โดยมีภาวะ hypoketotic hypoglycemia, hepatomegaly โดยไม่มีอาการแสดงทางระบบหัวใจ
3. later onset episodic myopathic form มักแสดงอาการเป็น rhabdomyolysis เป็นพักๆ, กล้ามเนื้อเกร็งกระตุก และ ปวดเมื่อย ไม่ค่อยมีภาวะ hypoglycemia

Pathophysiology ของ ACADVL กับ mitochondrial fatty acid oxidation

Fatty acid oxidation spiral เป็นชุดของ 4 ปฏิกิริยาที่เกิดในไมโทคอนเดรียแมทริกซ์ โดยมีเอนไซม์ 4 ชนิดของ Acyl CoA dehydrogenase ที่มีความแตกต่างกัน แต่มีการคาบเกี่ยวของสารตั้งต้น ได้แก่

- short chain acyl CoA dehydrogenase (SCAD) ใช้ C4-C6 fatty acyl-CoAs
- medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) ใช้ C6-C10 fatty acyl-CoAs
- long chain acylCoA dehydrogenase (LCAD) ใช้ C10-C14 fatty acyl-CoAs
- very long chain acylCoA dehydrogenase (VLCAD) ใช้ C14-C20 fatty acyl-CoAs

SCAD, MCAD และ LCAD เป็นโปรตีนที่เป็น homotetramers ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรียแมทริกซ์ แต่ VLCAD เป็นโปรตีน heterodimer ซึ่งอยู่ที่ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย โปรตีนทั้ง 4 ชนิด มีกรดอะมิโนเหมือนกัน 40% ภายใน catalytic domain, ทั้ง 4 ชนิด ใช้ flavin adenine dinucleotide เป็น electron acceptor cofactor

การใช้พลังงานจากไขมันเป็นจุดที่สำคัญสำหรับการปรับตัวตามธรรมชาติ เช่น เมื่ออยู่ในครรภ์มารดา ทารกได้รับพลังงานจากน้ำตาลผ่านทางรก แต่เมื่อคลอดออกมาจะได้รับพลังงานจากนมแม่ซึ่งมีไขมันเป็นส่วนประกอบถึง 60% ดังนั้นไขมันจึงเป็นพลังงานหลักโดยเฉพาะอย่างยิ่งอวัยวะที่สำคัญคือ หัวใจที่มีการใช้พลังงานจากไขมันเป็นส่วนใหญ่ และอวัยวะอื่นๆ ที่มีการใช้

ออกซิเจนสูงเช่นไต หรือ กล้ามเนื้อลายเนื่องจากกระบวนการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากแอนทราซัยคลิน เริ่มที่ไมโตคอนเดรียก่อน ดังนั้น ตำแหน่งโปรตีนของยีนนี้ที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย โปรตีน อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับยาได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

วัสดุและวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and Sample)

ประชากรเป้าหมาย คือ ผู้ป่วยหญิงไทยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งเต้านม

ประชากรตัวอย่าง หมายถึง ผู้ป่วยหญิงไทยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งเต้านมทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอกที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่รักษาด้วยยาเคมีบำบัด Doxorubicin ร่วมกับ Cyclophosphamide (AC regimen) ตั้งแต่ พ.ศ. 2552 ถึง พ.ศ. 2553

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้หญิงอายุ ≥ 18 ปี
2. ECOG 0 หรือ 1
3. ได้รับการยืนยันด้วยผลทางพยาธิวิทยาเป็นมะเร็งเต้านม
4. มีการทำงานของหัวใจอยู่ในเกณฑ์ปกติ (LVEF $> 50\%$)
5. มีการทำงานของไขกระดูกอยู่ในเกณฑ์ปกติ (Hb $> 10\text{mg/dl}$, ANC $> 1,500$, platelet $> 100,000$)
6. มีการทำงานของไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ (CCr $> 60\text{ ml/min}$)
7. ยินยอมเข้าร่วมการศึกษา (Inform consent)

เกณฑ์ในการคัดเลือกรับการศึกษา (Exclusion criteria)

1. เคยได้รับยา Anthracycline มาก่อน
2. โรคหัวใจ เช่น หัวใจขาดเลือด, ภาวะหัวใจล้มเหลว, ลิ้นหัวใจผิดปกติที่มีอาการชัดเจน, หัวใจเต้นผิดจังหวะที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติ, มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มหัวใจมากจนเกิดอาการผิดปกติ, เคยมีภาวะหัวใจขาดเลือดที่มี Q wave, หรือมีความเห็นจากอายุรแพทย์โรคหัวใจว่ามีภาวะใดภาวะหนึ่งที่ไม่เหมาะสมกับการใช้ยาที่มีผลต่อการทำงานของหัวใจ
3. โรคความดันโลหิตสูงที่ไม่สามารถควบคุมได้ (Diastolic pressure $> 100\text{ mmHg}$ or Systolic pressure $> 200\text{ mmHg}$)
4. ตั้งครรภ์

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากการศึกษาลักษณะที่ตรวจหาพลาสมาเอ็มอาร์เอ็นเอ ไม่เคยมีการตรวจในมนุษย์มาก่อน การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง จึงไม่สามารถคำนวณขนาดตัวอย่างได้ จึงวางแผนที่จะเก็บขนาดตัวอย่างประมาณ 50 คน โดยเลือกจากจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่มาตรวจรับบริการในหน่วยมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงเวลา 6-8 เดือน

การสังเกตและการวัด(Observation and measurement)

ตัวแปรการวิจัยและวิธีการ

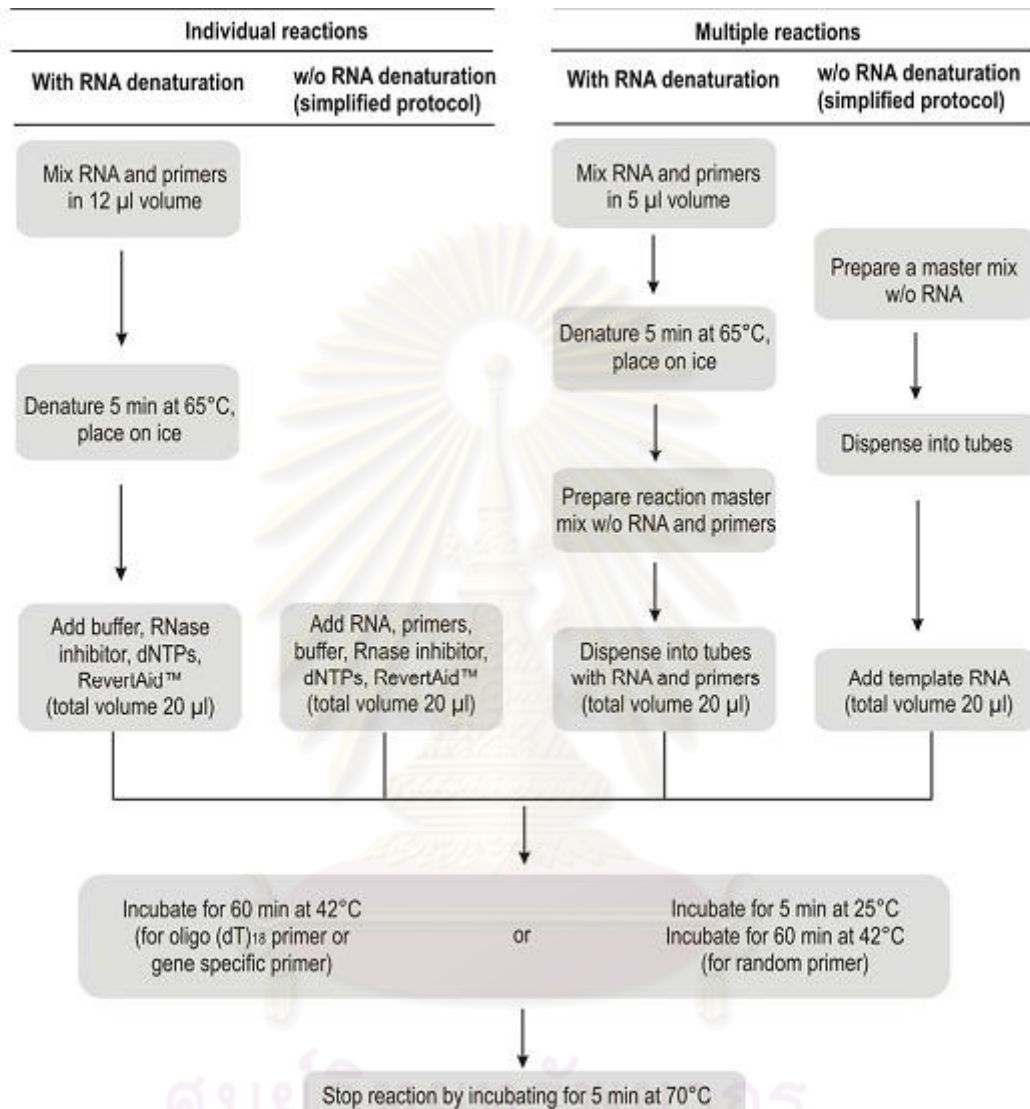
1.ระดับไบโอมาร์คเกอร์ ในพลาสมา คือ ปริมาณของ mRNA ของยีน ACADVL โดยวัดจากการทำ real time polymerase chain reaction โดยเลือกตัวอย่างเลือดผู้ป่วยในกลุ่มที่เกิดพิษต่อหัวใจ จำนวน 3 คน และ กลุ่มไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจำนวน 3 คน โดยจะนำเลือดของผู้ป่วยทั้ง 6 คน ก่อนและหลังให้ยาครั้งแรกที่ 3 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัวอย่าง มาศึกษาการแสดงออกของยีนเป็นกลุ่มแรกก่อน จากนั้นจึงจะศึกษากลุ่มตัวอย่างอื่นๆต่อไป มีขั้นตอนดังนี้

1.1 การเก็บเลือดผู้ป่วย จากเลือด EDTA tube 2 หลอด นำมาปั่น centrifuge ที่ 1,600 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 16 องศา นำพลาสมา ที่ได้ใส่หลอดใหม่ นำมาปั่น centrifuge ที่ 1,600 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศา หลังจากนั้นนำพลาสมาที่ปั่นครั้งที่ 2 มา 1.6 ml ผสมกับ trizol solution 2 ml แล้วผสมให้เข้ากันทันที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัด RNA (47)

1.2 การสกัด RNA(RNA extraction) นำพลาสมาผสม trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) ที่เตรียมไว้มาเติม Chloroform 0.4ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 12,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนบนของที่ปั่นใส่หลอดทดลองใหม่ และเติม 70% ethanol ลงไปในปริมาณที่เท่ากัน นำสารที่ผสมใหม่เติมลงใน RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany) ส่วนของ RNeasy Mini Column และล้าง column ตามคำแนะนำของผู้ผลิต แล้วทำ on-column DNase Digestion ด้วย RNase-Free DNase Set เพื่อละลายแยก RNA ให้เติม RNase free water ลงใน RNeasy column และ incubate เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่น column เป็นเวลา 1 นาที ที่ 16,000g และ ทำการละลายแยก RNA อีกครั้งหนึ่งโดยใช้สารที่แยกได้จากครั้งแรก และเก็บ RNA ที่สกัดไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ทำโดยการใช้เครื่อง Fermentas Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit เครื่องมือนี้เป็นเครื่องมือที่มีระบบในการสร้าง cDNA จาก mRNA หรือ RNA ทั้งหมด อย่างสมบูรณ์ มีการใช้เอนไซม์ RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase เอนไซม์นี้ทำงานที่ 42-50 องศาเซลเซียส สามารถสร้าง cDNA ได้ถึง 13 kb และมี recombinant RiboLock™

RNAse Inhibitor ซึ่งสามารถป้องกันการสลายตัวของRNA ที่อุณหภูมิได้ถึง55องศาเซลเซียส โดยวิธีการทำดังภาพ



รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนRNAให้เป็นDNAโดยเครื่อง RevertAID

ขั้นตอนโดยละเอียดดังนี้

1.3.1. เตรียมสิ่งเหล่านี้ลงในหลอดทดลอง sterile, nuclease free

Template RNA (total RNA)	0.1 ng-5 µg
Primer Oligo(dT)18 primer	1 µL
Water, nuclease-free to	12 µL
รวมปริมาตรทั้งหมด	12 µL

1.3.2 เตรียมส่วนผสมประกอบเหล่านี้ตามลงไป

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock™ RNase Inhibitor(20 U/ µL)	1 µL
10 nM dNTP Mix	2 µL
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ µL)	1 µL
รวมปริมาตรทั้งหมด	20 µL

ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่น

สำหรับ oligo(dT)18 หรือ gene specified primer cDNA synthesis, เก็บที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที

สำหรับ random Hexamer primed synthesis อบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วยการอบที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที

และจบปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.4 Real time Polymerase Chain reaction (Real time PCR) ใช้เครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) โดยใช้

ส่วนผสมของปฏิกิริยา Real time PCR

cDNA จาก reverse transcription	0.5 ng/mL
50mM MgCl ₂ final concentration	1.5 mM
10 mM dNTP	0.2mM
10X buffer	1X
Taq polymerase	1 unit (0.2 microL)
Evagreen (Dye)	0.8 µL
10 microM primer Forward	
10 microM primer reverse	

โดย primer ของยีน GAPDH (ใช้เป็น internal control of RNA) มีดังนี้

primer GAPDH Forward : from 5'->3' : CCG-CAT-CTT-CTT-TTG-CGT-CG

primer GAPDH Reverse : from 5'->3' : GCC-CAA-TAC-GAC-CAA-ATC-CGT

โดยเลือก primer ของยีน ACADVL 2 primer โดยมีโครงสร้างดังนี้

primer ACADVL1 Forward: from 5'-> 3': TCT-GGA-CAA-GTC-AGA-TTC-CCA-CC

primer ACADVL1 Reverse: from 5'->3' : GCC-TTT-GAA-CAT-TCC-CAC-AG

primer ACADVL2 Forward : from 5'->3" : ACA-CAA-GAA-GGG-GAT-TGT-C

primer ACADVL 2 Reverse : from 5'->3" : CCC-TCA-CTC-AGG-GAT-CTT

(primer สร้างจากโปรแกรม primer3 โดยเลือก exon ของยีน ACADVL ที่ลำดับเบสตรงกับ probe ใน microarray โดย

primer ACADVL1 มาจาก probe ที่ 1 ตรงกับ exon 3 ของยีนเอซีเอดีวีแอล

primer ACADVL2 มาจาก probe ที่ 3 ตรงกับ exon 18 ของยีนเอซีเอดีวีแอล

แล้วนำไปเข้าโปรแกรม primer 3 แล้วตรวจสอบด้วยการ blast จาก www.pubmed.com เพื่อยืนยันความจำเพาะของ primer ของยีน ACADVL)

สภาวะของตัวกำหนดรอบอุณหภูมิใน Real time PCR (condition of RT PCR thermocycler):

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Cycling: 1) denaturation เป็นการทำลายพันธะระหว่างนิวคลีโอไทด์ ทำให้สาย DNA แยกเป็นสองสายเดี่ยว ในปฏิกิริยาจะมี primer, dNTPs, PCR buffer และ taq polymerase โดยกำหนดทำที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที

2) annealing ให้ oligonucleotide primer เข้าไป anneal กับ cDNA โดยกำหนดทำที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที

3) extension เอนไซม์ polymerase ทำงานโดยนำเบสต่างๆมาต่อด้าน 3' ของ primer เพื่อสร้างสาย DNA เส้นใหม่จาก 5'->3' โดยกำหนดทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ปฏิบัติซ้ำข้อ 1-3 จะเกิดซ้ำกัน 60 รอบ

จะได้ข้อมูลของ standard curve เพื่อนำมาคำนวณปริมาณ RNase P gene และ จะถูกวิเคราะห์ด้วย software จาก 7500 software

2. การตรวจการทำงานของหัวใจด้วยคลื่นเสียง (Echocardiogram) ตรวจในผู้ป่วยที่เข้าร่วม

การศึกษาทุกราย โดยตรวจครั้งที่ 1 คือ ก่อนเริ่มยาแอนทราซัยคลิน และ ครั้งที่ 2 คือ หลังจากได้ยา

ครั้งที่ 4 ภายใน 3 สัปดาห์ ก่อนที่จะเริ่มการรักษาอื่นๆต่อไป ตรวจโดยอายุรแพทย์โรคหัวใจและหลอดเลือดเพียงท่านเดียวตลอดการศึกษา ใช้เครื่องอัลตราซาวด์หัวใจห้อง จีอี (GE) รุ่น Vivid-7 ใช้ M-modeในการวัดค่า parameter ต่างๆ

การตรวจวัดการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย (Left ventricular ejection fraction, LVEF) วัดโดย Teicholtz, long axis view

การตรวจความสามารถในการบีบตัวของหัวใจห้องล่าง Fraction shortening คำนวณจากค่า Left ventricular end diastolic dimension (LVEDD) Left ventricular end systolic dimension โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Fraction shortening} = \frac{\text{LVEDD} - \text{LVESD}}{\text{LVEDD}} \times 100 \%$$

นิยามผลข้างเคียงต่อระบบหัวใจตาม NCI-CTC Version 2.0

- Grade I คือ ไม่มีอาการภาวะหัวใจวาย และ LVEF ลดลงสุทธิมากกว่าหรือเท่ากับ 10% แต่ลดลงไม่มากกว่า 20% จากค่าพื้นฐาน หรือ FS น้อยกว่า 30% แต่มากกว่า 24%
- Grade II คือ ไม่มีอาการภาวะหัวใจวาย และ LVEF ลดลงมากกว่า 20% จากค่าพื้นฐาน หรือ FS น้อยกว่า 24%
- Grade III คือ มีอาการภาวะหัวใจวายระหว่างการรักษา
- Grade IV คือ มีภาวะหัวใจวายรุนแรง หรือ จำเป็นต้องใส่ท่อช่วยหายใจ หรือ ควบคุมอาการหัวใจวายไม่ได้
- Grade V คือ เสียชีวิต

3.การประเมินผลข้างเคียงต่อระบบหัวใจและอาการภาวะหัวใจวายในระหว่างการรักษาทำโดยอายุรแพทย์มะเร็งวิทยาของหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จะทำการประเมินทุก 3 สัปดาห์ก่อนให้ยาเคมีแต่ละรอบและทำการจดบันทึกในเวชระเบียน และถ้ามาตรวจก่อนวันนัด ณ แผนกผู้ป่วยนอกหรือห้องฉุกเฉินหรือต้องรับเข้าไว้เป็นผู้ป่วยในด้วยอาการของภาวะหัวใจวาย หรือไปตรวจรักษาที่โรงพยาบาลอื่นและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นหัวใจวาย จะกำหนดให้เป็นผลบวกว่ามีภาวะหัวใจวายระหว่างการรักษาด้วยยาแอนทราซัยคลิน

การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บข้อมูลแบบไปข้างหน้าลงในแบบบันทึกข้อมูล (Case record form) โดยกลุ่มตัวอย่างเมื่อเริ่มเข้าร่วมในการศึกษา จะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้นเพื่อประเมินการทำงานไขกระดูก และ ตรวจการทำงานของไต และ การถ่ายภาพรังสีของทรวงอก และ การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจก่อนเริ่มการศึกษา หลังจากนั้นบันทึกลงในคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ Statistical Package for Social Sciences for windows version 16.0

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

Primary endpoint คือ ความแตกต่างของplasma mRNA ก่อนและหลังให้ยาDoxorubicin ในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ และ กลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

คำนวณทางสถิติ ด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Sciences for windows version 16.0 ข้อมูลเชิงคุณภาพ คือ ลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง สรุปเป็นความถี่ ร้อยละและค่าเฉลี่ย ข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น ผลplasma mRNA ที่เปรียบเทียบกันภายในกลุ่ม วิเคราะห์ด้วย dependent t-test ข้อมูลเชิงปริมาณระหว่างกลุ่ม วิเคราะห์ด้วย independent t test

บทที่ 7

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

เริ่มเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2552 จนถึง ธันวาคม 2553 มีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เข้ารับการรักษาในรพ.จุฬาลงกรณ์ด้วยสูตรยาDoxorubicinและCyclophosphamideและเข้าร่วมการศึกษาภาวะพิษต่อหัวใจจากยาแอนทราซัยคลิน 89 คน โดยมีผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจทั้งสิ้น 23 คน คิดเป็นอุบัติการณ์เกิดพิษต่อระบบหัวใจ 25.84%

ในการศึกษาเรื่องระดับ mRNA ของยีน ACADVL ในเลือดผู้ป่วย จะเลือกผู้ป่วยที่มีเลือดครบทั้ง 4 ครั้ง ซึ่งมีจำนวน 51 คน โดยมีผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจำนวน 14 คน แบ่งเป็นระดับ 1 จำนวน 9 คน ระดับ 2 จำนวน 5 คน ดังตารางที่ 7.1

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

	จำนวนผู้ป่วย(คน)	เปอร์เซ็นต์ (%)
ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ	37	72.55%
เกิดพิษต่อระบบหัวใจระดับที่ 1	9	17.64%
เกิดพิษต่อระบบหัวใจระดับที่ 2	5	9.80%
รวม	51	100%

กลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาศึกษามีลักษณะทางคลินิกพื้นฐานไม่แตกต่างกันทั้งสองกลุ่ม ค่าเฉลี่ยอายุสองกลุ่มใกล้เคียงกัน (50.59 ปี และ 50.53 ปี) ปัจจัยพื้นฐานอื่นๆไม่แตกต่างกันตามตารางที่ 6.2

ความแตกต่างระหว่าง LVEF ก่อนรักษาของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ เมื่อคำนวณด้วย independent sample t-test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 6.319 (95%CI 1.652-10.98; $p=0.009$)

ความแตกต่างของ LVEF หลังการรักษาระหว่างกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยความแตกต่างคือ -8.99(95%CI -12.9865ถึง -4.995; $p=0.000$)

กลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจค่าเฉลี่ยความแตกต่างของ LVEF หลังรักษากับก่อนรักษาเท่ากับ 1.595 (95%CI -3.93, 0.774; $p=0.181$)

กลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของ LVEF หลังรักษากับก่อนรักษา เท่ากับ -13.74 (95%CI-15.79, -11.63; $p= 0.000$)

ความแตกต่างของปริมาณยาDoxorubicin สะสมของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ -4.169 (95%CI - 11.985, 3.648; $p= 0.289$)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะพื้นฐานของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

	normal (N=37)	cardiotoxic group(N=14)
Mean age (year)	50.59	50.93
Median age (year)	50	50
Range of age(year)	31-69	27-72
Age group (n(%))		
less than 30 year	0(0%)	1(7.1%)
31-40 year	4(10.8%)	2(14.3%)
41-50 year	14(37.8%)	4(28.6%)
51-60 year	12(32.4%)	3(21.4%)
61-70 year	7(18.9%)	3(21.4%)
more than70 year	0(0%)	1(7.1%)
Reproductive status		
childbearing status without contraception	18(48.6%)	7(50%)
surgical sterilization	5(13.5%)	0(0%)
postmenopausal status	14(37.8%)	7(50%)
Smoking history		
never	37(100%)	13(92.9%)
less than 10 pack year	0(0%)	1(7.1%)
Comorbidity		
no comorbidity	26(70.3%)	11(78.6%)
diabetes mellitus	1(2.7%)	0(0%)
hypertension	4(10.8%)	2(14.3%)
DiabetesMellitus&Hypertension	1(2.7%)	0(0%)
other	5(13.5%)	1(7.1%)
ECOG performance status		
0	15(40.5%)	5(35.7%)
1	22(59.5%)	9(64.3%)
EKG		
normal	37(100%)	13(92.8%)
abnormal	0(0%)	1(7.1%)
Chest X-ray		
normal	35(94.5%)	14(100%)
abnormal lung lesion	2(5.40%)	0(0%)

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะมะเร็งเต้านมของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม

	normal (N=37)	cardiotoxic group(N=14)
Histology		
well differentiated invasive ductal carcinoma	1(2.7%)	3(21.4%)
moderate differentiated invasive ductal carcinoma	9(24.3%)	1(7.1%)
poorly differentiated invasive ductal carcinoma	14(37.8%)	8(57.1%)
invasive ductal carcinoma	12(32.4%)	2(14.3%)
Other	1(2.7%)	0(0%)
Estrogen receptor		
Negative	11(29.7%)	7(50%)
positive (less than 50%)	10(2)	2(14.3%)
highly responsive (more than 50%)	16(43.2%)	5(35.7%)
Progesterone receptor		
positive	20(54.1%)	5(35.7%)
Negative	17(45.9%)	9(64.3%)
Her2 status by IHC		
0	12(33.3%)	2(14.3%)
1+	7(19.4%)	1(7.1%)
2+	5(13.9%)	5(35.7%)
3+	12(33.3%)	6(42.9%)
Her2status by FISH		
Positive	4(100%)	4(100%)
Negative	3(75%)	2(50%)
	1(25%)	2(50%)
Side of breast cancer		
right side	17(45.9%)	5(35.7%)
left side	19(51.4%)	8(57.1%)
bilateral side	1(2.7%)	1(7.1%)
Surgery of primary lesion		
not done	10(27%)	2(14.3%)
modified radical mastectomy	14(37.8%)	7(50%)
wide excision	10(27%)	5(35.7%)
skin sparing mastectomy	3(8.1%)	0(0%)
Aims of treatment		
adjuvant therapy	27(73%)	12(85.7%)
neoadjuvant therapy	8 (21.6%)	2(14.3%)
Palliative	2(5.4%)	0(0%)

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะมะเร็งเต้านมของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม(ต่อ)

	normal (N=37)	cardiotoxic group(N=14)
T stage		
T1	7(18.9%)	4(28.6%)
T2	21(56.8%)	8(57.1%)
T3	5(13.5%)	1(7.1%)
T4	4(10.8%)	1(7.1%)
N stage		
N0	22(61.1%)	6(42.9%)
N1	9(25.0%)	3(21.4%)
N2	3(8.3%)	4(28.6%)
N3	2(5.6%)	1(7.1%)
M stage		
M0	34(91.9%)	14(100%)
M1	3(8.1%)	0(0%)
Staging		
I	4(10.8%)	2(14.3%)
IIA	15(40.5%)	5(35.7%)
IIB	10(27%)	2(14.3%)
IIIA	4(10.8%)	3(21.4%)
IIIB	2(5.4%)	1(7.1%)
IIIC	0(0%)	1(7.1%)
IV	2(5.4%)	0(0%)

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะผลการตรวจหัวใจของ ตัวอย่าง ทั้งสองกลุ่ม

	normal (N=37)	cardiotoxic group(N=14)	P value
LVEF before treatment (%)			0.009
mean	67.32%	73.64%	
median	66%	71.50%	
range	55-85%	63-85%	
LVEF post treatment (%)			< 0.001
mean	68.92%	59.93%	
median	68%	60%	
range	53-83%	50-67%	
cumulative dose of Doxorubicin (mg/m ²)			0.289
mean	227.21	231.38	
Standard deviation	13.65	7.9	
AbsoluteLVEF change (%)			< 0.001
mean	1.59	-13.71	
Standard deviation	7.1	3.6	
%FS after Doxorubicin			0.023
mean	38.97	32.68	
Standard deviation	6	10.67	

เนื่องจากเลือกตัวอย่างมาทั้งหมด 6 ตัวอย่าง คือกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ 3 คน และกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ 3 คน จึงแสดงลักษณะพื้นฐานที่สำคัญของกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาดังตาราง ตารางที่ 10แสดงลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาทำRT-PCR

	normal group(N=3)	cardiotoxic group (N=3)	
age			p=0.244
mean	47.67	57.33	
median	51	53	
SD	5.774	10.214	
comorbidity			
none	0	0	
HT	1	1	
staging			
I	1	0	
IIA	1	0	
IIB	0	2	
IIIA	1	1	

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างที่เลือกมาทำ RT-PCR (ต่อ)

	normal group(N=3)	cardiotoxic group (N=3)	p value
aims of treatment			
adjuvant	3	3	
Absolute LVEF change			
mean	2.67	-18.67	p=0.003
SD	1.528	3.512	
time to lab date (months)			
mean	8.67	8	p=0.493
SD	1.155	1	

Real time PCR

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณ cDNA ที่วัดได้จากการทำ Real time PCR

label	GAPDH	ACADVL1	ACADVL2
A precase1	336239	ไม่สามารถวัดได้	668
B postcase1	249289	ไม่สามารถวัดได้	ไม่สามารถวัดได้
C precase2	203096	ไม่สามารถวัดได้	ไม่สามารถวัดได้
D postcase2	608956	ไม่สามารถวัดได้	ไม่สามารถวัดได้
E precase3	486110	ไม่สามารถวัดได้	ไม่สามารถวัดได้
F postcase3	318303	9443	9.12
G precontrol1	245170	121	ไม่สามารถวัดได้
H postcontrol1	256022	ไม่สามารถวัดได้	0.32
I precontrol2	107749	ไม่สามารถวัดได้	ไม่สามารถวัดได้
J postcontrol2	17524	50	ไม่สามารถวัดได้
K precontrol3	443587	4088	ไม่สามารถวัดได้
L postcontrol3	448634	8822	30

จากตาราง 11 เมื่อพิจารณา primer ACADVL1 พบว่า

กลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ก่อนให้ยาไม่พบมี cDNA ของยีน ACADVL1 เลย (A,C,E)

หลังให้ยา มี 1 ตัวอย่างที่มี cDNA ของยีน ACADVL1 ออกมา คือ ตัวอย่างที่ F ส่วนอีก 2 ตัวอย่างคือ B และ D ไม่พบมี cDNA ของยีน ACADVL1 ออกมา

ส่วนกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ก่อนให้ยา (G, I, K) มีเพียง 2 ตัวอย่างที่มียีน ACADVL1 ออกมา คือ sample G และ K แต่ sample I ไม่พบมียีน ACADVL1

หลังให้ยา มี 2 ตัวอย่าง ที่มียีน ACADVL1 ออกมา แต่ 1 ตัวอย่างไม่พบมียีน ACADVL1 ออกมา

พิจารณา primer ACADVL2 พบว่า

กลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ก่อนให้ยา มีเพียง 1 ตัวอย่างคือ A ที่มี cDNA ของยีน ACADVL2 ออกมา

หลังให้ยา มี 1 ตัวอย่าง คือ F ที่มี cDNA ของยีน ACADVL2 ออกมา

ส่วนกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ก่อนให้ยา (G, I, K) ไม่พบมี cDNA ของยีน ACADVL2 ออกมา

หลังให้ยา มี 2 ตัวอย่างที่มียีน ACADVL2 ออกมา

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณ cDNA ที่วัดได้เมื่อ normalized ด้วย GAPDH

label	ACADVL1	ACADVL2
A precase1	0	0.00198668
B postcase1	0	0
C precase2	0	0
D postcase2	0	0
E precase3	0	0
F postcase3	0.029667	0
G precontrol1	0.000494	0
H postcontrol1	0	0
I precontrol2	0	0
J postcontrol2	0.002853	0
K precontrol3	0.009216	0
L postcontrol3	0.019664	0

พิจารณา ACADVL1 เมื่อเทียบกับ GAPDH แต่ละ sample ปริมาณ cDNA

กลุ่มเกิดพิษต่อระบบหัวใจ

A, C, E ไม่สามารถวัดได้

B, D, F มีเพียง 1 ตัวอย่างที่วัดได้ คือ F คือ 0.029 ที่เหลือไม่สามารถวัดได้

กลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

G, I, K มี 2 ตัวอย่างที่วัดได้ คือ G 0.000494 และ K 0.009216 ส่วน I ไม่สามารถวัดได้

H, J, L มี 2 ตัวอย่างที่วัดได้ คือ H และ L 0.002853 และ 0.019664 ตามลำดับ ส่วน J ไม่สามารถวัดได้

พิจารณา ACADVL2 เมื่อเทียบกับ GAPDH แต่ละ sample ปริมาณ cDNA เป็นตามตาราง 6.4

กลุ่มเกิดพิษต่อระบบหัวใจ

A, C, E มีตัวอย่าง A อย่างเดียวที่วัดได้ 0.00198668 ส่วนตัวอย่าง C และ E ไม่สามารถวัดได้

B, D, F ไม่สามารถวัดได้

กลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

G, I, K ไม่สามารถวัดได้

H, J, L ไม่สามารถวัดได้

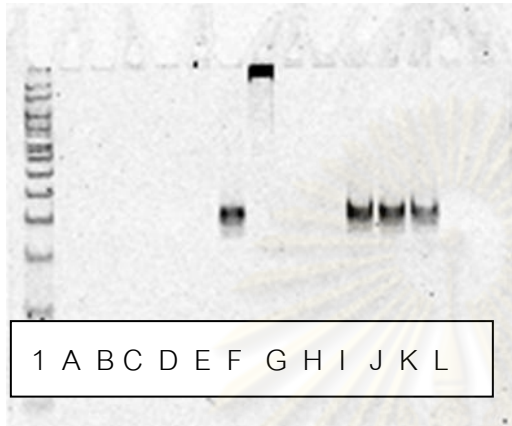
ตารางที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเท่าของปริมาณ cDNA หลังให้ยาเทียบกับก่อนให้ยา

	ACADVL1	ACADVL2
case1	0	0
case2	0	0
case3	0	0
control1	0	0
control2	0	0
control3	2.133746	0

จากตารางที่ 13 พิจารณา ACADVL1 พบมีเพียง 1 ตัวอย่างที่มีปริมาณการเปลี่ยนแปลง cDNA หลังให้ยาเทียบกับก่อนให้ยาต่างกัน 2.133 เท่า ซึ่งเป็นสมาชิกในกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ

ส่วนกลุ่มที่เกิดพิษต่อหัวใจ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ cDNA หลังให้ยาเทียบกับก่อนให้ยา

เนื่องจากการทำ Real time PCR ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดปริมาณ cDNA ไม่สามารถวัดปริมาณ cDNA ของยีน ACADVL ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมจำนวน 5 ใน 6 ตัวอย่างได้ ผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วย อิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis) เพิ่มเติมได้ผลดังภาพ



รูปที่ 12 แสดงผลการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสของการทำพีซีอาร์

จากภาพจะเห็นว่าเลนที่ F, G, J, K และ L มี cDNA เกิดขึ้นจริง แต่เลนอื่นๆ ซึ่งไม่สามารถวัด cDNA จาก Real time PCR ได้นั้น เมื่อมาทำ อิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis) ไม่พบมี cDNA เกิดขึ้นจริง

ผู้วิจัยจึงตัดสินใจที่จะยุติทำการทดลองนี้ต่อไปในตัวอย่างที่เลือกมา 50 คน เนื่องจากไม่สามารถวัดปริมาณของ cDNA ของยีน ACADVL ได้ แต่วางแผนที่จะปรับปรุงหลักการบางชนิดของการวิจัยเพื่อศึกษาต่อในโครงการวิจัยเรื่อง Genetic susceptibility of Cardiotoxicity from Doxorubicin in breast cancer patientsต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 8

อภิปรายผลการวิจัย

การใช้ยาแอนทราซัยคลินมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ ปริมาณยาสะสมที่เป็นพิษต่อระบบหัวใจ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาพิษที่เกิดต่อระบบหัวใจ การหาไบโอมาร์คเกอร์ (biomarker) ที่แสดงถึงพิษต่อระบบหัวใจในระยะที่ไม่มีอาการ เป็นเพียงวิธีที่เลือกผู้ป่วยที่เฝ้าระวังภาวะหัวใจล้มเหลวระยะยาว ปัจจุบันการตรวจหา biomarker ยังไม่มีมาตรฐานแน่ชัด มีการประยุกต์ใช้ไบโอมาร์คเกอร์จากโรคหัวใจต่างๆ เช่น troponin T และ troponin I, NT-ProBNP เป็นเพียงไบโอมาร์คเกอร์ที่มีความเป็นไปได้แต่ผลการศึกษายังขัดแย้งกันในหลายๆ การศึกษาก่อนหน้านี้

โดยการเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2552 จนถึง ธันวาคม 2553 พบอุบัติการณ์ของการลดลงของ LVEF ระดับที่ 1 และ 2 ตาม NCI CTC Version 2.0 เท่ากับ 25.84% เทียบกับข้อมูลใน รพ.จุฬาลงกรณ์ก่อนหน้านี้เท่ากับ 21% ถือว่าใกล้เคียงกัน

การศึกษานี้ที่ศึกษาระดับ mRNA ของยีนในพลาสมา โดยเลือกยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจ โดยเลือกยีน ACADVL จากฐานข้อมูลไมโครแอเรย์ ของโครงการวิจัย Genetic susceptibility of cardiotoxicities from Doxorubicin in breast cancer patients ที่มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณหลังได้รับยา Doxorubicin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์ของยีนนี้ จะอยู่ที่ไมโทคอนเดรียชั้นใน ซึ่งเป็นตำแหน่งแรกของกระบวนการเกิดการสลายตัวของกรดไขมันของกล้ามเนื้อหัวใจ (mitochondrial fatty acid Beta oxidation) การลดลงของโปรตีนนี้สัมพันธ์กับการลดลงของการสลายตัวของกรดไขมันในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และสัมพันธ์กับการทำงานของหัวใจที่ลดลง (cardiomyopathy) เมื่อมีการบาดเจ็บของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ น่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของยีนนี้แสดงออกมาในพลาสมาเช่นกัน

จากข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ไม่พบมีความแตกต่างอย่างชัดเจนในทุกๆ ข้อ รวมถึงการรักษาที่ได้รับ โดยปริมาณยาสะสมของทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน

จาก Real time PCR ปริมาณ cDNA ที่วัดได้ก่อนให้ยาในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจไม่สามารถวัดได้ แต่ปริมาณ cDNA ก่อนให้ยาของกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจวัดได้ ถึง 2 ใน 3 ตัวอย่าง อาจมีความเป็นไปได้ที่ยีน ACADVL อาจจะเป็นยีนที่สามารถบอกโอกาสการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในลักษณะที่เป็น predictive marker ก่อนเริ่มการรักษาได้

ในขณะที่ fold change ของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจไม่สามารถวัดได้ แต่ fold change กลุ่มปกติสามารถวัดได้ 1 ตัวอย่างจาก 3 ตัวอย่าง

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการตรวจหาปริมาณ mRNA จากพลาสมาในการวิจัยนี้เลือกวิธีการสกัด mRNA จากเลือดด้วยไตรโซล (trizol) จาก (47)ซึ่งเป็นวิธีการนี้เก็บตัวอย่างเลือดที่รวมกับtrizol ไว้ที่-80 องศาเซลเซียสเป็นวิธีป้องกันการสลายของmRNAในพลาสมาได้ดี และวิธีการสกัด mRNA ในพลาสมาวิธีนี้เคยได้มีการปฏิบัติมาแล้วในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยมะเร็ง (48) ซึ่งสามารถตรวจวัดRNAในพลาสมาได้ด้วยReal time PCRจริง ในการวิจัยนี้ปฏิบัติตามขั้นตอนของวิธีสกัด RNAอย่างเคร่งครัด จึงคิดว่าวิธีนี้น่าจะมีRNAในพลาสมาจริง

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับโรคมะเร็งโดยการศึกษาหาRNAที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งที่ใช้วิธีนี้ ตัวอย่างแรกคือ การหาRNAของอีพีวีไวรัสในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก โดยใช้วิธีการสกัดRNAจากพลาสมาที่ผสมกับไตรโซลแล้วทำรีเวอร์สทรานสคริปเทสท์(reverse transcriptase PCR) ซึ่งพบว่ามี RNA ของอีพีวีไวรัสในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก 23 คน จาก 26 คน ซึ่งเมื่อทำในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทสท์ ก็ไม่พบว่ามีRNAออกมา จึงเป็นการยืนยันว่า RNA ที่ตรวจพบมาจากในพลาสมาผู้ป่วยจริง การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงว่า มี RNA ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งอยู่ในพลาสมาจริงและ สามารถตรวจวัดได้ (48)

การศึกษาที่สองที่มีการใช้วิธีนี้ คือ การศึกษาหาmRNA human tyrosinase ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดสีของผิวหนังระยะแพร่กระจาย(metastatic malignant melanoma) 6 คน และคนปกติ 20 คน โดยใช้วิธีสกัดRNAจากซีรัมชื่อ Perfect RNA; ชื่อชุดการสกัดRNA โดยซีรัมเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ปี ก่อนนำมาทดลองทำ PCR พบว่ามี mRNA ของ human tyrosinase ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งผิวหนัง 6 คน และไม่พบมี mRNA ของ human tyrosinase ในกลุ่มประชากรปกติเลย (49)

จากทั้งสองตัวอย่างแสดงให้เห็นว่ามี RNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งจริงที่สามารถวัดได้ด้วยการสกัดRNAและทำอาร์ทีพีซีอาร์

มีการศึกษาต่อมาที่ทำในผู้ป่วยมะเร็งและคนปกติ ที่พบว่าRNAจะคงอยู่ได้ในรูปที่โมเลกุลเล็ก (particle associated)ทั้งในคนปกติและผู้ป่วยมะเร็ง (50) ทำให้ข้อสงสัยเกี่ยวกับการไม่คงอยู่ RNA (RNA lability) หดไป และการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่ -80 องศาเซลเซียสน่าจะเพียงพอในการลดการสลายตัวของRNA (47)

ในงานวิจัยนี้ นักวิทยาศาสตร์ได้ปฏิบัติตามกฎข้อบังคับของการสกัดRNA, การเปลี่ยนRNA เป็นDNA อย่างเคร่งครัด หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนทุกวิธี ดังนั้นขั้นตอนการสกัดRNA, การเปลี่ยนRNA ให้เป็นDNAและการทำReal time PCR ถูกต้องจริง

ในการวิจัยนี้ใช้ตัวควบคุมภายใน (Internal control) เป็นยีน GAPDH เป็นยีนที่พบได้ในเนื้อเยื่อปกติ (house keeping gene) ซึ่งตัวควบคุมภายในสามารถวัดปริมาณออกมาได้จาก RT-PCR จริง ทำให้ยืนยันว่าในพลาสมามียีน GAPDH ออกมาจริง

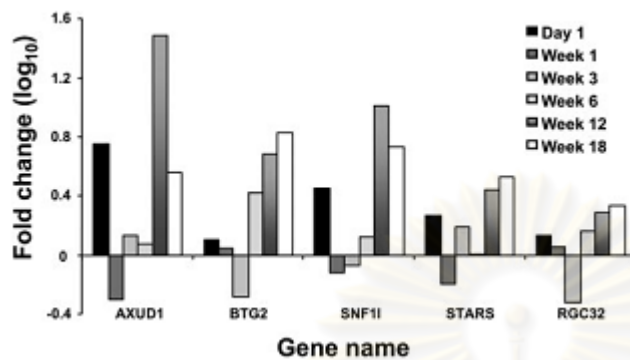
การเลือกใช้สารสี (Dyed based) เป็นตัวจับDNA ไม่มีผลในกรณีที่ผลอ่านไม่สามารถวัดได้ เนื่องจากการใช้สารสีอาจเกิดผลบวกลวงจากการที่ primer จับเข้าคู่กันเองได้

ทั้งนี้ได้มีการยืนยันผลอาร์ทีพีซีอาร์ด้วยการทำอิลีกโตรโฟรีซิส ที่ให้ผลสอดคล้องกับอาร์ทีพีซีอาร์จริง ที่ไม่มีการแสดงออกของ cDNA ในตัวอย่างเกือบทั้งหมด แสดงว่าผลการทดลองไม่มีการปนเปื้อน

จากการทดลองในหนูทดลองก่อนหน้านี้หาเงื่อนไขที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษต่อระบบหัวใจในหนูทดลอง ที่ได้รับยาDoxorubicinทั้งแบบที่เกิดพิษเฉียบพลัน (ได้รับยาเพียงครั้งเดียว) และแบบที่เกิดพิษสะสมซึ่งใกล้เคียงกับการได้รับยาDoxorubicinในมนุษย์ หลังจากนั้นจะมีการการุณฆาต (euthanized) หนูทดลองทั้งกลุ่มควบคุม (ได้ฉีดน้ำเกลือนอร์มัล) และกลุ่มทดลอง (ทั้งกลุ่มเฉียบพลันและสะสม)ที่ 1 วัน, 1 สัปดาห์, 3 สัปดาห์, 6 สัปดาห์, 12 สัปดาห์, 18 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยมีการประเมินการทำงานหัวใจก่อนทำการุณฆาตทุกราย เพื่อประเมินการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย หลังจากทำการุณฆาต จึงทำการสกัด RNA จากหัวใจหนู โดยใช้TRIZOL RNAทั้งหมดนำไปตรวจวัดด้วยวิธีไมโครแอเรย์และยืนยันผล ไมโครแอเรย์ด้วยReal time PCR โดย RNA ถูกเปลี่ยนเป็นคอมพลีเมนต์ DNA ก่อนที่จะทำการตรวจทั้งสองวิธี โดย real time PCR จะมีตัวควบคุมภายในคือ cyclophilin A

ผู้ทดลองแบ่งประเภทยื่นออกเป็น 5 กลุ่ม คือ oxidative stress related protein, signal transduction proteins, transcription protein, apoptotic protein และ cardiac structural proteins /extracellular matrix protein จากภาพแสดงปริมาณการเปลี่ยนแปลงของ cDNA หลังให้ยาของยีนที่มีการเพิ่มขึ้นหลังได้รับยาDoxorubicin จะพบว่าที่สัปดาห์ที่ 3 หลังให้ยาบางยีนเช่น บีทีจีทู มีการลดลงของปริมาณ cDNA แต่ท้ายที่สุดที่หลังสัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป จะมีการเพิ่มขึ้นของ

cDNA ได้จนถึงการวัดที่สัปดาห์ที่ 18 ดังนั้นเป็นไปได้ว่าปริมาณ cDNA น่าจะมากที่สุดในการวัดที่หลังสัปดาห์ที่ 12 เป็นต้นไป



รูปที่ 13 แสดงรูปแบบของreal time ในการยืนยันยืนยันในแบบที่พิเศษแสดงความสัมพันธ์กับเวลา

ผลิตภัณฑ์ของยีนACADVL เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายกรดไขมันที่ไม่โตคอนเดรีย พบว่าในเด็กแรกเกิดที่มีการลดลงของเอนไซม์นี้ จะมีภาวะที่ไม่สามารถเอาไขมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักในนมแม่มาเปลี่ยนเป็นพลังงานได้ และหัวใจเป็นอวัยวะที่ใช้พลังงานจากกรดไขมัน ทำให้ทารกเกิดภาวะหัวใจโต หัวใจทำงานผิดปกติ ความตึงตัวของกล้ามเนื้อน้อยกว่าปกติ และ น้ำตาลต่ำเป็นระยะๆได้ (5) จากฐานข้อมูลหน้าที่ของยีนตัวนี้ ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้ ยีนนี้อาจจะไม่มีออกมาในพลาสมาตั้งแต่ก่อนได้รับยาแล้ว

เนื่องจากไมโครแอเรย์เป็นวิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนจำนวนมากโดยใช้แผ่นไมโครแอเรย์ที่บรรจุ DNA และ วัดผลจากการเรืองแสง (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ง) ความคลาดเคลื่อนของการทดลองไมโครแอเรย์ มีได้ตั้งแต่ (51)

ปัจจัยทางชีวภาพ (biological factor) เช่น ปัจจัยในสิ่งมีชีวิตที่ทำทดลอง ความแตกต่างของพันธุกรรม และ สิ่งแวดล้อม

ปัจจัยทางเทคนิค (technical factor) เช่น extraction, labeling และ hybridization (non-specific และ cross hybridization) ได้

ปัจจัยทางการวัด (Measurement error) เช่น การอ่านสัญญาณสีของเครื่อง ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ฝุ่นละอองเล็กๆ เป็นต้น

ปัจจัยเหล่านี้ ส่งผลให้ผลการทดลองไมโครแอเรย์คลาดเคลื่อนได้ทั้งสิ้น เนื่องจากปัจจุบัน ยังไม่มีข้อตกลงที่ชัดเจนในการวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลองไมโครแอเรย์ (52) การตีความ และการนำผลไมโครแอเรย์ไปใช้จำเป็นต้องมีการตรวจสอบและยืนยันผล

การทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อการยืนยันผลไมโครแอเรย์ สำหรับ mRNA คือ RT-PCR, Northern analysis, ribonuclease protection assay และ in situ hybridization และ/หรือ in situ hybridization via tissue microarrays เป็นต้น (52)

Real time RT-PCR เป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณ specific mRNA ได้อย่างชัดเจน ใช้ ปริมาณของ DNA template ตั้งต้นไม่มาก แต่ต้องมีความระมัดระวังในการขั้นตอนของการทำ ปฏิกริยา เช่น amplification process มีการศึกษาของ Rajeevan และคณะ (53) ที่ใช้ real time PCR เพื่อยืนยันผลของไมโครแอเรย์ พบว่า การสอดคล้องของผล real time PCR และ ไมโครแอเรย์ มักจะไม่พบในยีนที่ผลของไมโครแอเรย์ต่างกันน้อยกว่า 4 เท่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของผลไมโครแอเรย์และผล real time PCR

จากผลไมโครแอเรย์ของวิจัยเรื่อง Genetic Susceptibilities of cardiotoxicities from doxorubicin in breast cancer patients พบว่าความแตกต่างของยีน ACADVL ในไมโครแอเรย์ น้อยกว่า 4 เท่า (ภาคผนวก ง) อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผล real time PCR ไม่สอดคล้องกับผล ไมโครแอเรย์ได้

บทที่ 9

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหา Fold change ของ mRNA ของยีน ACADVL ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจที่ยังไม่มีอาการแสดง แสดงผลว่าไม่สามารถตรวจพบระดับ mRNA ของยีน ACADVL ได้ในพลาสมาทั้งกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ แต่สามารถตรวจวัดระดับของยีน GAPDH ได้ในพลาสมา ซึ่งยีน GAPDH นี้เป็นตัวควบคุมภายในของการทำพีซีอาร์ การที่ยีน ACADVL ไม่มีการแสดงออกมาในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมก่อนและหลังได้รับยาแอนทราซัยคลิน น่าจะเกิดจากการที่ยีนนี้ไม่ได้แสดงออกมาในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ในอนาคตอาจจะต้องมีการศึกษาหาอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินต่อไป โดยเลือกศึกษาชนิดของยีนจากผลไมโครอาร์เรย์ที่ทำจาก RNA ในพลาสมาของผู้ป่วย โดยเลือกยีนอื่นๆที่อาจจะมีการแสดงออกชัดเจนในกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจและมีหน้าที่ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยา เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับ Oxidative stress, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis และ ยีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น

จากข้อมูลปริมาณของ cDNA ก่อนให้ยาของกลุ่มที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจไม่สามารถวัดปริมาณได้ แต่ในกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจสามารถวัดปริมาณได้ถึง 2 ใน 3 ตัวอย่าง อาจมีความเป็นไปได้ที่ยีน ACADVL อาจจะเป็น predictive marker การเกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสืออ้างอิง

1. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, et al. Cancer incidence in Thailand, 1995-1997. **Asian Pac J Cancer Prev**2005;6(3):276-81.
2. Moore MA, Attasara P, Khuhaprema T, Le TN, Nguyen TH, Raingsey PP, et al. Cancer epidemiology in mainland South-East Asia - past, present and future. **Asian Pac J Cancer Prev**2010;11 Suppl 2:67-80.
3. Jones LW, Haykowsky MJ, Swartz JJ, Douglas PS, Mackey JR. Early Breast Cancer Therapy and Cardiovascular Injury. **J Am Coll Cardiol**2007;50(15):1435-41.
4. Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. **J Clin Oncol**2008;26(22):3777-84.
5. Leslie ND, Tinkle BT, Strauss AW, Shooner K, Zhang K. Very Long Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. 1993.
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**2005;365(9472):1687-717.
7. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**2004;56(2):185-229.
8. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem Pharmacol**1999;57(7):727-41.
9. Henderson IC, Allegra JC, Woodcock T, Wolff S, Bryan S, Cartwright K, et al. Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**1989;7(5):560-71.
10. Neidhart J, Gochnour D, Roach R, Hoth D, Young D. A comparison of mitoxantrone and doxorubicin in breast cancer. **J Clin Oncol**1986;4(5):672-7.
11. Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P, Ingle JN, Martino S, Rowinsky EK, et al. Phase III Trial of Doxorubicin, Paclitaxel, and the Combination of Doxorubicin and Paclitaxel as Front-Line Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer: An Intergroup Trial (E1193). **J Clin Oncol** 2003;21(4):588-92.

12. Bonadonna G, Valagussa P, Rossi A, Tancini G, Brambilla C, Zambetti M, et al. Ten-year experience with CMF-based adjuvant chemotherapy in resectable breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**1985;5(2):95-115.
13. Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, et al. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. **J Clin Oncol**2001;19(4):931-42.
14. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15: **J Clin Oncol**1990; 8(9):1483-96.
15. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH, Shepherd LE, Tu D, Paul N. Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. **J Clin Oncol**2005;23(22):5166-70.
16. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, et al. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. **Ann Oncol**2003;14(6):833-42.
17. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Circulation**2005 13;112(24):3754-62.
18. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **N Engl J Med** 1998;339(13):900-5.

19. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMC Cancer**;10:337.
20. Harrison DT, Sanders LA. Letter: Pericarditis in a case of early daunorubicin cardiomyopathy. **Ann Intern Med**1976;85(3):339-41.
21. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer**1973;32(2):302-14.
22. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**2005;353(16):1659-72.
23. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**2005;353(16):1673-84.
24. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N Engl J Med**2001;344(11):783-92.
25. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. **J Mol Cell Cardiol**1987;19(8):817-28.
26. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. **Cardiovasc Toxicol**2007;7(2):114-21.
27. Yen HC, Oberley TD, Gairola CG, Szweda LI, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase protects mitochondrial complex I against adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice. **Arch Biochem Biophys**1999 Feb 1;362(1):59-66.
28. Kang YJ, Chen Y, Yu A, Voss-McCowan M, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. **J Clin Invest**1997 Sep 15;100(6):1501-6.
29. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virag L, et al. Potent Metalloporphyrin Peroxynitrite Decomposition Catalyst Protects Against the Development of Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. **Circulation**2003; 107(6):896-904.

30. Seifert CF, Nesser ME, Thompson DF. Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Ann Pharmacother**1994;28(9):1063-72.
31. Ryberg M, Nielsen D, Cortese G, Nielsen G, Skovsgaard T, Andersen PK. New insight into epirubicin cardiac toxicity: competing risks analysis of 1097 breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst**2008 Aug 6;100(15):1058-67.
32. Young AM, Dhillon T, Bower M. Cardiotoxicity after Liposomal Anthracycline **Lancet Oncol.** 2004;5(11):654
33. Gabizon AA, Lyass O, Berry GJ, Wildgust M. Cardiac safety of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil/Caelyx) demonstrated by endomyocardial biopsy in patients with advanced malignancies. **Cancer Invest**2004;22(5):663-9.
34. Yildirim Y, Gultekin E, Avci ME, Inal MM, Yunus S, Tinar S. Cardiac safety profile of pegylated liposomal doxorubicin reaching or exceeding lifetime cumulative doses of 550 mg/m² in patients with recurrent ovarian and peritoneal cancer. **Int J Gynecol Cancer**2008 Mar-Apr;18(2):223-7.
35. van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. **Cochrane Database Syst Rev**2005(1):CD003917.
36. Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, et al. American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of Chemotherapy and Radiation Therapy Protectants. **J Clin Oncol** 2009;27(1):127-45.
37. Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, et al. Protective Effects of Carvedilol Against Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol** 2006;48(11):2258-62.
38. Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, et al. Prevention of High-Dose Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in High-Risk Patients by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. **Circulation**2006;114(23):2474-81.
39. Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: strategies for early detection. **Lancet Oncol**2009;10(4):391-9.

40. Suzuki T, Hayashi D, Yamazaki T, Mizuno T, Kanda Y, Komuro I, et al. Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. **Am Heart J**1998;136(2):362-3.
41. Dodos F, Halbsguth T, Erdmann E, Hoppe UC. Usefulness of myocardial performance index and biochemical markers for early detection of anthracycline-induced cardiotoxicity in adults. **Clin Res Cardiol**2008;97(5):318-26.
42. Meinardi MT, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity. **Cancer Treat Rev**1999;25(4):237-47.
43. Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. **Mol Genet Metab**2000;71(1-2):436-44.
44. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. Polymerase Chain Reaction. ใน: อภิวัฒน์ มุทิตรางกูรและคณะ (บรรณาธิการ). **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: 2546. หน้า 69 -80.
45. อโนทัย โภคาธิกรณ. Basic real time PCR. ในการประชุม Introduction to real time PCR and its application; 16-17 พฤศจิกายน 2549; ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
46. ACADVL acyl-CoA Dehydrogenase very long chain (Homo Sapiens); ; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/37>.
47. Y.M.D. Lo RWKCaKCAC. Clinical applications of PCR. Nancy b.Y. Tsui EKONaYMDL, editor.
48. Lo K-W, Lo YMD, Leung S-F, Tsang Y-S, Chan LYS, Johnson PJ, et al. Analysis of Cell-free Epstein-Barr Virus-associated RNA in the Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. **Clin Chem**1999;45(8):1292-4.
49. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. **Clin Cancer Res**1999; 5 (8):1961-5.
50. Ng EKO, Tsui NBY, Lam NYL, Chiu RWK, Yu SCH, Wong SCC, et al. Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Cancer Patients and Healthy Individuals. **Clin Chem**2002;48(8):1212-7.

51. Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. **Nat Genet**2002;32 Suppl:490-5
52. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. **Nat Genet**2002; 32 Suppl:509-14.
53. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. **J Mol Diagn**2001; 3(1):26-31.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
แบบบันทึกข้อมูล (case record form)

ID No.....

Eligibility					
Inclusion	Yes	No	Exclusion	Yes	No
Age \geq 18	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Prior anthracycline	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PS 0-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Significant cardiac disease	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diagnosed breast cancer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SBP>200 or DBP>100	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LVEF>50%, no RWMA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pregnancy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Adequate CBC, Liver and renal function	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Major wounds or active skin lesions over the chest area	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inform consent	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

1. Demographic history

Date of birth.....(dd/mmm/yyyy)

Last menstruation date.....(dd/mmm/yyyy)

Reproductive status

- childbearing potential without contraception protection
 childbearing potential with contraception protection
 surgically sterilization
 postmenopausal

Smoking status

- never cigarette others.....
..... pack/day foryrs quit dm yr

Comorbidity

- DM Specify.....
 Hypertension Specify.....
 Heart disease Specify.....

2. Breast cancer history

Date of first diagnosis.....(dd/mmm/yyyy)

Primary tumor

Size (max dimension) cm

Histological grade of primary tumor

- well differentiated moderately differentiated
 poorly differentiated anaplastic
 invasive ductal carcinoma unknown
 Others.....

Estrogen receptor positive% negative unknownProgesterone receptor positive% negative unknown

HER2

- IHC 0 1+ 2+ 3+
FISH negative positive ratio..... not available

Prior chemotherapy no yes Specify.....Site left rightPrior radiotherapy no yes

Total dose Gy, fraction

Last date of radiotherapy(dd/mmm/yyyy)

Prior hormonal therapy no yes

Name of drug Start date End date

Previous surgery no yes

Surgery of primary site

- simple mastectomy
 radical mastectomy
 modified radical mastectomy
 partial mastectomy
 wide excision

Clinical staging

T stage I II III IV
N stage 0 I II
M stage 0 I

3. Physical examination

Weightkg Height cm BSAm²
PS ECOG 0 1 2 3 4
BT..... °c PR/min RR/min BPmmHg

4. Investigations

ECG

Date(dd/mmm/yyyy)
Are there any clinically significant abnormal note in ECG?
 no yes

Chest X ray

Date(dd/mmm/yyyy)
Are there any clinically significant abnormal note ?
 no yes

Baseline echocardiogram

Date(dd/mmm/yyyy)

LVEF %
Structural or functional valvular abnormalities
 no yes

Wall motion abnormalities
 no yes

Laboratory analysis

Date

Hematology

Hb , Hct , WBC , ANC , Plt

Blood chemistry BUN , Cr

5. Follow up data

Wk 0 date(dd/mmm/yyyy)
Clinical CHF Yes No
LVEF %
plasma mRNA.....
Wk 3 date(dd/mmm/yyyy)
Clinical CHF Yes No
LVEF %
plasma mRNA.....
Wk 6 date(dd/mmm/yyyy)
Clinical CHF Yes No
plasma mRNA.....
Wk 9 date(dd/mmm/yyyy)
Clinical CHF Yes No
plasma mRNA.....
Wk 12 date(dd/mmm/yyyy)
Clinical CHF Yes No
LVEF %
plasma mRNA.....

ภาคผนวก ข

หนังสือแสดงการยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

การวิจัยเรื่องระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในระยะเวลาที่ยังไม่มีอาการแสดงของระบบข้างเคียงต่อระบบหัวใจ

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่

..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย และ ไม่ได้รับค่าชดเชยในการเข้าร่วมวิจัยแต่อย่างใด

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัยตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

ภาคผนวก ค

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย ระดับของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนเอซีเอทีวีแอลในพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาแอนทราซัยคลินในระยะเวลาที่ยังไม่มีอาการแสดงของระบบข้างเคียงต่อระบบหัวใจ

ผู้สนับสนุนการวิจัย งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งการวิจัยเรื่อง การศึกษาภาวะพิษต่อกล้ามเนื้อหัวใจที่เกี่ยวข้องกับยา แอนทราซัยคลินในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยโดยโครงการความร่วมมืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อชาติของบริษัทแกล็กโซสมิทไคลน์อองโคโลยี อินเตอร์เนชันแนล

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ แพทย์หญิงอัจฉรา สุภาวเวช

ที่อยู่ หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตึกอำนวยการ ชั้น 4 1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

เบอร์โทรศัพท์ ที่ทำงาน 02-256-4533 มือถือ 081-840-2072

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่กำลังจะได้รับการรักษากลุ่มแอนทราซัยคลิน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

เนื่องจากยากกลุ่มแอนทราซัยคลิน (anthracycline) เป็นยาที่มีการใช้อย่างมากในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม โดยชนิดยาที่ใช้บ่อยเช่น ยาDoxorubicin (Doxorubicin) และยา Epirubicin (Epirubicin) ผลข้างเคียงที่สำคัญของยา กลุ่มนี้คือ ภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ ดังนั้นในผู้ป่วยที่ได้รับยากกลุ่มนี้จำเป็นต้องตรวจอัลตราซาวด์หัวใจ (echocardiogram) ก่อนและหลังรับยา เพื่อที่จะประเมินว่ามีการเกิดพิษของหัวใจจากยากกลุ่มนี้หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า

ความชุกของการเกิดภาวะเป็นพิษต่อหัวใจ ในขนาดยาที่ให้ในปัจจุบันในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อยู่ที่ ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่มีอาการและอาการแสดงของหัวใจล้มเหลวแต่อย่างใด

การศึกษานี้ต้องการศึกษาระดับของสารพันธุกรรมในพลาสมาผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจจากยาในกลุ่มแอนทราซัยคลิน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิดพิษจากยา ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อที่จะได้เฝ้าระวังและป้องกันการเกิดภาวะเป็นพิษต่อหัวใจจากยาได้ล่วงหน้า ก่อนการเปลี่ยนแปลงของผลการตรวจอัลตราซาวด์หัวใจซึ่งปกติ จะทำหลังจากให้ยาในกลุ่มแอนทราซัยคลินครบ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เกิดพิษต่อระบบหัวใจ โดยจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (ในประเทศไทย) คือ 50 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่ผู้ทำ วิจัยนัดหมาย คือ

.....

เพื่อ สอบถามประวัติที่เกี่ยวข้อง ตรวจสุขภาพร่างกายอย่างละเอียด ประเมินผลทางห้องปฏิบัติการต่าง ๆ โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 4 เดือน และมาพบแผนวิจัยหรือแพทย์ผู้รักษาร่วมในโครงการวิจัยทั้งสิ้น 5 ครั้ง

การวิจัยเป็นการติดตามผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามะเร็งเต้านมตามมาตรฐานการรักษาในปัจจุบันที่ได้รับยาเคมีบำบัดสูตรที่มียาดีอกโซลูบิซินร่วมด้วยโคลฟอสฟามาย โดยให้ทั้งหมด 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 สัปดาห์ โดยการเก็บเลือดจะดำเนินการตรงตามรอบการรับยาเคมีบำบัดของท่าน โดยเก็บตัวอย่างเลือดมาตรวจ ปริมาณสารพันธุกรรม RNA ของยีนเอ็นพีซี ที่บ่งบอกถึงที่มาจากกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งในการให้ยาเคมีบำบัดต้องมีการเจาะเลือดเพื่อให้ยาเคมีบำบัดทางเส้นเลือดดำทางผู้วิจัยขอตัวอย่างเลือดเพิ่มจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง ครั้งละ 15 ซีซี (3 ซ้อนชา), นอกจากนี้จะมีการประเมินการทำงานของหัวใจด้วย echocardiogram 2 ครั้งก่อนได้รับยาดีอกโซลูบิซิน และหลังได้รับยาครบ 4 ชุดแล้วภายใน 3 สัปดาห์

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิด

ขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบเพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วัคซีน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ขอให้ท่านปรึกษาผู้ทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีน หรือยาดังกล่าวอาจมีผลต่อประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดที่ท่านได้รับ ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ท่านได้รับ ยาเคมีบำบัดที่ อาจมีผลข้างเคียงที่อาจทำให้ท่านมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ซึ่งแพทย์ผู้รักษาจะได้มอบยาป้องกันอาการคลื่นไส้ อาเจียนและ ยาบรรเทาอาการดังกล่าวแก่ท่านในแต่ละครั้งที่มารับยาเคมีบำบัด ถ้าท่านมีอาการผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่ง กรุณาแจ้งอาการแก่แพทย์ผู้รักษาทุกครั้งที่พบ ก่อนเข้ารับยาเคมีบำบัดในแต่ละครั้ง เพื่อปรับเปลี่ยนยาให้เหมาะสมต่อไป

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอลงตัวออกจากโครงการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้สามารถเฝ้าระวังผลข้างเคียงต่อระบบหัวใจจากการรักษาโรคมะเร็งเต้านมและอาจลดความรุนแรงของโรคที่เป็นผลข้างเคียงจากการรักษาได้ถ้าพบตั้งแต่ในระยะที่ไม่มีอาการ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่น ๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติตามดังนี้

ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง

ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา

ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านนำยาที่ใช้ในการศึกษาของท่านทั้งหมดที่เหลือจากการรับประทานมาให้ผู้ทำวิจัยทุกครั้ง ที่นัดหมายให้มาพบ

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอมไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถ

ติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ แพทย์หญิงอัจฉรา สุภาวเวช ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ในกรณีที่ผู้เข้าร่วมการศึกษาวินิจฉัยไม่มีสิทธิในการรักษาใด ๆ ทางผู้วิจัยจะรับผิดชอบ

ค่าใช้จ่ายในการทำการตรวจ echocardiogram 2 ครั้ง /คน

สำหรับผู้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยที่มีสิทธิการรักษาอย่างใดอย่างหนึ่งสามารถเบิกค่าตรวจ echocardiogram ได้ตามสิทธิ์เนื่องเป็นการตรวจตามมาตรฐาน ส่วนค่าตรวจเลือด สารพันธุกรรมทุกครั้ง ทางผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบ

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

ท่านรับประทานยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา

ท่านตั้งครรรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับยาที่ใช้ในการศึกษา

ท่านแพ้ยาที่ใช้ในการศึกษา

ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอมโดยส่งไปที่ แพทย์หญิงอัจฉรา สุภาวเวช หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกว่องวานิชชั้น4 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถ.พระราม4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่
เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้
ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์
ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย

ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย

ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่าน
รวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ

ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมใน
โครงการวิจัย

ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ท่านจะได้รับทราบว่ากรยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการ
เมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด
ๆ ทั้งสิ้น

ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่

ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้
อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือ

ท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่าน
สามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรม

การวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดล ชั้น 3 โรงพยาบาล

จุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลา
ราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ภาคผนวก ง

หลักการของไมโครเอเรย์และผลไมโครเอเรย์จากการศึกษาเรื่อง Genetic Susceptibilities of cardiotoxicities from doxorubicin in breast cancer patients

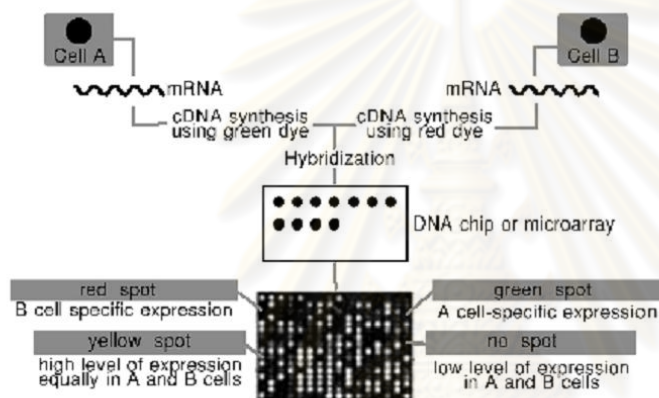
หลักการของการทำ DNA microarray

เนื่องจากยีนมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ โดยควบคุมให้เกิดการสร้างโปรตีนเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆของเซลล์ เช่น โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ หรือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ เป็นต้น กระบวนการสร้างโปรตีนในเซลล์ เริ่มต้นจากการถอดรหัสยีน หรือ DNA จากนั้นรหัสของยีนหรือ DNA จะถูกส่งออกมานอกเซลล์ในรูปแบบ mRNA จากนั้นจะมีกระบวนการแปลรหัส (translation) เพื่อที่จะสร้างโปรตีนต่อไป ดังนั้นการตรวจพบ mRNA ของยีนใด แสดงว่าขณะนั้นเซลล์กำลังมีการสร้างโปรตีนที่ถูกควบคุมโดยยีนนั้นอยู่ เทคนิคไมโครเอเรย์ของ DNA ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบว่าเวลานั้นมี mRNA ชนิดใดอยู่ในเซลล์ นอกจากตรวจสอบ RNA แล้ว ยังสามารถใช้ตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) เช่น DNA mutation และตรวจการเปลี่ยนแปลงของยีนในโครโมโซมได้

หลักการของไมโครเอเรย์ของ DNA อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของสาย DNA สองสายที่เป็นคู่กัน (complementary strands of DNA, cDNA) DNA หรือยีนที่ทราบบทบาทหน้าที่แล้วจะถูกติดอยู่บนฐานซึ่งเป็นแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิโคน แผ่นกระจกนี้สามารถบรรจุยีน DNA ได้มากถึง 30,000 ยีน แผ่นกระจกนี้เรียกว่า แผ่นไมโครเอเรย์ (microarray slide) ซึ่งเมื่อนำ DNA ไม่ว่าจะเป็น genomic DNA หรือ cDNA ที่สังเคราะห์จาก mRNA มาทำปฏิกิริยาเพื่อให้เข้าคู่กัน (hybridization) DNA ที่มีลำดับเข้าคู่กับ DNA ที่อยู่บนแผ่นไมโครเอเรย์จะสามารถจับเข้าคู่กันได้ จากนั้นนำแผ่นไมโครเอเรย์นี้เข้าเครื่องอ่าน เนื่องจากได้มีการติดฉลาก เช่น แถบสีเรืองแสงไว้ที่ DNA แล้ว เครื่องจึงสามารถวัดสีเรืองแสงได้ หาก DNA จับคู่ติดกับ DNA บนแผ่นไมโครเอเรย์ ความเข้มของสีสามารถบอกปริมาณ DNA ที่ถูกจับไว้ได้

ในการตรวจสอบว่ามีกการแสดงออกของยีนใดบ้าง จะต้องทำการสกัด DNA หรือหากใช้ cDNA ต้องมีการสกัด RNA หรือ mRNA จากเซลล์ที่ศึกษา แล้วสังเคราะห์ให้เป็น cDNA และทำการติดฉลาก มักติดฉลาก DNA กลุ่มควบคุมด้วยสารเรืองแสงสีเขียว (Cy3) และติดฉลาก DNA กลุ่มทดลองด้วยสารเรืองแสงสีแดง (Cy5) จากนั้นนำ DNA มาทำปฏิกิริยา เพื่อให้จับคู่กับ DNA ที่อยู่บนแผ่นไมโครเอเรย์ เมื่อนำเข้าเครื่องอ่าน จะปรากฏแสงสีต่างๆ บนแผ่นไมโครเอเรย์ โดยจุดที่เห็นสีเขียวแสดงถึงการแสดงออกของยีนในเซลล์กลุ่มควบคุม และ จุดที่เห็นสีแดงแสดงถึงการ

แสดงออกของยีนในเซลล์กลุ่มทดลอง ส่วนจุดที่มีการแสดงออกของยีนทั้งสองกลุ่มเซลล์จะเห็นเป็นสีเหลือง นอกจากนี้อาจจะมียีนบางชนิดไม่แสดงออกในช่วงที่ทำการทดลอง จึงไม่ปรากฏสีใด แสดงเลเซอร์ในเครื่องอ่านจะส่งข้อมูลความเข้มสีไปยังส่วนประมวลผล แล้วคำนวณมาเป็นอัตราส่วนความเข้มสี ซึ่งแปลได้ว่ายีนมีการแสดงออกมากเพียงใด จุดที่ความเข้มของสีเขียวและแดงเป็นอัตราส่วน 1:1 แสดงว่าการแสดงออกของยีนในกลุ่มทดลองเหมือนกับกลุ่มควบคุม จุดที่ความเข้มของสีเขียวมากกว่าสีแดง แสดงว่ายีนนั้นถูกกดให้มีการแสดงออกน้อยลง (down regulation) ในทางตรงกันข้าม จุดที่มีสีแดงเข้มกว่าสีเขียว จะแสดงให้เห็นว่ายีนนั้นมีการแสดงออกมากขึ้น (upregulation) ดังภาพ



รูปที่ 14 ภาพแสดงการศึกษากการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค DNA microarray กลุ่มควบคุม (A) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว และDNAของกลุ่มทดลอง (B) ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีแดง เมื่อดีเอ็นเอจับคู่กับ DNA ที่ติดอยู่บนแผ่นไมโครแอเรย์ จะปรากฏเป็นสีและสามารถวัดได้ด้วยเครื่องอ่านไมโครแอเรย์

การศึกษากการทำงานของยีนด้วย DNA microarray

ไมโครแอเรย์สามารถนำมาศึกษาได้ทั้งการแสดงออกของหรือการทำงานของยีน, ศึกษาจำนวนยีน และ ศึกษาการกลายพันธุ์ของ DNA โดย

การศึกษากการแสดงออกของยีนหรือการทำงานของยีน (Study of gene expression level or gene function) โดยศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ผิดปกติ ทำให้ทราบว่าในสภาวะที่เซลล์เกิดความผิดปกติ มียีนแสดงออกมากน้อยต่างกันอย่างไร ยีนบางชนิดจะมีการแสดงออกลดลงในภาวะเซลล์ผิดปกติ ยีนบางชนิดมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ทำงานผิดปกติ จึงสามารถนำความรู้นี้มาใช้ในการศึกษาพัฒนาตัวยาใหม่ๆได้

การศึกษากจำนวนของยีน(Study of gene numbers) ในภาวะที่เซลล์ร่างกายทำงานผิดปกติ มีการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง ร่างกายจะมียีนกลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่

ควบคุมการซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลาย เรียกว่า DNA repair genes ซึ่งส่งผลให้ยีนบางส่วนในโครโมโซมหายไป ยีนบางส่วนเพิ่มขึ้น การใช้ไมโครแอเรย์สามารถวัดการเพิ่มขึ้นและลดลงของจำนวนยีนบนโครโมโซมได้ โดยใช้แผ่นไมโครแอเรย์ที่เป็น genomic DNA โดยเตรียม DNA จากโครโมโซมชุดใดชุดหนึ่ง ผลการตรวจสอบจะบอกได้ว่า บนโครโมโซมนั้นๆ มียีนใดหายไปหรือเพิ่มจำนวน

ศึกษาการกลายพันธุ์ของ DNA (study of DNA mutation) ไมโครแอเรย์สามารถใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน และ ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐาน (DNA polymorphism) ของยีนได้ ยีนที่ก่อกลายพันธุ์และยีนที่มีภาวะพหุสัณฐานเป็นยีนที่มีนิวคลีโอไทด์ในบางตำแหน่งต่างไปจากกลุ่ม ซึ่งความแตกต่างนี้อาจมีผลให้ยีนมีการแสดงออกต่างกัน

ผลไมโครแอเรย์ของการศึกษาเรื่อง Genetic Susceptibilities of cardiotoxicities from doxorubicin in breast cancer patients



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงผล average signal from array (genome studio)

label sample		GAPDH	ACADVL
A	case1 before	478.9	94.4
B	case1 after	404.6	78
C	case2 before	337.8	38.1
D	case2 after	587.6	40
E	case3 before	453.9	22.5
F	case 3 after	419.1	10.4
G	control 1 before	287.8	23.2
H	control1 after	692.1	66.3
I	control2 before	245.8	38.3
J	control2 after	109.6	15.7
K	control3 before	371.3	4.4
L	control3 after	671.2	98.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดง average signal array from genome studio แยกโดยวิธีการ normalization แบบต่างๆ

label sample	rank invariant normalization		Quantile normalization		Qubic Spline normalization		average normalization	
	GAPDH	ACADVL	GAPDH	ACADVL	GAPDH	ACADVL	GAPDH	ACADVL
A	279.1	59.6	304.2	59.4	290.9	55.5	320	63.1
B	280.4	57.7	447.6	84.4	437.1	78.2	443.4	85.5
C	242.7	31.4	459	49.2	447.7	45.9	427.3	48.2
D	344	27.6	376	28.5	365.1	25.9	403.9	27.5
E	305.6	20.1	389.6	22	376.3	20.8	397	19.7
F	328.4	12.6	526.9	10.7	513	12.2	489	12.1
G	223.4	23	274.5	25.6	263.3	24	269	21.7
H	425.9	45	547.3	51.6	536.2	48	549	52.7
I	216.5	39.1	448.1	80.9	436.5	79.3	418.8	65.2
J	104.9	20.6	406.6	23.3	398.2	22.4	344	49.3
K	414.3	52.1	499	62.1	488	57.8	496.7	55.4
L	425.3	68	465.5	60.2	452	56	492.1	72.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดง signal average normalized with GAPDH

label	none normalized	rank invariant normalization	Quantile normalization	Qubic Spline normalization	average normalization
	ACADVL	ACADVL	ACADVL	ACADVL	ACADVL
A	0.19712	0.21354	0.19526627	0.1907872	0.1971875
B	0.19278	0.20578	0.18856122	0.1789064	0.19282815
C	0.11279	0.12938	0.10718954	0.102524	0.11280131
D	0.06807	0.08023	0.07579787	0.0709395	0.06808616
E	0.04957	0.06577	0.05646817	0.055275	0.04962217
F	0.02482	0.03837	0.02030746	0.0237817	0.02474438
G	0.08061	0.10295	0.09326047	0.0911508	0.08066914
H	0.0958	0.10566	0.09428102	0.0895188	0.09599271
I	0.15582	0.1806	0.18054006	0.1816724	0.1556829
J	0.14325	0.19638	0.05730448	0.0562531	0.14331395
K	0.01185	0.12575	0.1244489	0.1184426	0.11153614
L	0.14705	0.15989	0.12932331	0.1238938	0.14692136

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แสดงค่าเปลี่ยนแปลง (fold change) หลังรักษาเทียบกับก่อนรักษา

sample	none normalized	rank invariant normalization	Quantile normalization	Qubic Spline normalization	average normalization
Case 1	0.97801	0.96363	0.96566198	0.9377276	0.97789234
Case 2	0.60355	0.62014	0.70713869	0.6919303	0.6035937
Case 3	0.5006	0.58334	0.35962663	0.4302425	0.4986557
Control1	1.18836	1.02627	1.01094292	0.9820962	1.18995576
Control2	0.91933	1.08736	0.31740588	0.3096405	0.92055036
Control3	12.409	1.27142	1.03916797	1.0460238	1.3172534

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวอัจฉรา สุภาวเวช

วันเดือนปีเกิด 16 ตุลาคม พ.ศ.2526 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิติศาสตรบัณฑิต แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2543-2549

แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลอ่างทอง 2549-2550

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2549

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย