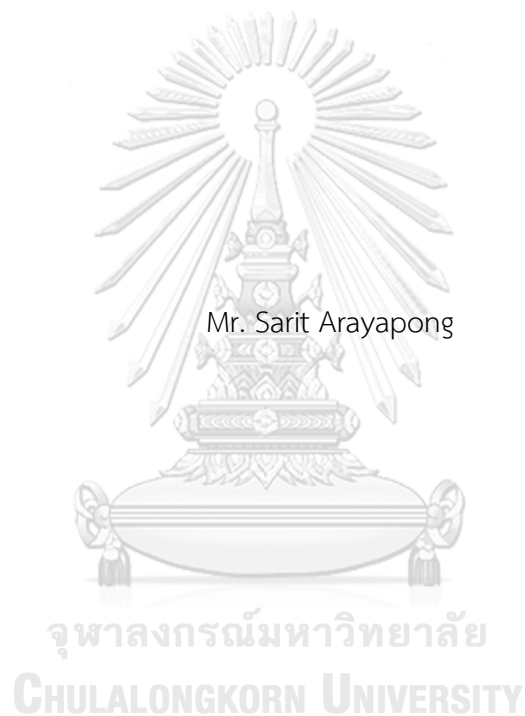


การศึกษานิกลายพันธุในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษา
ด้วยการผ่าตัดตัดระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วและช้า



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Genetic Mutations between Early and Late Recurrence after Hepatic Resection in
Colorectal Cancer with Liver Metastasis



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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษายีนกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ระยะแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดตับ ระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วและช้า
โดย	นายสาริศ อารยะพงษ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สีบพงษ์ ธนสารวิมล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สีบพงษ์ ธนสารวิมล)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์วศิน พุทธารีย์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เอกภพ สิริชัยนันท์)	

สาริต อารยะพงษ์ : การศึกษาในกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดตับระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วและช้า. (Genetic Mutations between Early and Late Recurrence after Hepatic Resection in Colorectal Cancer with Liver Metastasis) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. นพ.สืบพงศ์ ธนสารวิมล

ที่มา : การรักษาโดยการผ่าตัดตับในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการกระจายไปที่ตับสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและโอกาสหายขาดได้ อย่างไรก็ตามพบว่าหลังการผ่าตัดตับ มีอัตราการเกิดโรคกลับเป็นซ้ำได้ถึง 50% การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลักษณะทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้

วิธีดำเนินการ : เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับอย่างสมบูรณ์ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ มกราคม 2550 จนถึงเมษายน 2562 ที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือนกับกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าหลัง 3 ปี โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *APC*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* และ *PMS2* ด้วยวิธี Whole Exome Sequencing จากชิ้นเนื้อมะเร็งบริเวณตับของผู้ป่วย

ผลการศึกษา : มีผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับจำนวน 521 คน ผู้ป่วยเข้าตามเกณฑ์ 39 คน อยู่ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว 20 คน พบว่ากลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วมีจำนวนมะเร็งที่ตับและได้รับการรักษาก่อนผ่าตัดมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถตรวจ WES ได้ทั้งหมด 18 คน พบว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วมีการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* มากกว่า (18.2% vs 0%, $p=0.5$) และพบการกลายพันธุ์ของยีน *MMR* น้อยกว่า (9.1% vs 28.6%, $p=0.53$) พบความแตกต่างของการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีนบางตัวระหว่างสองกลุ่ม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการศึกษา : กลุ่มผู้ป่วยที่กลับเป็นซ้ำเร็วพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ได้บ่อยกว่า และมีการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่ม *MMR* ที่น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อยืนยันในกลุ่มประชากรที่เยอะขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา อายุรศาสตร์
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6074098430 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: Prognostic factors/Colorectal Cancer/Liver Metastasis/Hepatic Resection

Sarit Arayapong : Genetic Mutations between Early and Late Recurrence after Hepatic Resection in Colorectal Cancer with Liver Metastasis . Advisor: Asst. Prof. SUEBPONG TANASANVIMON, M.D.

Background : Surgical resection of colorectal liver metastases (CRLM) improves survival and provides the chance for cure. However, about half of patients have recurrence after hepatic resection. The aim of this study was to explore tumor genetic profiles in CRLM patients with early recurrence (ER) and long-term disease free (LF) after complete hepatic resection.

Methods : Among CRLM patients undergoing complete hepatic resection at King Chulalongkorn Memorial Hospital during January 2007 – April 2019 , the patients with ER (<6 months) and LF (>3 years) were identified. Whole Exome Sequencing(WES) was run on tumor samples from liver resection specimens. Genetic alterations of *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *APC*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* were analyzed.

Results : Among 521 patients with CRLM undergoing hepatic resection, 20 eligible patients with ER and 19 eligible patients with LF were identified. For clinicopathological analysis, as compared to LF, there were significantly more number of liver metastasis ($p = 0.02$) and pre-operative treatments ($P = 0.006$) in ER. Eighteen patients including 11 ER and 7 LF were complete WES analysis. There were more patients with *NRAS* mutation (18.2% vs 0%, $p=0.5$) and less MMR gene mutations (9.1% vs 28.6%, $p=0.53$) in patients with ER. Copy-number variation (CNV) analysis showed differences of amplification or deletion in *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *CTNNB1*, *PMS2* and *MLH1* gene between the two groups but no statistical significance.

Conclusion : As compared with CRLM patients with LF, there were more *NRAS* mutation and less MMR gene mutation frequencies in CRLM patients with ER but no statistical significance. The results need to be validated in a larger population.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medicine

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

1. ผศ.นพ.สืบพงศ์ ธนสารวิมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ ข้อคิด และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยมาตลอด

2. อ.ดร.พญ.ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ ที่ช่วยติดต่อประสานงาน ให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัยในการส่งตรวจและแปลผลข้อมูลในงานวิจัย

3. อาจารย์แพทย์หน่วยโรคมะเร็งทุกท่าน

4. แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์หน่วยโรคมะเร็งทุกท่าน

5. เจ้าหน้าที่หน่วยโรคมะเร็งทุกท่าน

ท้ายสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นผู้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สาริต อารยะพงษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ.....	1
บทที่ 1 บทนำ	3
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale).....	3
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions).....	4
1.2.1 คำถามหลัก (Primary Research Question).....	4
1.2.2 คำถามรอง (Secondary Research Question).....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	4
1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis).....	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework).....	5
1.7 คำสำคัญ (Key Words).....	5
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definitions).....	6
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	7
2.1 การผ่าตัดตับในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับ	7
2.2 ปัจจัยพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ	8

2.3 พยาธิกำเนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง	8
2.3.1 กลไกโครโมโซมอีนสแตบิลิตี (chromosomal instability (CIN)).....	9
2.3.2 กลไกไมโครแซทเทลไลท์อีนสแตบิลิตี(microsatellite instable (MSI))	9
2.3.3 กลไกเอพิเจเนติกส์(epigenetic DNA promotor hypermethylation).....	9
2.4 การแบ่งชนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามลักษณะทางโมเลกูลาร์ (Consensus Molecular Subtypes (CMSs)).....	10
2.4.1 กลุ่มที่ 1 (CMS1, microsatellite instability immune)	10
2.4.2 กลุ่มที่ 2 (CMS2, canonical).....	10
2.4.3 กลุ่มที่ 3 (CMS3, metabolic).....	11
2.4.4 กลุ่มที่ 4 (CMS4, mesenchymal)	11
2.4.5 ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจน	11
2.5 ยีนกลายพันธุ์ที่สำคัญในมะเร็งลำไส้ใหญ่	12
2.5.1 ยีนเอพีซี(Adenomatous polyposis coli (APC))	12
2.5.2 ยีนซีทีเอ็นเอ็นบีวัน(CTNNB1)	12
2.5.3 กลไกทีจีเอฟเบต้า(TGF- β /Smad signaling pathway).....	13
2.5.4 ยีนเคราส (KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)) และเอ็นราส (NRAS(neuroblastoma RAS viral oncogene homolog))	14
2.5.5 ยีนบีราฟ (BRAF(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)).....	15
2.5.6 ภาวะเอ็มเอสไอสูง(MSI-H)	15
2.5.7 พีไอสามเค (Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)).....	16
2.6 เทคโนโลยีเอ็นจีเอส (Next generation sequencing (NGS) technologies)	17
2.6.1 หลักการทำงาน	17
2.6.2 การนำไปประยุกต์ใช้	18
2.6.3 รูปแบบของเทคโนโลยีเอ็นจีเอส	19

2.6.4	ขั้นตอนการหาลำดับเบสโดยเครื่อง Illumina.....	20
2.6.4.1	การสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction).....	20
2.6.4.2	การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library).....	20
2.6.4.3	การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี bridge amplification.....	21
2.6.4.4	การหาลำดับเบส.....	22
2.7	การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	23
2.7.1	การประเมินคุณภาพและปรับปรุงคุณภาพของไฟล์ FASTQ (Quality control).....	24
2.7.2	การเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง (Read mapping on a reference genome).....	25
2.7.3	การตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant calling).....	26
2.7.4	การแปลผลความสำคัญของลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant annotation).....	26
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1	รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	27
3.2	ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology).....	28
3.3	การคำนวณตัวอย่าง (Sample Size Determination).....	29
3.4	ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย.....	29
3.5	วิธีการตรวจยีนกลายพันธุ์แบบ whole exome sequencing (WES) ด้วยเทคนิคเอ็นจีเอส (Next-generation sequencing (NGS)) และการวิเคราะห์ผลตรวจ.....	31
3.6	การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection).....	33
3.7	การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	33
3.8	ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration).....	34
3.9	ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation).....	34
3.10	การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration & Time Schedule).....	35
3.11	งบประมาณ (Budget).....	36

บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	37
4.1 ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา.....	37
4.2 ปัจจัยทางคลินิก.....	37
4.3 ปัจจัยทางพยาธิวิทยา.....	39
4.4 ปัจจัยทางด้านการรักษาเสริม.....	39
4.5 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม.....	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	52
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	52
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	52
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	65
ประวัติผู้เขียน.....	71

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับระหว่าง 2 กลุ่ม ..43	
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้และผลการตรวจในขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของ ผู้ป่วยรายบุคคล(คนที่ 1-7 อยู่ในกลุ่มกลับเป็นซ้ำ,คนที่ 8-18 อยู่ในกลุ่มกับเป็นซ้ำเร็ว).....44	
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับระหว่าง 2 กลุ่มที่ สามารถตรวจตรวจยีนกลายพันธุ์ได้48	
ตารางที่ 4 ผลตรวจยีนกลายพันธุ์ชนิด SNPs หรือ Indels.49	
ตารางที่ 5 ผลตรวจยีนกลายพันธุ์หาการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (CNV).....51	



สารบัญรูป

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย	5
ภาพที่ 2 พยาธิกำเนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (15).....	10
ภาพที่ 3 การแบ่งชนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามลักษณะทางโมเลกุลาร์(16)	11
ภาพที่ 4 กลไกดับบลิวเอ็นที (canonical Wnt/ β -catenin pathway)(19).....	13
ภาพที่ 5 กลไกทีจีเอฟเบต้า(TGF- β /Smad signaling pathway)(20)	14
ภาพที่ 6 กลไกลาส (RAS-ERK signaling pathway)(19)	16
ภาพที่ 7 กลไกพีไอสามเค (Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 K))(26)	17
ภาพที่ 8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส(27)	19
ภาพที่ 9 เปรียบเทียบความแตกต่างของเครื่องมือในการทำเอ็นจีเอสรูปแบบต่างๆ (28).....	20
ภาพที่ 10 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ(29).....	21
ภาพที่ 11 การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี bridge amplification	22
ภาพที่ 12 การหาลำดับเบส(28).....	23
ภาพที่ 13 ตัวอย่างของไฟล์ FASTQ(34).....	24
ภาพที่ 14 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล(35).....	24
ภาพที่ 15 แสดงคะแนนคุณภาพของลำดับเบสบริเวณต่างๆ คะแนนที่น้อยแสดงถึงความถูกต้องของลำดับเบสน้อย(36)	25
ภาพที่ 16 แสดงการเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง(37)	26
ภาพที่ 17 รูปแบบการวิจัย.....	27
ภาพที่ 18	39

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis coli
APR	Abdominal Perineal Resection
AR	Anterior Resection
BRAF	V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
CCRT	Concurrent Chemo Radiotherapy
CEA	Carcinogenic Embryonic Antigen
CI	Confidence Interval
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
CLRM	Colorectal Cancer Liver Metastasis
CMSs	Consensus Molecular Subtypes
CMT	Chemotherapy
CTNNB1	Catenin Beta 1
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
GATK	Genome Analysis Toolkit
GWAS	Genome-Wide Association Study
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer or Lynch Syndrome
HR	Hazard Ratio
Indels	Base Insert/Deletions
IQR	Interquartile Range
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LAR	Low Anterior Resection

LOH	Loss of Heterozygosity
LVI	Lymphovascular Invasion
MMR	Mismatch Repair Genes
MoAbs	Monoclonal Antibodies
MSI	Microsatellite Instable
NGS	Next Generation Sequencing
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
OS	Overall Survival
RFS	Relapse Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
SCNAs	Somatic Copy-Number Alterations
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TP53	Tumor Protein p53
WES	Whole Exome Sequencing

1.2 คำถามของการวิจัย (Research Questions)

1.2.1 คำถามหลัก (Primary Research Question)

ความชุกของยีนกลายพันธุ์ *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *APC*, *CTNNB1*, *SMAD4*, และภาวะ MSI ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วและช้าเป็นเท่าไร

1.2.2 คำถามรอง (Secondary Research Question)

ลักษณะทางคลินิก, พยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับและลักษณะของการกลับเป็นซ้ำของโรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วและช้ามีความแตกต่างกันหรือไม่

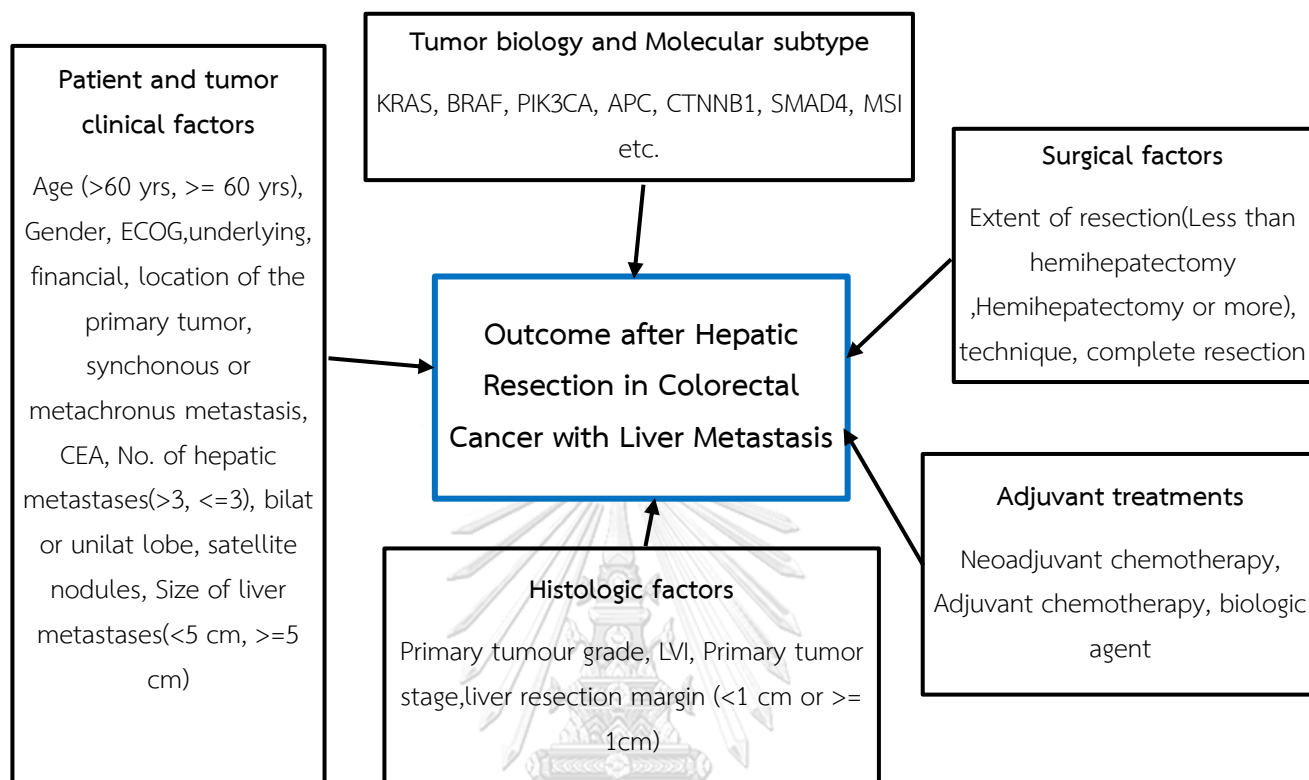
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

เพื่อหาปัจจัยในด้านต่าง ๆ ทั้งลักษณะทางคลินิก, พยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับและลักษณะทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis)

ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีลักษณะของยีนกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วและช้า

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

1.6.1 ประเมินสถานะภาพทางกายของผู้ป่วยใช้ตามอีซีโอจี(Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)) โดยแบ่งเป็น 0-5 (9)

1.6.2 ประเมินระยะของโรคตามเอเจซีซี ลำดับที่ 7 (7th edition AJCC TNM staging system)

1.7 คำสำคัญ (Key Words)

Genetic Mutations

Colorectal Cancer

Liver Metastasis

Hepatic Resection

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

1.8.1 การกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว (Early recurrence) หมายถึง การกลับเป็นซ้ำของโรคทั้งนอกตับและภายในตับ ในระยะเวลา 6 เดือนหลังผ่าตัด

1.8.2 การกลับเป็นซ้ำของโรคช้า (Late recurrence หรือ long-term disease free) หมายถึง การกลับเป็นซ้ำของโรคทั้งนอกตับและภายในตับ หลังระยะเวลา 3 ปีเป็นต้นไปหลังผ่าตัด]

1.8.3 เสียชีวิตระหว่างผ่าตัด (Operative mortality) หมายถึง การเสียชีวิตที่ไม่ได้เกิดจากโรคมะเร็งภายใน 90 วันหลังผ่าตัด (noncancer-related 90-day mortality)(10)

1.8.4 การผ่าตัดตับ (Hepatic resection) หมายถึง การผ่าตัดไม่ว่าตามอนาโตมีหรือไม่ (either anatomic or nonanatomic) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อตัดให้หมด (free of visible tumor) ในขณะที่ยังเหลือเนื้อตับเพียงพอต่อการทำงานตามปกติ (preserving liver function)

1.8.5 การผ่าตัดตับสองขั้นตอน (Two-stage hepatectomy) หมายถึง การผ่าตัดเอาเนื้อมะเร็งในตับออกโดยต้องอาศัยการผ่าตัด 2 รอบ (2 step for complete resection of the metastasis) โดยครั้งแรกจะตัดออกบางส่วนและผ่าตัดส่วนที่เหลืออีกครั้งหลังมีการงอกใหม่ของเนื้อตับส่วนที่ดี (remaining tumors are resected after a period of liver regeneration)(11)

1.8.6 การกระจายของโรคพร้อมกัน (Synchronous metastases) หมายถึง มีการกระจายมาที่ตับก่อนการได้รับการผ่าตัดมะเร็งที่ลำไส้หรือระหว่างผ่าตัด

1.8.7 มะเร็งด้านซ้าย (Left-sided colon cancer) หมายถึง มะเร็งที่อยู่ต่ำกว่าบริเวณส่วนโค้งบริเวณตับ(splenic flexure)ลงมา รวมทั้งบริเวณเรคตัม (rectum)

1.8.8 มะเร็งด้านขวา (Right-sided colon cancer) หมายถึง มะเร็งที่อยู่บริเวณตั้งแต่ซีกัม (cecum), ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (ascending colon) จนถึงส่วนโค้งบริเวณตับ (splenic flexure)

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 การผ่าตัดตับในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับ

Scott Kopetz(5) และคณะ ได้ศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective review) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย (metastatic CRC) ระหว่างปี 1990 – 2006 จำนวน 2470 คน เพื่อความสัมพันธ์ระหว่างการผ่าตัดมะเร็งที่กระจายมาที่ตับ (liver resection) กับอัตราการรอดชีวิต (overall survival) พบว่า การผ่าตัดตับในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ ค.ศ. 1998 เป็นต้นมา มีสัดส่วนที่ประมาณ 20% ของผู้ป่วยทั้งหมด, มีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival rate) 55.2% เทียบกับ 19.5% ในคนที่ไม่ได้ผ่าตัด, มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต (median overall survival) 65.3 เดือน (ช่วงความเชื่อมั่น 95%(95% CI) 51.6 ถึง 70.6) เทียบกับ 26.7 เดือน (ช่วงความเชื่อมั่น 95%(95% CI) 24.9 ถึง 28.6) ในคนที่ไม่ได้ผ่าตัด, อัตราส่วนเสี่ยงภัย (Hazard ratio) 0.35 (ช่วงความเชื่อมั่น 95%(95% CI) 0.27 ถึง 0.44; $P < .001$)

D. Gomez(7) และคณะ ได้ศึกษาแบบไปข้างหน้า(prospective) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับ 705 คน ที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ และมีค่ามัธยฐานของการติดตาม (median follow-up time) เท่ากับ 48(14–196) เดือน พบว่ามีอัตราการปลอดโรคที่ 5 ปี (5-year disease-free rate) เท่ากับ 28.3%, อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5- year overall survival rates) เท่ากับ 32.3%, 42.4% มีการกลับเป็นซ้ำของโรคใน 1 ปี, 57% กลับเป็นซ้ำใน 2 ปี, อัตราการเกิดโรคกลับเป็นซ้ำบริเวณตับ 36% , อัตราการเกิดโรคกลับเป็นซ้ำนอกตับ 38%(ส่วนใหญ่เป็นปอด) และพบว่าคนที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วมีอัตราการรอดชีวิต (overall survival) แย่กว่าคนที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคช้า

M. A. Memon(6) และคณะได้ทำการศึกษาแบบการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดตับ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5- year survival) เท่ากับ 16-49%, อัตราการรอดชีวิตที่ 10 ปี (10-year survival) เท่ากับ 17-33%

Shinichiro Takahashi(8) และคณะได้ทำการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดตับแต่ไม่ได้รับเคมีบำบัดเสริม 101 คน พบว่ามีค่ามัธยฐานอัตราชีพรอดอย่างปราศจากโรค (median recurrence-free survival) เท่ากับ 9 เดือน, 45% มีการกลับเป็นซ้ำของโรคใน 6 เดือนและ 88%ใน 2 ปี , ผู้ป่วยที่การ

กลับเป็นซ้ำของโรคมายใน 6 เดือน มีอัตราการรอดชีวิต(overall survival) แย่กว่าคนที่มีการกลับเป็นซ้ำนานกว่า 6 เดือน ($P < 0.01$)

2.2 ปัจจัยพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ

M. A. Memon(6) และคณะ พบว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับการมีพยากรณ์โรคแย่ได้แก่ การมีรอยโรคเหลือหลังการผ่าตัด (involved resection margins) และมีภาวะกระจายของโรคนอกตับ (extrahepatic disease) ซึ่งรวมถึงต่อมน้ำเหลืองบริเวณไฮลาร์และซีเลียค (hilar และ coeliac axis lymph nodes) ณ เวลาที่ผ่าตัด ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ยังมีความขัดแย้งระหว่างงานวิจัย

Luca Viganò(10) และคณะได้ทำการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดตับทั้งที่ตัดได้หมดและไม่หมด (R0/R1) จำนวน 6025 คน พบว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว (< 6 เดือน) ได้แก่ ระยะของก้อนมะเร็งที่ลำไส้ระยะที่ 3-4 (T3-4 primary tumor), มีการแพร่กระจายไปที่ตับตั้งแต่แรก (synchronous CRLM), จำนวนของมะเร็งที่กระจายไปที่ตับมากกว่า 3, ผ่าตัดก้อนมะเร็งที่ตับได้ไม่หมด, มีการใช้วิธีการผ่าตัดด้วยคลื่นความถี่วิทยุร่วมด้วยระหว่างผ่าตัด (intraoperative radiofrequency ablation) ส่วนการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดทั้งแบบบางส่วนและทั้งหมด (complete/partial) และการให้ยาเคมีบำบัดเสริม (adjuvant chemotherapy) ลดการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว (< 6 เดือน) ; การกลับเป็นซ้ำของโรคมายใน 6 เดือน มีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival) แย่กว่าคนที่มีการกลับเป็นซ้ำนานกว่า 6 เดือน (26.9 เทียบกับ 49.4 %, $p < 0.0001$) ; คนที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว ถ้าสามารถตัดบริเวณที่เป็นซ้ำได้จะมี อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival) ดีกว่าคนที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ (47.2 เทียบกับ 8.9 %; $p < 0.0001$) และการให้ยาเคมีบำบัดก่อนตัดซ้ำในคนที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี(5-year survival) ดีกว่าไม่ได้ให้ (61.5 vs. 43.7 %; $p = 0.028$)

2.3 พยาธิกำเนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ไม่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (sporadic colorectal cancer) ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้นั้น ส่วนใหญ่ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหลายกลไกด้วยกัน หลัก ๆ แบ่งเป็น 3 กลไก ได้แก่ 1. กลไกโครโมโซมอีนสแตบิลิตี(chromosomal instability (CIN)), 2. กลไกไมโครแซทเทลไลท์อีนสแตบิลิตี (microsatellite instable (MSI)), และ 3. กลไกเอพิเจเนติกส์ (epigenetic DNA promotor hypermethylation)(12, 13)

2.3.1 กลไกโครโมโซมอินสแตบิลิตี (chromosomal instability (CIN))

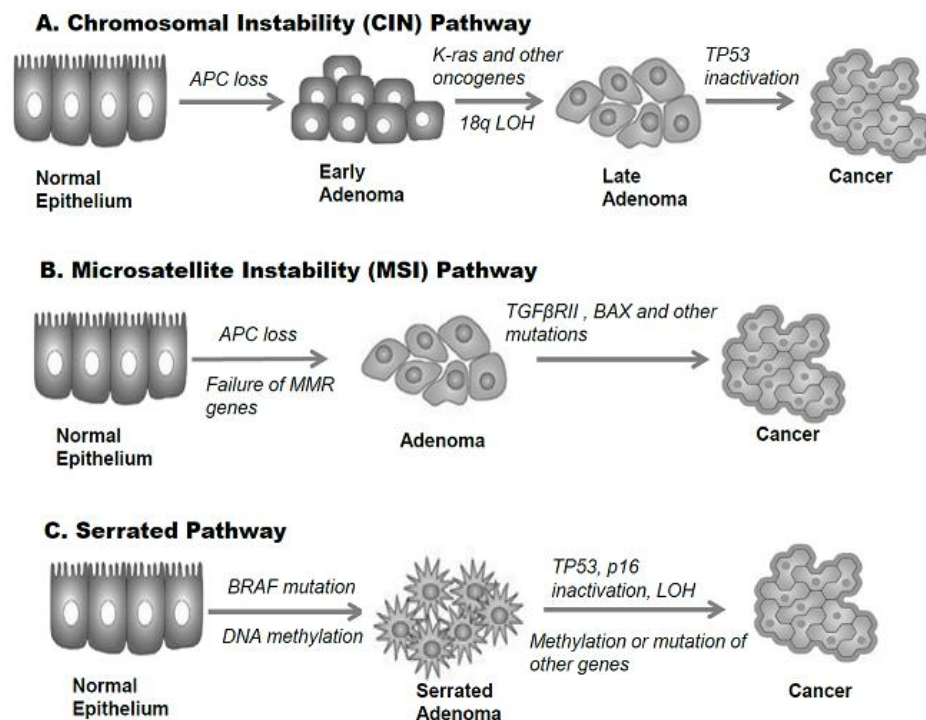
พบได้บ่อยกว่า (85%) และมีลักษณะของจำนวนโครโมโซมและโครงสร้าง (chromosome number และ structure) ที่เปลี่ยนไป เช่น แอนูพลอยดี (aneuploidy) และ การสูญเสียการทำงานของยีนทั้งสองตัว (loss of heterozygosity (LOH)) มักตรวจพบลักษณะความถี่ที่สูงขึ้นของดีเอ็นเอโซมาติกก็อปปี้นัมเบอร์ (DNA somatic copy number alterations (SCNA))

2.3.2 กลไกไมโครแซทเทลไลท์อินสแตบิลิตี (microsatellite instable (MSI))

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หมายถึงบริเวณที่เป็นนิวคลีโอไทด์ลักษณะซ้ำๆกัน (repetitive nucleotide sequence) ที่เกิดในกระบวนการการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ (DNA mismatches) ได้บ่อย หากมีกลายพันธุ์เกิดขึ้นกับยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA mismatch repair genes (MMR)) จะทำให้โปรตีนที่เกิดจากยีน ดังกล่าว สูญเสียหน้าที่การตรวจสอบและแก้ไขการกลายพันธุ์ไป ทำให้เกิดการเพิ่ม (insertion) หรือลบ (deletion) ดีเอ็นเอบนไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ซึ่งจะมีผลต่อสายดีเอ็นเอโดยอาจจะยาวขึ้นหรือสั้นลงกว่าปกติ ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า ไมโครแซทเทลไลท์อินสแตบิลิตี (microsatellite instable (MSI)) ซึ่งจะยับยั้ง (inactivate) หรือทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) มีผลทำให้เกิดมะเร็งขึ้น(14)

2.3.3 กลไกเอพิเจเนติกส์ (epigenetic DNA promotor hypermethylation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงปรับแต่งสารพันธุกรรมทั้งในระดับดีเอ็นเอและโครโมโซม โดยไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอตำแหน่งซีพีจี (CIMP, CpG island methylator phenotype) ของกลุ่มยีนต้านมะเร็งและยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนที่สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้, สัมพันธ์กับการเกิดต่งเนื้อชนิดเซสไซเซอร์เรเต็ด (sessile serrated adenoma)



ภาพที่ 2 พยาธิกำเนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (15)

2.4 การแบ่งชนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามลักษณะทางโมเลกุลาร์ (Consensus Molecular Subtypes (CMSs))

ปัจจุบันได้มีการแบ่งชนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะทางโมเลกุลาร์ ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกและการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน(16, 17)

2.4.1 กลุ่มที่ 1 (CMS1, microsatellite instability immune)

พบได้ 14%, สัมพันธ์กับการมีไมโครเซพเทลโลท์ อินสตาเบิลิตี้สูง (microsatellite instability immune), มีการกลายพันธุ์สูง (hypermuted), ความถี่ของเอสซีเอ็นเอต่ำ (SCNA), มีเมทิลเลชั่นสูง (CIMP high), มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันมาก (immune activation) และการกลายพันธุ์ของยีนบีราฟ (*BRAF*), มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก คือ เพศหญิง, มะเร็งลำไส้ฝั่งขวา (right sided lesion), เกรดทางพยาธิวิทยาสูง (higher histopathological grade), มีอัตราการรอดชีวิตต่ำหลังกลับเป็นซ้ำ (poor survival rate after relapse)

2.4.2 กลุ่มที่ 2 (CMS2, canonical)

พบได้ 37%, สัมพันธ์กับเซลล์เยื่อ (epithelial), ความถี่ของเอสซีเอ็นเอสูง (SCNA), สัมพันธ์กับการกระตุ้นผ่านกลไกดับบิวเอ็นทีและเอ็มวายซี (WNT และ MYC signaling activation), ความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก คือ มะเร็งลำไส้ฝั่งซ้าย (left sided lesion)

2.4.3 กลุ่มที่ 3 (CMS3, metabolic)

พบได้ 13%, สัมพันธ์กับเซลล์เยื่อและระบบเมตาบอลิซึมที่ผิดปกติไป (epithelial และ metabolic dysregulation), ความถี่ของเอสซีเอ็นเอต่ำ (SCNA) แต่สูงกว่ากลุ่มที่ 1, มีเมทิลลชันต่ำ (CIMP low), การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (*KRAS*)

2.4.4 กลุ่มที่ 4 (CMS4, mesenchymal)

พบได้ 23%, สัมพันธ์กับการกระตุ้นผ่านกลไกทีจีเอฟเบต้า (prominent transforming growth factor- β activation), เซลล์สตอร์มา (stromal invasion), การสร้างเส้นเลือด (angiogenesis), และกลไกอีเอ็มที (EMT, epithelial-to-mesenchymal transition) ความถี่ของเอสซีเอ็นเอสูง (SCNA), ความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก คือ พบได้มากกว่าในมะเร็งระยะ 3 และ 4, มีอัตราการรอดชีพและอัตราการมีชีวิตโดยปลอดโรค (overall survival และ relapsed free survival) แย่สุด

2.4.5 ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจน

พบได้ 13% ซึ่งอาจสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงได้ของมะเร็ง (transition phenotype) รวมถึงอาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ในมะเร็งก้อนเดียวกัน (intratumoral heterogeneity)

CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

ภาพที่ 3 การแบ่งชนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามลักษณะทางโมเลกุลาร์(16)

2.5 ยีนกลายพันธุ์ที่สำคัญในมะเร็งลำไส้ใหญ่

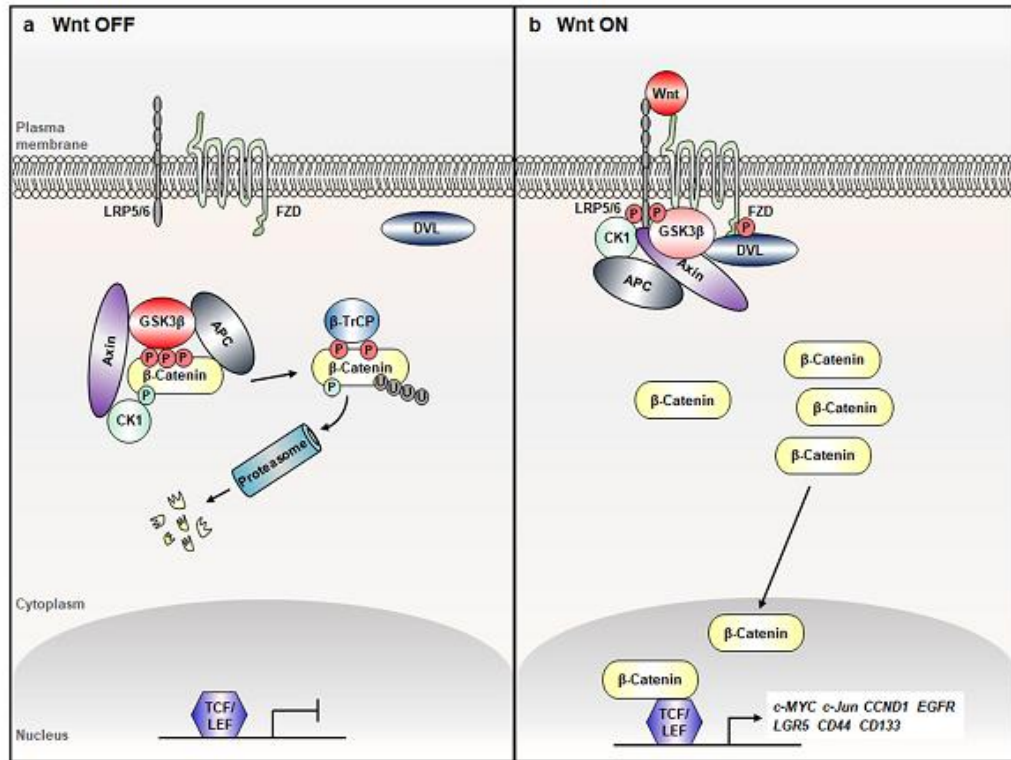
ยีนกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนหลัก ๆ 4 กลไก เริ่มจาก การกลายพันธุ์ของ ยีนเอพีซี (APC) ที่อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 5(5q) ทำให้เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นก้อนเนื้ออกแบบไม่ร้ายแรง (benign adenoma) ตามด้วยการกลายพันธุ์ของ ยีนเคราส (KRAS) ซึ่งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 12(12p) และ ยีนเอสเอ็มเอ็ด/ดีซีซี (SMADs/DCC) ซึ่งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 18(18q) ก้อนเนื้ออกจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้ออกที่มีผิวยื่นขรุขระของวิลไล (villi) ซึ่งเป็นลักษณะที่ร้ายแรงขึ้นมาอีก (mild, moderate และ severe dysplasia) ร่วมกับการสูญเสียการทำงานของยีนพีห้าสิบสาม (p53) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 17 ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนสถานะของวัฏจักรเซลล์ระหว่างจี1กับเอส (G1/S transition) ก้อนเนื้ออกนั้นจึงกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ การดำเนินโรคนี้นี้จากก้อนเนื้ออกแบบไม่ร้ายแรงเป็นมะเร็ง (adenoma to carcinoma sequence) ใช้เวลา 5-10 ปี(18)

2.5.1 ยีนเอพีซี(Adenomatous polyposis coli (APC))

อยู่บนโครโมโซม 5คว21(5q21) ยีนเอพีซี เป็นยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้ง (tumor suppressor gene) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับของโปรตีนเบต้าแคททีนิน (β -Catenin) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการยึดติดกันของเซลล์ การเคลื่อนย้ายของเซลล์ หากระดับของโปรตีนชนิดนี้สูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการคัดลอก (transcription) ดีเอ็นเอ สูงผิดปกติไปด้วย ทำให้เกิดการสร้างเซลล์ใหม่จำนวนมาก การกลายพันธุ์ของยีนเอพีซี (APC) จะส่งผลกระทบต่อการควบคุมระดับของเบต้าแคททีนิน (β -Catenin) ผลที่ตามมาคือ ยีนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (differentiation) คือ ไซคลินดี-1 (cyclin D1), ซีมีค (c-myc) จะไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ ทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์มากผิดปกติจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง บทบาทที่สำคัญอีกประการหนึ่งของยีนเอพีซี (APC) คือ การควบคุมวัฏจักรการสร้างเซลล์ (cell cycle) โดยยีนเอพีซี (APC) ยับยั้งการสร้างเซลล์ในระยะจี0/จี1 (G0 / G1) ไม่ให้เข้าสู่ระยะเอส (S) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเซลล์มะเร็งขึ้นอีกทั้งยังช่วยในการรักษาเสถียรภาพของ โครโมโซม

2.5.2 ยีนซีทีเอ็นเอ็นบีวัน(CTNNB1)

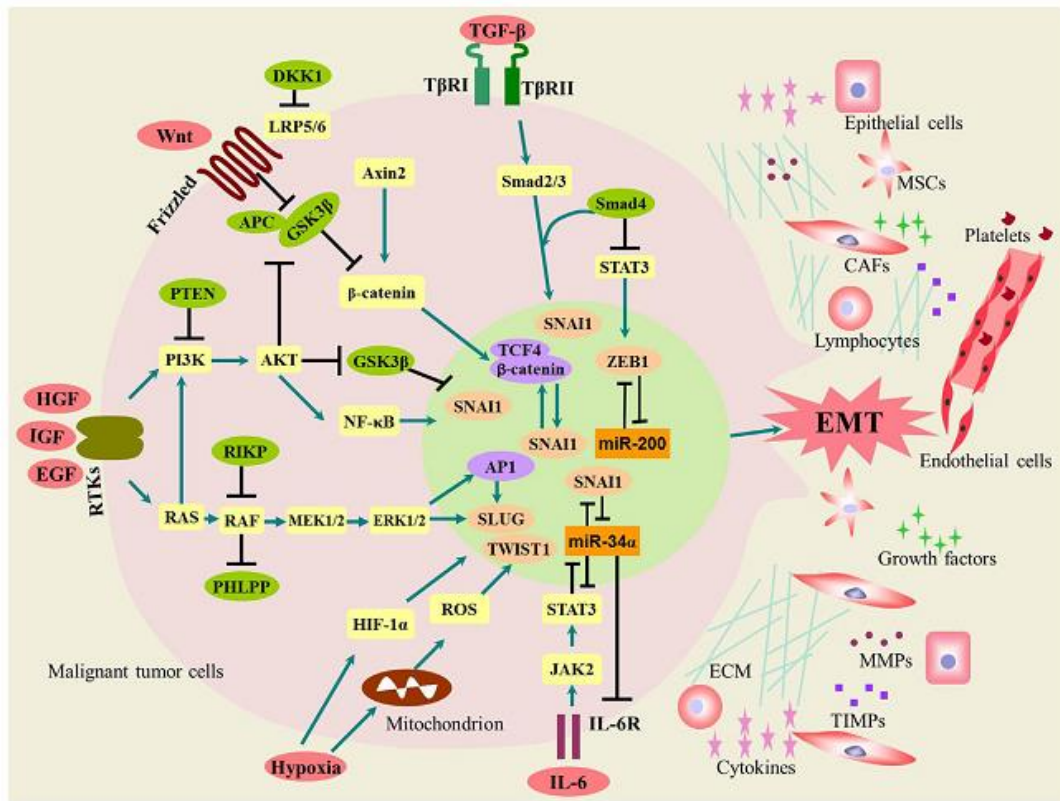
เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเบต้าแคททีนิน (β -Catenin)



ภาพที่ 4 กลไกดับขลิวเอ็นที (canonical Wnt/ β -catenin pathway)(19)

2.5.3 กลไกทีจีเอฟเบต้า(TGF- β /Smad signaling pathway)

เป็นกลไกที่สัมพันธ์กับการเกิดกลไกอีเอ็มที (EMT, epithelial-to-mesenchymal transition) ที่ทำให้เกิดการลุกลามและกระจายของมะเร็ง (tumor invasion และ metastasis) โดยเริ่มจากทีจีเอฟเบต้าลิแกนด์ (TGF- β ligand) จับกับตัวรับ (T β RI และ T β RII)ทำให้เกิดกับจับคู่กันของรับ (dimerization) กระตุ้นให้เกิดการจับกันของเอสเอ็มเอตี 2,3,4 (SMAD2,3,4) เข้าไปในนิวเคลียสทำหน้าที่ควบคุมยับยั้งการคัดลอก (transcription) ดีเอ็นเอ การกลายพันธุ์ของยีนเอสเอ็มเอตี 4 (SMAD4) ทำให้ขาดการควบคุมเซลล์และเกิดการกระจายของมะเร็ง(20)



ภาพที่ 5 กลไกที่จีเอฟเบต้า(TGF- β /Smad signaling pathway)(20)

2.5.4 ยีนคราส (*KRAS*(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)) และเอ็นราส (*NRAS*(neuroblastoma RAS viral oncogene homolog))

เป็นโปรตีนที่เกิดหลังจากอีจีเอฟลิแกนด์ (EGF ligand) จับกับตัวรับอีจีเอฟอาร์ (epidermal growth factor receptor (EGFR)) ซึ่งจะไปกระตุ้นกลไกลำดับถัดๆไปผ่านทางพีไอสามเค/เอเคที/เอ็มทอร์(PI3K/AKT/MTOR) และ อาร์เอเอฟ/เอ็มอีเค/อีอาร์เค (RAF/MEK/ERK) ต่อไป ทำให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต,แบ่งเซลล์และเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์ (cell growth, proliferation, และ differentiation)

การกลายพันธุ์ของยีนราส (*RAS*(axon2,3,4)) ประกอบด้วยการกลายพันธุ์ของยีนคราส (*KRAS*) และ เอ็นราส (*NRAS*) พบได้ประมาณ 35-45% ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง, ในประเทศไทยมีรายงานพบได้ 26.6%, มีความสัมพันธ์กับการไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านอีจีเอฟอาร์ (anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MoAbs)) เช่น ยาเซ็ทแทกซิแมบ (Cetuximab), แพนิทูมูแมบ (Panitumumab) ในระยะแพร่กระจาย มีอัตราการ

ตอบสนอง(response rates) และการรอดชีพ(survival) แย่กว่าคนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้(21, 22)

2.5.5 ยีนบีราฟ (*BRAF*(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1))

การกลายพันธุ์ของยีนบีราฟพบได้ประมาณ 5-10% ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย พบว่าสัมพันธ์กับการมีอัตราการรอดชีพ(survival) แย่ โดยไม่ขึ้นกับวิธีการรักษา(12, 23), 80% ของการกลายพันธุ์ของยีนบีราฟ (*BRAF* mutations)เป็นชนิดวี600อี (V600E substitution) และพบว่าสัมพันธ์กับมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีลักษณะดังต่อไปนี้ ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon), การกระจายไปต่อมน้ำเหลือง (lymph node metastasis), มะเร็งระยะที่4 (T4 tumors), มีลักษณะทางพยาธิวิทยาเกรดสูง (high grade) และเซลล์เป็นชนิดมิวซินัส (mucinous histology) รวมถึงมีเอ็มเอสไอสูง (MSI-H/dMMR status)(12)

การกลายพันธุ์ของยีนบีราฟ (*BRAF*), กับเคราส (*KRAS*) หรือเอ็นราส (*NRAS*) จะไม่พบพร้อมกัน (mutually exclusive)(12)

Francesco Passiglia(21) และคณะได้ทำการศึกษาแบบการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดตับ พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส(*KRAS*) 18-52%, บีราฟ (*BRAF*) 2-4% และพบว่า การมีอัตราการรอดชีพของยีนเคราส (*KRAS*) มีอัตราการรอดชีพโดยปลอดโรค (RFS) (HR: 1.65; 95% CI: 1.23–2.21) และอัตราการรอดชีพโดยรวม (OS) (HR: 1.86; 95% CI:1.51–2.30) ที่แย่กว่า รวมถึงการมีอัตราการกลายพันธุ์ของยีนบีราฟ (*BRAF*) มีอัตราการรอดชีพโดยรวม (OS) (HR: 3.90; 95% CI: 1.96–7.73) ที่แย่กว่า

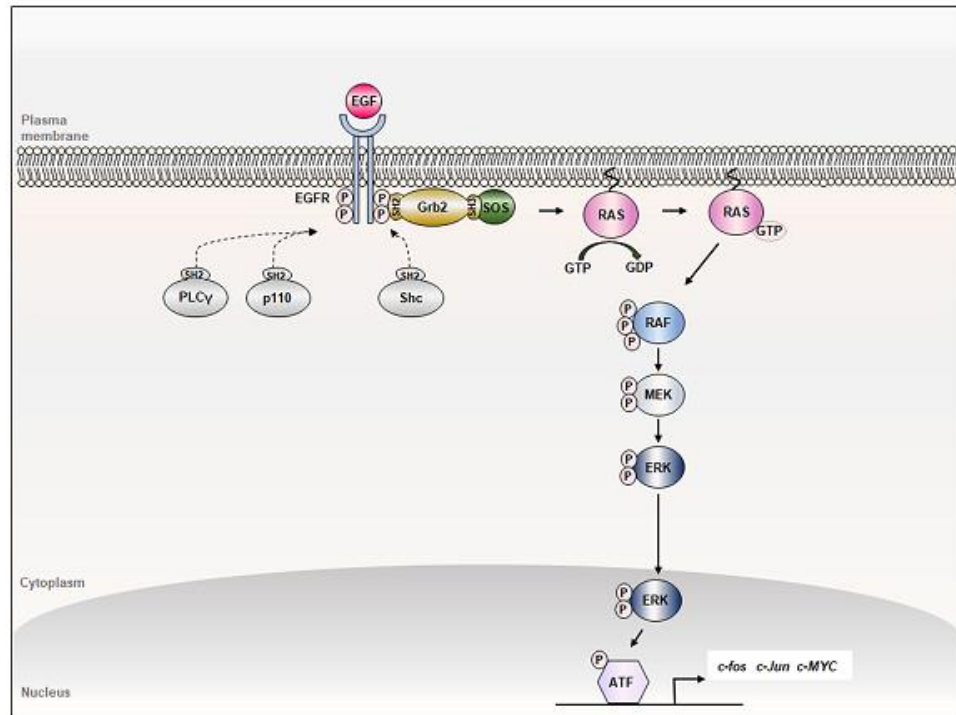
2.5.6 ภาวะเอ็มเอสไอสูง(MSI-H)

สัมพันธ์กับมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีลักษณะดังต่อไปนี้ ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon), มีลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบแย่ (poor differentiation), เซลล์ชนิดมิวซินัส (mucinous) หรือซิกเน็ทริง (signet ring), และพบมีเซลล์ลิมโฟไซต์มาก (increased numbers of tumor-infiltrating lymphocytes)(24)

Kenji Fujiyoshi(14) และคณะได้ทำการศึกษาพบว่าภาวะเอ็มเอสไอสูง (MSI-H) พบได้ 3.7% ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะที่ 4 และอัตราการรอดชีพ (survival) ไม่แตกต่างกันระหว่างเอ็มเอสไอสูง (MSI-H) เทียบกับเอ็มเอสเอส (MSS) [3.92 vs. 2.50 years; hazard ratio(HR)=0.892, 95% confidence interval (CI)=0.42-1.89,p=0.766]

Riad Haddad(25) และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดตับ พบว่ามีภาวะเอ็มเอสไอสูง (MSI-H)ได้ 2.7% และค่ามัธยฐานอัตราการรอดชีพโดยรวม(median survival) หลังผ่าตัดตับ(hepatic resection) ของภาวะเอ็มเอส

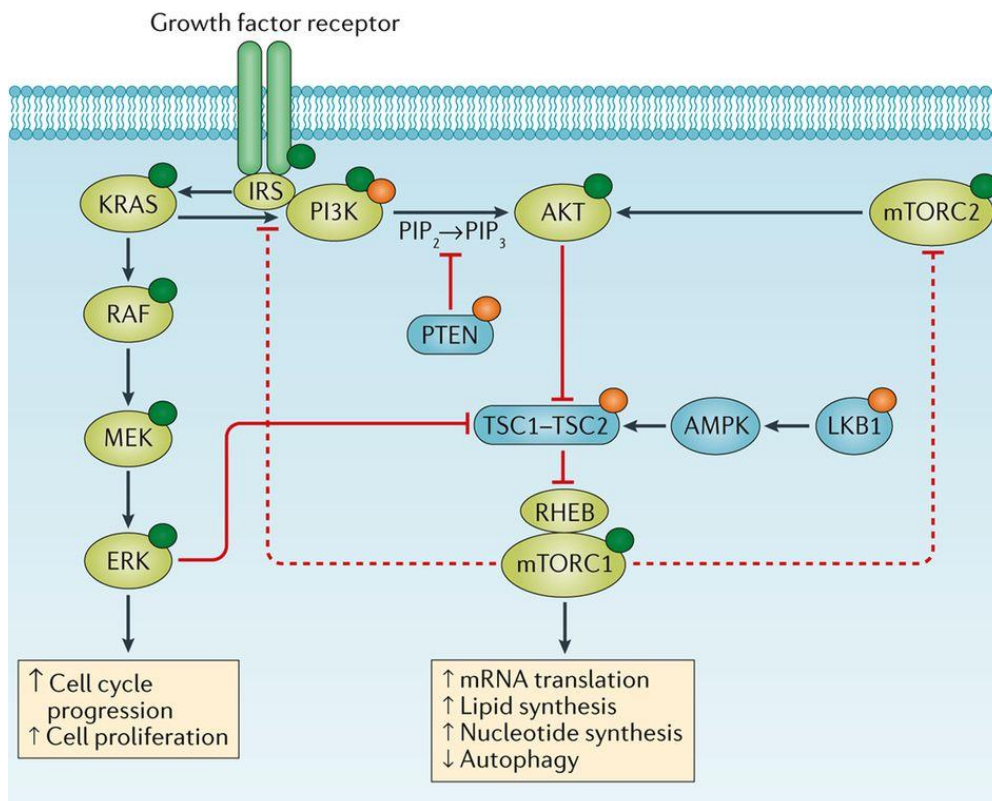
ไอสูง(MSI-H)และไม่มีภาวะเอ็มเอสไอสูง(non-MSI-H) ไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 67 and 61 เดือน ตามลำดับ(P = 0.9)



ภาพที่ 6 กลไกการส่งสัญญาณ (RAS-ERK signaling pathway)(19)

2.5.7 ฟอสโฟอินซอสitol-3-ไคเนส (Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K))

เป็นตัวที่กระตุ้นการแบ่งตัวของ (cellular proliferation) ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดตามหลัง (downstream effectors)ของการกระตุ้นผ่านกลไกอีจีเอฟอาร์ (EGFR pathway), ฟอสโฟอินซอสitol-3-ไคเนส (PI3K) เป็นส่วนประกอบหนึ่ง (catalytic subunit) ของฟอสโฟอินซอสitol-3-ไคเนส (PI3K), การกลายพันธุ์ของฟอสโฟอินซอสitol-3-ไคเนส (PI3K mutations) พบได้ 10–20% ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงและพบบ่อยที่ เอ็กซอน 9 และ 20 (exon 9 และ exon 20), สามารถพบร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีนบราฟ (BRAF) ได้ 50% และพบร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีนราส (RAS) ได้ 40%, สัมพันธ์กับการตายจากโรคมะเร็ง (cancer-specific mortality) ที่เพิ่มขึ้น(12)



ภาพที่ 7 กลไกฟอสฟาไทโอสลามเค (Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 K))(26)

2.6 เทคโนโลยีเอ็นจีเอส (Next generation sequencing (NGS) technologies)

2.6.1 หลักการทำงาน

เทคโนโลยีเอ็นจีเอส เป็นเทคนิคเพื่อหาลำดับเบส (DNA sequencing) ซึ่งสามารถตรวจได้ทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยใช้วิธีที่เรียกว่า shotgun sequencing เริ่มต้นจากการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template library preparation) และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นชิ้นสั้นๆ (DNA fragment) จำนวนนับพันล้านชิ้น นำชิ้นดังกล่าวเชื่อมต่อกับบอดีบอดีเตอร์ (adaptor) และเพิ่มปริมาณต้นแบบ วิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอได้พร้อมๆ กันแบบขนาน (parallel) เมื่อหาลำดับเบสจะได้ลำดับเบสสายสั้น (reads) ความยาวเฉลี่ย 30 ถึง 500 คู่เบส ขึ้นอยู่กับเครื่องมือแต่ละแบบ ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมหาศาล และมีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าการหาลำดับเบสแบบเดิมด้วยเทคโนโลยีของแซงเกอร์ (Sanger's technology) ซึ่งอาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain termination ด้วยการนำนิวคลีโอไทด์มาติดฉลากรังสี หรือสารเรืองแสง ซึ่งแต่ละนิวคลีโอไทด์จะมีการติดฉลากที่ต่างกัน จากนั้นใช้เอนไซม์ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ลำดับเบสที่บันทึกได้ใหม่จะประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวที่ติดฉลากนั้น

โดยวิธีนี้สามารถอ่านลำดับเบสได้ช่วง 1,000 ถึง 1,200 คู่เบส แต่มีข้อจำกัดในการอ่านลำดับเบสที่ยาวกว่าสองกิโลเบส ทำให้ไม่เหมาะสมกับการหาลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่ เช่น จีโนมมนุษย์ ซึ่งต้องใช้เวลาในการหาลำดับเบสนาน และในกระบวนการหาลำดับเบสหนึ่งครั้ง มักได้จำนวนลำดับเบสสายสั้น (reads) ค่อนข้างน้อย หลังจากนั้นข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่ละชิ้นจะถูกนำมาประกอบกันใหม่ (assemble) เพื่อให้ทราบลำดับเบสรวมทั้งหมดของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา

2.6.2 การนำไปประยุกต์ใช้

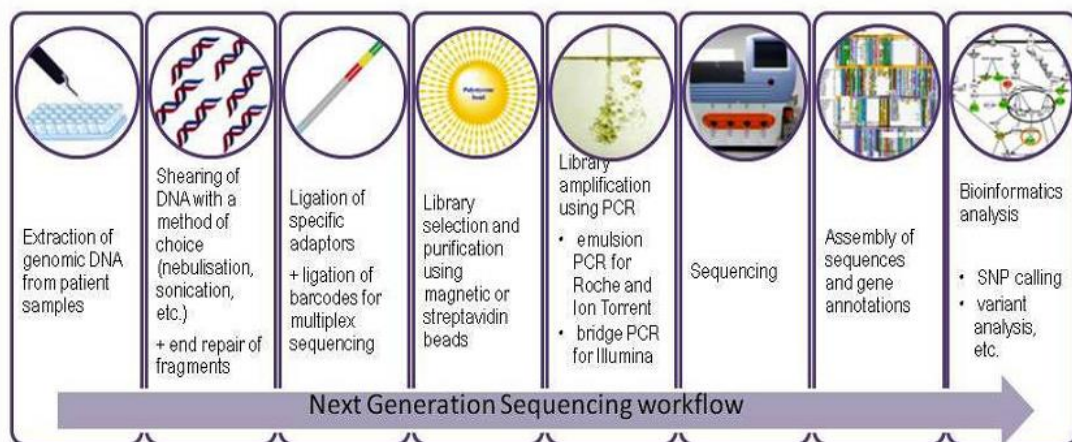
ความผิดปกติที่สามารถตรวจพบได้จากการหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ได้แก่ สนิปส์ (single nucleotide polymorphisms (SNPs)), อินเดล (base insert/deletions (indels)) และ การแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (Copy number variation (CNV)), ไม่สามารถตรวจหากระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetic change) หรือการสลับไปมาของยีน (gene rearrangement)

ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโอมิกส์ได้หลากหลาย เช่น การทำ *de novo* sequencing, target resequencing, RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้น เพื่อนำไปสู่การทำนายปรากฏการณ์ทางพันธุกรรมหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมถึงนำมาใช้ในงานทางคลินิก เช่น Noninvasive prenatal testing (NIPT) การวินิจฉัยก่อนคลอดโดยใช้ cell-free fetal DNA ที่ปนอยู่ในเลือดของมารดา, Comprehensive cancer panels การหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งหลายๆ ยีนในการตรวจครั้งเดียว เพื่อช่วยในการวินิจฉัย เลือกให้ยา ติดตามผลการรักษา หรือทำนายการดำเนินโรค, Assessment of diseases of unknown etiology การหาที่มาของโรคซึ่งไม่ทราบสาเหตุ เช่น โรคทางพันธุกรรมหายาก (rare disease) ต่างๆ รวมถึง Whole exome sequencing (WES) ที่ทำในงานวิจัยนี้ เป็นเทคนิคที่ใช้หาลำดับเบสของจีโนมในส่วนที่จีโนมที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีน (Exome) หรือเป็นส่วนของตำแหน่งที่เรียกว่า coding region ประโยชน์เพื่อจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติหรือการเกิดโรค

ข้อมูลส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการแปลความหมายของรหัสพันธุกรรมเหล่านี้ เป็นข้อมูลที่ได้มาศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงรหัสทางพันธุกรรมเช่น Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) กับโรคจาก genome-wide association study (GWAS) ในประชากรต่างชาติ เช่น ยุโรป หรือ อเมริกา ดังนั้นการนำเอาผลการศึกษาจากต่างชาติมาใช้กับประชากรไทย

โดยตรง ควรต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง ถ้าไม่มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบผลของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเหล่านี้ในประชากรไทยก่อน

เพื่อให้การตรวจการกลายพันธุ์มีความถูกต้องมากขึ้น เทคโนโลยีเอ็นจีเอสที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อมะเร็งจำเป็นที่จะต้องมามีข้อมูลของการกลายพันธุ์แต่ละตำแหน่ง (coverage) ซ้ำๆกันจำนวนมาก ทั้งนี้ลำดับความซ้ำซ้อนของข้อมูลที่ยอมรับกันว่าน่าเชื่อถือสำหรับข้อมูล NGS ที่ควรใช้สำหรับการวินิจฉัยทางคลินิกและการรักษาเชิงบุคคล อย่างต่ำควรอยู่ที่ 50x



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส(27)

2.6.3 รูปแบบของเทคโนโลยีเอ็นจีเอส

ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอสมีหลายรูปแบบ ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ 454/Roche, Illumina, Ion Torrent/Life Technology และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยแต่ละรูปแบบจะแตกต่างกันในเรื่องการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส ความแตกต่างของข้อมูลความยาวลำดับเบสที่ได้ และระดับความถูกต้องของข้อมูล ในที่นี้จะขอกล่าวถึงกระบวนการการทำงานของเครื่อง Illumina เป็นหลัก เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิธีครั้งนี้

NGS technology	454/Roche	Illumina/Solexa	SOLID/ABI	Polonator/G.007	Helicos	SMRT (Pacific Biosciences)
Chemistry	Pyrosequencing	Polymerase-based	Ligation-based	Ligation-base	Reversible Dye terminators	Phospho-linked Fluorescent Nucleotides
Amplification	Emulsion PCR	Bridge Amp	Emulsion PCR	Emulsion PCR	No (single molecule)	No (single molecule)
Sequence by synthesis	Pyrosequencing	Reversible Dye terminators	Oligonucleotide probe ligation	Sequencing by ligation using a random arrayed, bead-based, emulsion PCR	Single molecule sequencing	Single molecule real time
Paired ends/sep. Data	Yes/3 kb	Yes/200 bp	Yes/3 kb	Yes/13 bp	25-55 bp	NA
production/day	400 Mb/run/7.5 hr	3,000 Mb/run/6.5 days	4,000 Mb/run/6 days	~16 Gb/run/2.5 days	8 days	0.02 days
Sequencing/run	10 hours	2-5 days	6 days	~80 hours	12	< 1
Raw accuracy	99.5%	>98.5%	99.94%	>98%	>99%	NA
Read length	400 bp	100 bp	50 bp	26 bp	35 average length	Longer than 1000
Cost per run (total)	\$8439	\$8950	\$17447	\$3500	Lower than second NGS	Lower than second NGS

ภาพที่ 9 เปรียบเทียบความแตกต่างของเครื่องมือในการทำเอ็นจีเอสรูปแบบต่างๆ (28)

2.6.4 ขั้นตอนการหาลำดับเบสโดยเครื่อง Illumina

หลักการ คือ การหาลำดับเบสโดยใช้การติดฉลากเบสด้วยสารเรืองแสงของทั้งสี่เบสรวมกับการตัดแปลงให้มีคุณสมบัติหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและคืนสภาพกลับเพื่อให้ต่อสายดีเอ็นเอได้ (fluorescent reversible terminator nucleotide) และเพิ่มปริมาณของสายดีเอ็นเอเชื่อมต่อเป็นสะพานบนสถานะของแข็ง (solid-phase bridge amplification) ได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

2.6.4.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction)

นำชิ้นเนื้อมะเร็งที่เก็บในรูปแบบ Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) โดยเลือกเฉพาะเซลล์มะเร็งมาสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ควรมีคุณภาพดี คือ เป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่ไม่สลาย (non degraded double-strand DNA), ไม่มีอนุภาค (particulate matter) อื่นเจอปน, มีค่าวัดคุณภาพดีเอ็นเอตามมาตรฐาน คือ A260/280 ratio มากกว่าเท่ากับ 1.8 และมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 1 ไมโครกรัม

2.6.4.2 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library)

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจจะถูกตัด ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่สั้นลง ความยาวน้อยกว่า 800 คู่เบส จากนั้น ส่วนปลายที่ถูกทำลายจะถูกซ่อมแซมด้วยเอ็นไซม์ T4 DNA polymerase, Klenow enzyme และ T4 poly nucleotide kinase และ เติมนิวคลีโอไทด์เบส A ที่ปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอ นั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในช่วงของการเชื่อม จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกเชื่อมด้วยอะแดปเตอร์ที่ปลายทั้งสองข้าง (3' และ 5') ซึ่งมีขนาดความยาวประมาณ 66 คู่เบส และติดเบส T ที่ปลายทั้งสองข้าง หลังจากนั้น คัดแยกสายดีเอ็นเอ

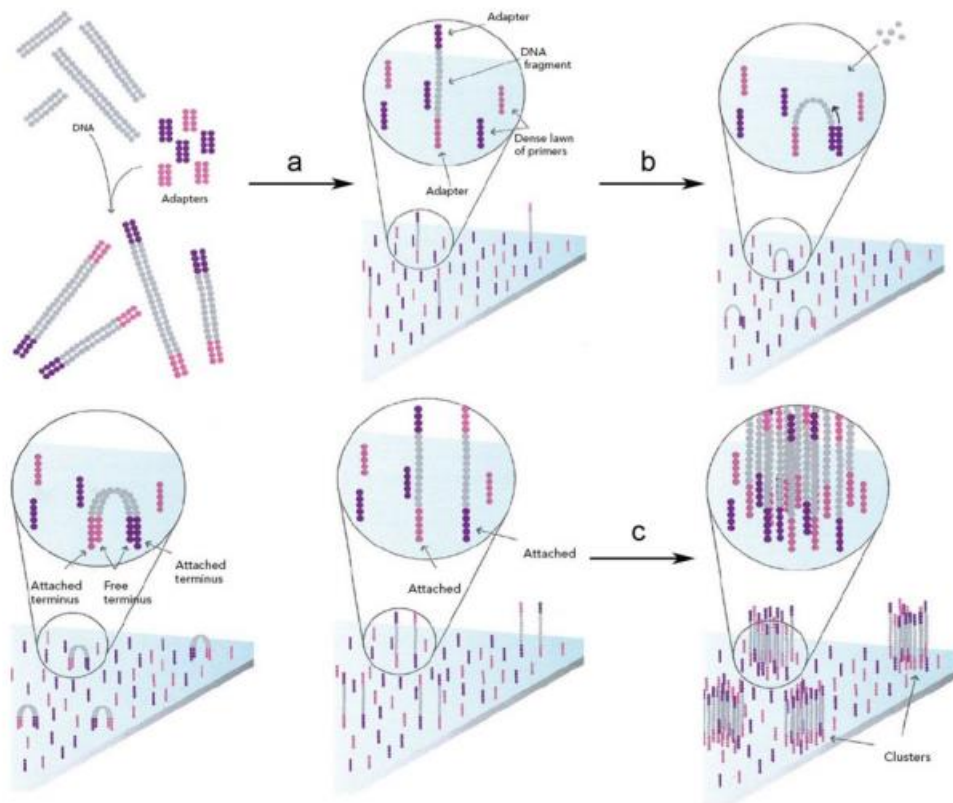
ความยาวประมาณ 150 ถึง 200 คู่เบส บนเจล และเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)



ภาพที่ 10 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ(29)

2.6.4.3 การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี *bridge amplification*

หลังจากขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอสายเดี่ยวใส่ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (flow cell channels) แบบสุ่ม โดยผิวของแผ่นกระจกสไลด์ถูกฉาบด้วยตัวอะแดปเตอร์และอะแดปเตอร์ที่เป็นคู่สมกัน (complementary adapters) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนไพรเมอร์ใช้ในช่องของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวหนึ่งโมเลกุลจะจับกับอะแดปเตอร์บนแผ่นกระจกสไลด์เป็นรูปสะพานโค้งเชื่อมต่อนั้นเติมนิวคลีโอไทด์และเอนไซม์ เพื่อเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณแบบสะพาน (bridge amplification) ได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่รูปสะพานโค้ง (double-stranded bridges) และดีเอ็นเอสายคู่จะถูกแยกได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบอีกครั้ง หลังจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์เสร็จสิ้น จะได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอมากกว่า 50 ล้านกลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยจำนวนดีเอ็นเอประมาณ 1,000 ชุดในแต่ละช่อง

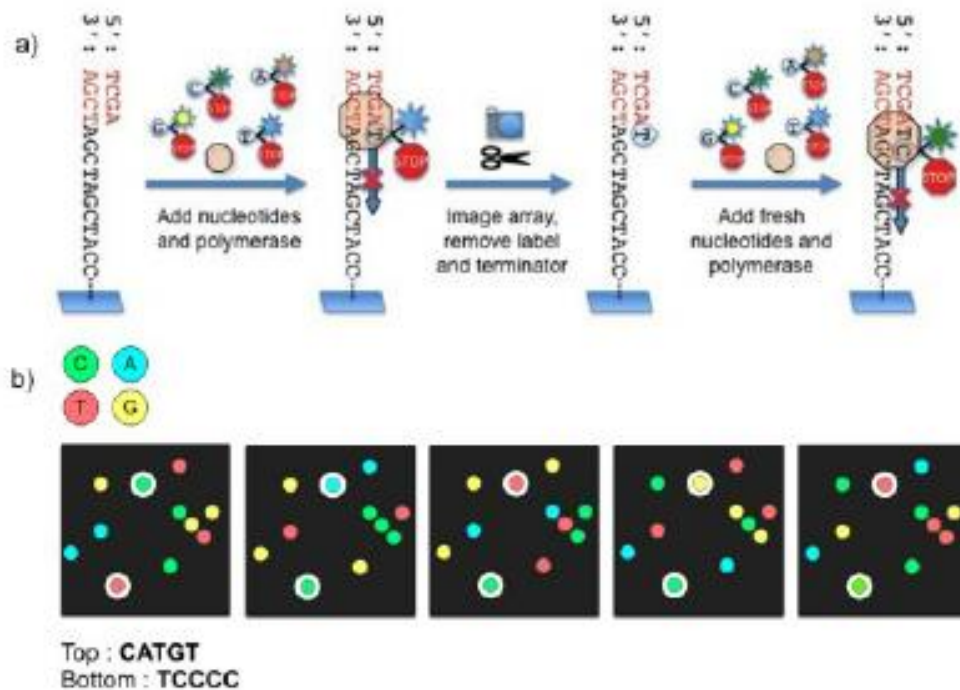


ภาพที่ 11 การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี bridge amplification
(Image courtesy of www.illumina.com)

2.6.4.4 การหาลำดับเบส

ใช้หลักการ sequencing by synthesis โดยให้ไพรเมอร์สำหรับหาลำดับเบสจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จำเพาะนั้นๆ ในช่วงเริ่มต้นของการหาลำดับเบส มีการเติมเอ็นไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่เบสที่ติดด้วยสารเรืองแสงที่มีสีต่างกัน โดยนิวคลีโอไทด์ที่เติมจะมีคุณสมบัติหยุดการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ คือมีหมู่มเคมีที่ป้องกันการต่อสายที่ปลาย 3' OH ไว้ ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหยุดลง (reversible terminator) และนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้เข้า คู่กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เหลือจะถูกล้างออก หลังจากการกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ จะมีการบันทึกภาพการปลดปล่อยสารเรืองแสงของนิวคลีโอไทด์จากแต่ละกลุ่มบนแผ่นกระจกสไลด์ที่ได้ เพื่อบันทึกความเหมือนกันของเบสแรกสำหรับกลุ่มนั้นๆ ตามด้วยขั้นตอนการตัด (cleavage) เพื่อกำจัด terminator และ fluorescent dye ออกไป ล้างอีกครั้ง จากนั้นเติมนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่ และเอ็นไซม์ DNA polymerase เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อไป ทำซ้ำแบบนี้ไปเรื่อยๆ โดยแต่ละรอบ (cycle) จะเป็นตัวกำหนดลำดับเบสที่อ่านได้ในแต่ละครั้ง เครื่อง Illumina ตั้งแต่รุ่น HiSeq 2000 สามารถสังเคราะห์ลำดับสายดีเอ็นเอ

เอได้จากปลายทั้งสองด้าน (Paired-end sequencing) ของแผ่นกระจกสไลด์ (flow cell) ลดเวลาการหาลำดับเบสลง 2 เท่า และสามารถอ่านความยาว reads ได้ถึง 150 คู่เบสขึ้นไป และในการหาลำดับเบสหนึ่งครั้ง จะได้จำนวนของเบสมากถึง 600 กิกะเบส ความถูกต้องของเบสที่ได้มากกว่าร้อยละ 99.5(28, 30-33)



ภาพที่ 12 การหาลำดับเบส(28)

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสโดยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส จะอยู่ในไฟล์รูปแบบมาตรฐาน คือ FASTQ (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นข้อมูลตัวอักษร (text-based format) ประกอบด้วยข้อมูล 4 บรรทัดต่อ 1 ลำดับเบส(sequence) ได้แก่

บรรทัดที่ 1 : ขึ้นต้นด้วย @ ตามด้วยรหัสไอดี(read ID) ของลำดับเบสนั้น ๆ

บรรทัดที่ 2 : ลำดับเบสที่ลักษณะเป็นตัวอักษรเรียงกัน(sequenced bases)

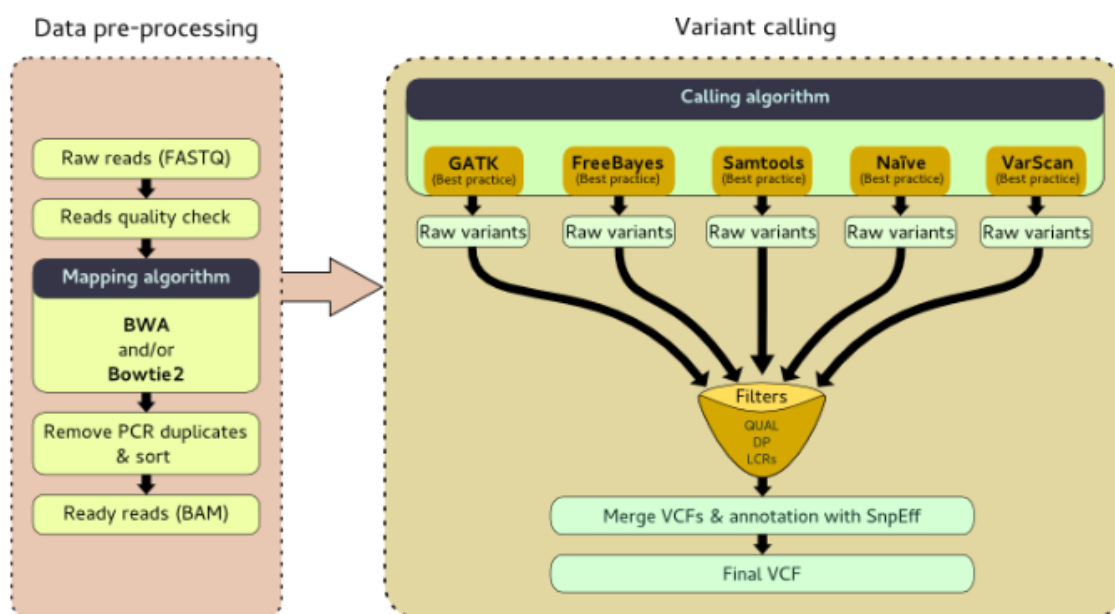
บรรทัดที่ 3 : ขึ้นต้นด้วยเครื่องหมาย + และอาจตามด้วยรหัสไอดี(read ID)รวมถึงข้อมูลอื่นๆ

บรรทัดที่ 4 : คะแนนความถูกต้องของลำดับเบส (quality scores)

```
@M02286:19:000000000-AA549:1:1101:12677:1273 1:N:0:23
CCTACGGGTGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCT
+
ABC8C,:@F:CE8,B-,C,-6-9-C,CE9-CC--C-<-C++,,+;CE
```

ภาพที่ 13 ตัวอย่างของไฟล์ FASTQ(34)

ไฟล์ FASTQ เป็นข้อมูลดิบ(Raw data) ซึ่งต้องนำมาปรับปรุงข้อมูลและวิเคราะห์ผ่านขั้นตอนต่างๆ ก่อนจะนำไปแปลผลได้ ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่ 1) การประเมินคุณภาพและปรับปรุงคุณภาพของไฟล์ FASTQ, 2) การเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง(Read mapping on a reference genome), 3) การตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติ (variant calling), 4) การแปลผลความสำคัญของลำดับเบสที่ผิดปกติ(variant annotation) ปัจจุบันมีเครื่องมือหลากหลายที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

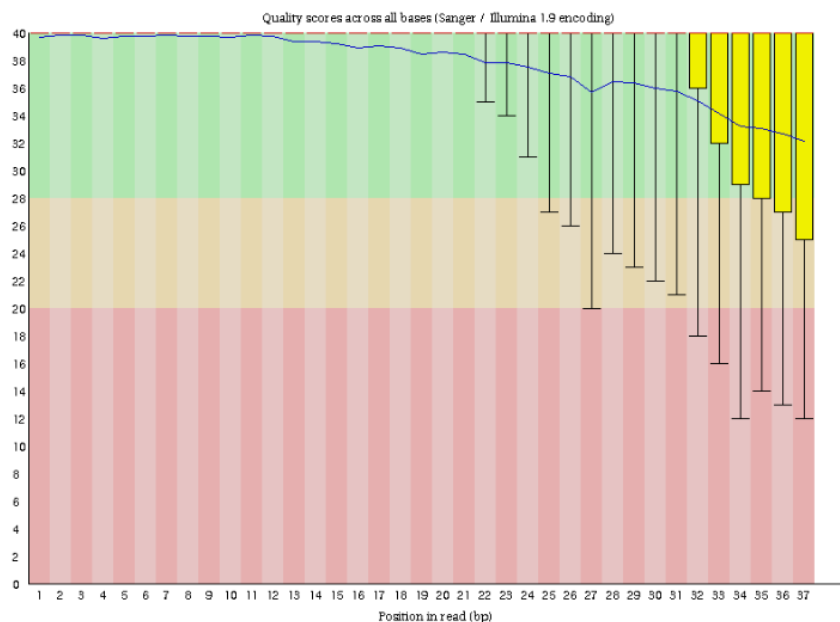


ภาพที่ 14 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล(35)

2.7.1 การประเมินคุณภาพและปรับปรุงคุณภาพของไฟล์ FASTQ (Quality control)

เป็นการประเมินคุณภาพและปรับปรุงคุณภาพของไฟล์ FASTQ ผ่านเครื่องมือต่างๆ เช่น FASQC ซึ่งสามารถแสดงผลการประเมินคุณภาพออกมาเป็นค่าสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 13 หลังจาก

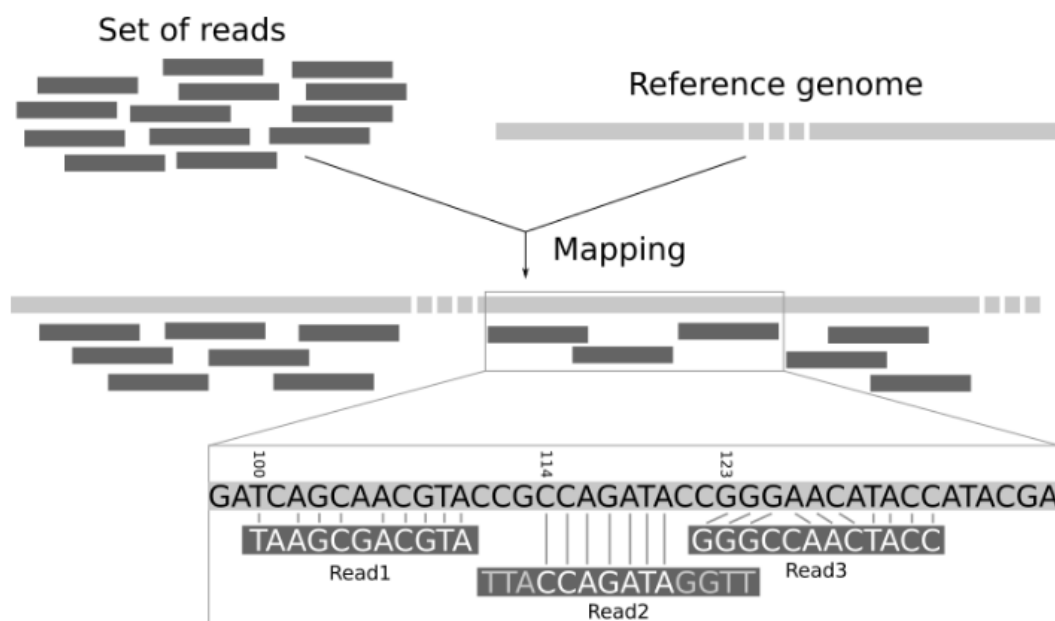
ประเมินคุณภาพคุณภาพของลำดับเบส ก็สามารถคัดกรองลำดับเบสที่มีคุณภาพต่ำออกไปได้โดยอาศัยเครื่องมือต่าง ๆ เช่น Cutadapt tool เป็นต้น



ภาพที่ 15 แสดงคะแนนคุณภาพของลำดับเบสบริเวณต่างๆ คะแนนที่น้อยแสดงถึงความถูกต้องของลำดับเบสน้อย(36)

2.7.2 การเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง (Read mapping on a reference genome)

เมื่อได้ลำดับเบสที่มีคุณภาพตามที่ต้องการแล้ว ก็นำลำดับเบสที่ได้มาจัดเรียงเทียบกับลำดับเบสมาตรฐาน(reference genome)ของมนุษย์ ผ่านฐานข้อมูลต่าง ๆ เช่น Homo sapiens (human) genome assembly GRCh37 (hg19) หรือ GRCh38 (hg38) โดยมีเครื่องมือที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ Bowtie, BWA, BWA-MEM เป็นต้น หลังการจัดเรียงลำดับเบสไฟล์ FASQ จะถูกเปลี่ยนเป็นไฟล์ BAM หรือ SAM



ภาพที่ 16 แสดงการเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง(37)

2.7.3 การตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant calling)

เป็นการระบุตำแหน่งของลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสมาตรฐาน(reference genome) และกำหนดว่าเกิดความผิดปกติขึ้นแบบไหน เช่น ซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels) เครื่องมือที่ใช้มีหลากหลาย เช่น FreeBayes, GATK, VarScan, Samtools เป็นต้น ไฟล์ BAM หรือ SAM จะถูกเปลี่ยนเป็นไฟล์ VCF

2.7.4 การแปลผลความสำคัญของลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant annotation)

เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้สามารถแยกจีโนมที่ผิดปกติออกมา โดยอาจจะเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมปกติจากผู้ป่วยรายเดียวกัน (matched normal genome) หรือในกรณีที่ไม่มีข้อมูลของจีโนมปกติจากผู้ป่วยรายเดียวกันให้เปรียบเทียบ อาจใช้ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนปกติเช่น dbSNP จาก US National Center for Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) หรือ ข้อมูลจากโครงการ 1000 Genome Project (www.1000genomes.org) ซึ่งจะได้ข้อมูลออกมาเป็นความผิดปกติแบบใด และเกิดขึ้นที่ตำแหน่งหรือยีนใด(34-37)

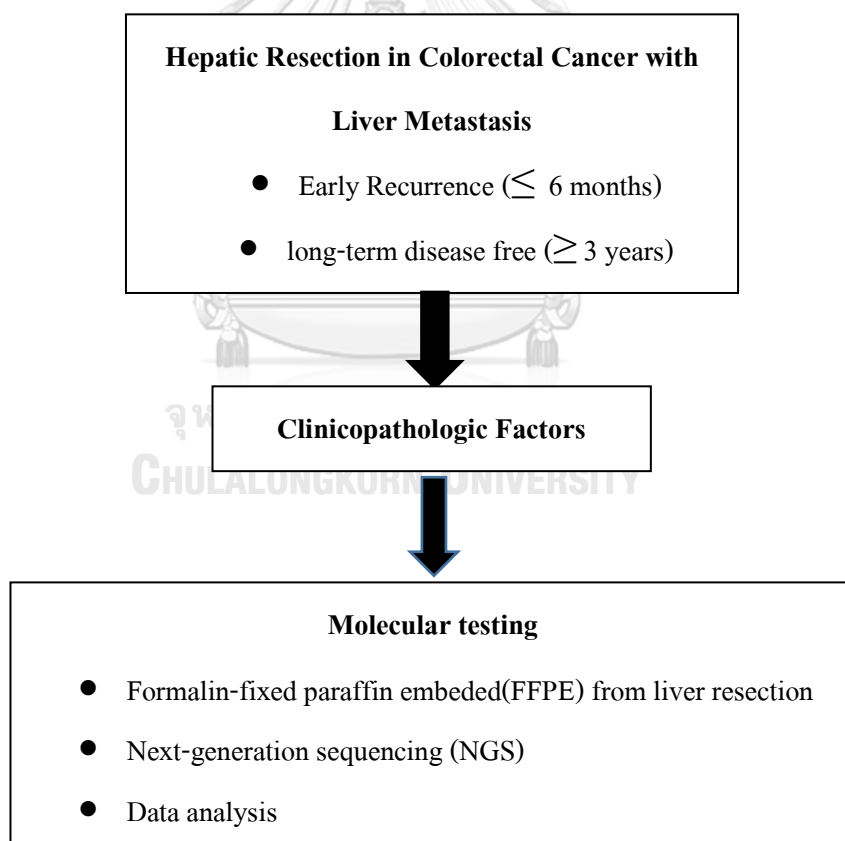
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณนา(Descriptive study) เป็นการศึกษาข้อมูลในอดีต โดยเริ่มต้นจากผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ ที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือน หรือกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าหลัง 3 ปีขึ้นไปมาตรวจหาข้อมูลทางพันธุกรรมเพิ่มเติม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับและข้อมูลทางพันธุกรรมระหว่าง 2กลุ่ม ว่ามีปัจจัยเหล่านี้แตกต่างกันหรือไม่ และนำปัจจัยทาง

พันธุกรรมมาศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกและพยาธิวิทยา



ภาพที่ 17 รูปแบบการวิจัย

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

3.2.1 สถานที่ :

โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 1873 ถนน พระรามที่ 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

3.2.2 ประชากร (Population)

3.2.2.1 ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ประชากรไทยที่วินิจฉัยเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ

3.2.2.2 ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือ ประชากรไทยที่วินิจฉัยเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตับ โดยมีผลตรวจทางพยาธิวิทยายืนยันการวินิจฉัยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2550 จนถึงวันที่ 19 เมษายน 2562

3.2.3 เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย (Inclusion Criteria)

3.2.3.1 ผู้ป่วยที่วินิจฉัยเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Adenocarcinoma) ที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับตั้งแต่แรก ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2550 จนถึงวันที่ 19 เมษายน 2562

3.2.3.2 มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือน หรือกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำซ้ำหลัง 3 ปีขึ้นไป

3.2.3.3 มีผลตรวจทางพยาธิวิทยายืนยันการวินิจฉัยและมีปริมาณเพียงพอต่อการส่งตรวจทางพันธุกรรมเพิ่มเติม

3.2.3.4 ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดเนื้อมะเร็งทั้งบริเวณลำไส้ใหญ่หรือไส้ตรงและที่ตับ

3.2.3.5 สามารถผ่าตัดได้หมดไม่มีก้อนมะเร็งเหลือ (free margin)

3.2.3.6 ผู้ป่วยอายุมากกว่า 18 ปี

3.2.3.7 มีประวัติและเวชระเบียนครบถ้วน

3.2.4 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

3.2.4.1 วินิจฉัยหรือสงสัยเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทางพันธุกรรม

3.2.4.2 มีการกระจายของตัวโรคไปอวัยวะอื่น ๆ นอกจากตับ

3.2.4.3 ผู้ป่วยที่มีหรือสงสัยมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย

3.2.4.4 เสียชีวิตระหว่างผ่าตัด

3.2.4.5 ผ่าตัดตับแบบสองขั้นตอน (Two-stage hepatectomy)

3.2.4.6 มีการใช้วิธีอื่น ๆ นอกจากการผ่าตัด ได้แก่ การผ่าตัดด้วยคลื่นความถี่วิทยุ (Radiofrequency ablation(RFA)), การฉีดเคมีบำบัดเข้าไปในเส้นเลือดแดงตับโดยตรง (Hepatic artery infusion chemotherapy(HAI))

3.2.4.7 มีการใช้ยากกลุ่มสารชีวภาค(biologic agent) ในการรักษา ได้แก่ ยาต้านการสร้างหลอดเลือด(Angiogenesis inhibitors) หรือยาต้านอีจีเอฟอาร์(anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MoAbs))

3.3 การคำนวณตัวอย่าง (Sample Size Determination)

เนื่องจากการศึกษาเชิงพรรณนา คำนวณจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยโดยใช้สูตร

$$N = \frac{Z_{\alpha}^2 P Q}{d^2}$$

$$= \frac{(1.96 \times 1.96) \times 0.05 \times 0.95}{(0.1 \times 0.1)}$$

$$= 18$$

N = จำนวนสมาชิกของกลุ่มตัวอย่าง

P = Proportion = 0.05 มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบความชุกของยีนกลายพันธุ์ปรีราฟ (BRAF) ซึ่งเป็นยีนกลายพันธุ์ที่เป็นปัจจัยทำนายโรคที่สำคัญในมะเร็งลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงระยะที่ 4 ได้ประมาณ 5%

กำหนด d = Error = 0.1 = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ได้เท่ากับ +/-10%

Z = ระดับความเชื่อมั่นที่ผู้วิจัยกำหนดโดย Z มีค่าเท่ากับ 1.96 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

Q = 1-P = 0.95

ดังนั้นคำนวณขนาดตัวอย่างประชากรได้ 18 คน

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

3.4.1 ทำเรื่องขออนุญาตใช้เวชระเบียนและขึ้นเนื่อจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.4.2 ยื่นเรื่องขอพิจารณาจริยธรรมการวิจัย และเริ่มดำเนินการขั้นตอนรวบรวมข้อมูล

หลังจากโครงการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยฯ แล้ว

3.4.3 คั่นหารายชื่อผู้ป่วยผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับ การรักษาโดยการผ่าตัดตัดโดยคั่นจากระหัสไอซีดี 10 (ICD10 codes) ที่บันทึกไว้ในระบบสรุปประวัติ การรักษา (Discharge summary) ระหว่างที่ผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลเพื่อผ่าตัดตัดในโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ ช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2550 จนถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2561 โดยรหัสสำหรับการ วินิจฉัยหลัก ได้แก่ C18(malignant neoplasm of colon), C19(malignant neoplasm of rectosigmoid junction) or C20(malignant neoplasm of rectum); รหัสสำหรับโรคร่วม ได้แก่ C787(Secondary malignant neoplasm of liver); รหัสสำหรับหัตถการ ได้แก่ 5022(partial hepatectomy), or 503(lobectomy of liver), or 504(Total hepatectomy)

3.4.4 ทบทวนข้อมูลผู้ป่วยผู้ป่วยจากเวชระเบียนของหน่วยมะเร็งวิทยา, ระเบียนผู้ป่วยนอก และ แบบสรุปประวัติผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อเลือกผู้ป่วยที่เข้าตาม เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย

3.4.5 ติดต่อภาควิชาพยาธิวิทยา ขอใช้ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดมะเร็งบริเวณตับ(liver metastasis) ที่เก็บไว้ในพาราฟินบล็อก (formalin-fixed paraffin embeded, FFPE) ของผู้ป่วยทุก รายที่เข้าตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมวิจัย เพื่อส่งตรวจยีนกลายพันธุ์แบบ whole exome seqauncing (WES) ด้วยเทคนิคเอ็นจีเอส (Next-generation sequencing (NGS)) ที่แล็บแมคโคร เจ็น ประเทศเกาหลีใต้ (Macrogen Inc.)

3.4.6 การบันทึกข้อมูล

3.4.6.1 บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยได้แก่ อายุ,เพศ, สถานะภาพทางร่างกายของ ผู้ป่วย (Performance status ตาม ECOG performance status) , ประวัติโรคประจำตัว

3.4.6.2 บันทึกข้อมูลทางคลินิกของโรคมะเร็ง ได้แก่ ตำแหน่งของตัวมะเร็งลำไส้ตั้ง ต้น(primary tumor : ซ้าย,ขวา), ค่าซีอีเอ(CEA) ก่อนผ่าตัดและหลังผ่าตัด, ระยะของ โรคมะเร็งตามระบบที่เอ็นเอ็ม (AJCC 7th TNM staging), ขนาดของก้อนมะเร็งที่ แพร่กระจายมาที่ตับ(<5 ซม., >= 5 ซม.), จำนวนมะเร็งที่แพร่กระจายในตับ(>3,<=3), จำนวนโลบ(lobe : bilateral, unilateral), ตำแหน่งของโรคเมื่อกลับเป็นซ้ำ

3.4.6.3 บันทึกข้อมูลทางพยาธิวิทยา ได้แก่ เกรด(grade) ของมะเร็งที่ลำไส้, การ กระจายเข้าระบบน้ำเหลือง(LVI), ระยะระหว่างขอบเนื้อมะเร็งกับเนื้อที่ตัดออกมา(margin) (<1 cm or >= 1cm)

3.4.6.4 บันทึกข้อมูลทางพันธุกรรมที่เคยมีการตรวจไว้แล้ว

3.4.6.5 บันทึกข้อมูลการรักษา ได้แก่ วิธีการผ่าตัด, การรักษาเสริมที่ได้รับ, สูตรยา เคมีบำบัดที่ได้รับ, จำนวนครั้งที่ได้รับ, ระยะเวลาที่ได้รับยา

3.4.7 นำข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสโดยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ซึ่งจะอยู่ในไฟล์รูปแบบมาตรฐาน คือ FASTQ มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนของ Genome Analysis Toolkit recommendation (GATK version 4.1.0.0) ผ่านโปรแกรมภาษา WDL บน Cromwell platform ประกอบขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.4.7.1 การประเมินคุณภาพและปรับปรุงคุณภาพของไฟล์ FASTQ (Quality control)

3.4.7.2 การเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง (Read mapping on a reference genome)

3.4.7.3 การตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant calling)

3.4.7.4 การแปลผลความสำคัญของลำดับเบสที่ผิดปกติ (Variant annotation)

3.4.8 ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษจะถูกบันทึกลงบนระบบบันทึกข้อมูลและจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ต่อไป

3.5 วิธีการตรวจยีนกลายพันธุ์แบบ whole exome sequencing (WES) ด้วยเทคนิคเอ็นจีเอส (Next-generation sequencing (NGS)) และการวิเคราะห์ผลตรวจ

3.5.1 นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังไว้ในพาราฟิน (FFPE Formalin-fixed Paraffin-Embedded tissue) เป็นชิ้นเนื้อซึ่งผ่านการวินิจฉัยโดยพยาธิแพทย์มาก่อนแล้ว โดยชิ้นเนื้อเหล่านี้สามารถนำกลับมาตัดซ้ำเพื่อเลือกเฉพาะเซลล์มะเร็งที่มาสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วย QIAgen DNA extraction kits, ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะต้องมีเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี คือ เป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่ไม่สลาย (non degraded double-strand DNA), ไม่มีอนุภาค(particulate matter)อื่นเจอปน, มีค่าวัดคุณภาพดีเอ็นเอตามมาตรฐาน คือ A260/280 ratio มากกว่าเท่ากับ 1.8 และมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 1 ไมโครกรัม

3.5.2 ส่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอแบบ whole exome sequencing (WES) ด้วยเทคนิคเอ็นจีเอส (Next-generation sequencing (NGS)) โดยเครื่อง Illumina NovoSeq ที่แล็บแมคโครเจิน ประเทศเกาหลีใต้ (Macrogen Inc.) ซึ่งจะได้ข้อมูลลำดับเบสแบบ 150 bp paired-end ขนาดประมาณ 90 Mb ขั้นตอนการหาลำดับเบสประกอบด้วย

3.5.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) ด้วย SureSelectXT library prep kit

3.5.2.2 การสร้างกลุ่มของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี bridge amplification

3.5.2.3 การหาลำดับเบสโดยหลักการ sequencing by synthesis ด้วย reversible terminator nucleotide

3.5.3 นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ซึ่งจะอยู่ในไฟล์รูปแบบมาตรฐาน คือ เอฟเอเอสทีคิว(FASTQ) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนของ Genome Analysis Toolkit recommendation (GATK version 4.1.0.0) ผ่านโปรแกรมภาษา WDL บน Cromwell platform ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.5.1 การประเมินคุณภาพของไฟล์ FASTQ ผ่านเครื่องมือ GetPileupSummaries และ CollectSequencingArtifactMetrics ซึ่งสามารถแสดงผลการประเมินคุณภาพออกมาเป็นค่าสถิติ

3.5.2 คัดกรองลำดับเบสที่มีคุณภาพต่ำออกไปได้โดยอาศัยเครื่องมือ FilterMutectCalls และ FilterByOrientationBias

3.5.3 การเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิง(Read mapping on a reference genome) โดยลำดับเบสที่ได้มาจัดเรียงเทียบกับลำดับเบสมาตรฐาน(reference genome)ของมนุษย์ ผ่านฐานข้อมูล GRCh37 (hg19) เครื่องมือที่ใช้ในการเปรียบเทียบ คือ BWA version 0.7.17, หลังการจัดเรียงลำดับเบสไฟล์ FASQ จะถูกเปลี่ยนเป็นไฟล์บีเอเอ็ม (BAM)

3.5.4 การตรวจหาลำดับเบสที่ผิดปกติ (variant calling) โดยระบุตำแหน่งของลำดับเบสที่แตกต่างจากลำดับเบสมาตรฐาน(reference genome) และกำหนดว่าเกิดความผิดปกติขึ้นแบบไหน ได้แก่ ซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels) ด้วยเครื่องมือ SelectVariants ผ่าน GATK4 MuTect2 algorithm , หากการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (copy number variation) ด้วยเครื่องมือ CollectFragmentCounts, ModelSegments และ CallCopyRatioSegments

3.5.5 การแปลผลความสำคัญของลำดับเบสที่ผิดปกติ(variant annotation) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในคนปกติ โดยอาศัยเครื่องมือ Oncotator v.1.9.9.0 ซึ่งจะได้ข้อมูลออกมาเป็นความผิดปกติทั้งหมดว่าเป็นแบบใด และเกิดขึ้นที่ตำแหน่งหรือยีนใด โดยเก็บเฉพาะข้อมูลที่มีคุณภาพลำดับความซ้ำซ้อนของดีเอ็นเอ (coverage)ที่ 10x ขึ้นไป ในยีนดังต่อไปนี้ *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *APC*, *CTNNB1*, *SMAD4* และ MMR gene(*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*); สำหรับการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ จะรายงานผลออกมาเป็นมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอ(amplification), ลดลง (delete) หรือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง(neutral)

3.5.6 วิเคราะห์ผลตรวจ โดยจากความผิดปกติชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของ ลำดับเบส (insert/deletion; indels) ที่ตรวจพบทั้งหมด จะพิจารณาเลือกเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น missense, nonsense mutation หรือการกลายพันธุ์ประเภทอื่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

3.5.7 ตรวจประเมินความสำคัญของการกลายพันธุ์ที่พบในฐานข้อมูล NCBI และ Cosmic ซึ่งจะรายงานผลเป็น pathogenic, benign หรือ uncertain significance โดย การศึกษานี้ไม่ได้รายงานการกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น benign หรือการกลายพันธุ์ที่ยังไม่มี รายงานในฐานข้อมูล

3.5.8 ประเมินภาวะ MSI โดยการดูการกลายพันธุ์ของยีน MMR

3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

เก็บข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกทั้งหมดของผู้ป่วยจากเวชระเบียนของหน่วยมะเร็ง วิทยา, ระเบียนผู้ป่วยนอกและ แบบสรุประวัติผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายไปที่ตัดตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย เข้าร่วมการวิจัย หลังจากนั้นเก็บรวบรวมข้อมูล ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาและผลการตรวจทาง พันธุกรรมของผู้ป่วยที่เข้าตามเกณฑ์การวิจัยจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ผู้เก็บข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย และผู้บันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

3.7.1 ข้อมูลเชิงปริมาณ (continuous variables) ที่มีการกระจายตัวเป็น แบบโค้งปกติ แสดงข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

3.7.2 ข้อมูลเชิงปริมาณ (continuous variables) ที่มีการกระจายตัวเป็น แบบไม่เป็นโค้ง ปกติ แสดงข้อมูลที่ได้เป็นค่ามัธยฐาน (Median) และ ค่าพิสัยควอไทล์ (Inter-quartile range)

3.7.3 ข้อมูลเชิงคุณภาพ (categorical variables) แสดงข้อมูลที่ได้เป็นจำนวนนับและร้อยละ (Percent)

3.7.4 ใช้ chi-squared test หรือ fisher's exact test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง กลุ่มที่ตัวแปรเป็นค่าแบบจัดเรียงลำดับใน univariate analyses

3.7.5 ใช้ student t-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ตัวแปรเป็นค่าแบบต่อเนื่องซึ่งมีการกระจายตัวเป็นแบบโค้งปกติใน univariate analyses

3.7.6 ใช้ Mann-Whitney's U-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ตัวแปรเป็นค่าแบบต่อเนื่องซึ่งมีการกระจายตัวแบบไม่เป็นโค้งปกติ

3.7.7 ใช้ P values เป็น two-tailed type, P ที่น้อยกว่าเท่ากับ 0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

3.7.8 การคำนวณทางสถิติ ดำเนินการโดยการใช้โปรแกรม IBM SPSS statistic version 17.0.0

3.8 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

3.8.1 หลักความเคารพในบุคคล (respect for person) ผู้วิจัยเคารพในความเป็นส่วนตัวและการรักษาความลับ (privacy and confidentiality) โดยในแบบบันทึกข้อมูลของผู้ป่วยทั้งหมด จะไม่สามารถระบุถึงตัวบุคคลได้ และไม่เปิดเผยข้อมูลที่ระบุถึงผู้ป่วย โดยไม่ได้รับอนุญาต

3.8.2 หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence) การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังเพื่อดูความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรม, ปัจจัยทางคลินิก, และปัจจัยทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับ โดยใช้ชิ้นเนื้อเดิมที่ผู้ป่วยเคยได้รับการผ่าตัดหรือเจาะตรวจแล้วมาตรวจเพิ่มเติมตามมาตรฐานในงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงไม่ได้มีการกระทำต่อตัวผู้ป่วยโดยตรงที่จะทำให้เกิดอันตรายได้ และผลจากการตรวจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการรักษาของผู้ป่วยที่เข้าร่วมงานวิจัยที่กำลังได้รับรักษาอยู่ในปัจจุบัน

3.8.3 หลักความยุติธรรม (justice) ผู้ป่วยทุกคนที่มีภาวะเป็ยในโรงพยาบาล สามารถเข้าร่วมงานวิจัยได้อย่างเท่าเทียมกันและยังคงได้รับการรักษาตามมาตรฐานทั้งผู้ป่วยที่อยู่ในงานวิจัยและผู้ป่วยที่ไม่ได้เข้าร่วมงานวิจัย

3.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

3.9.1 ข้อจำกัดในการเก็บรวบรวมข้อมูลเนื่องจากการศึกษาเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง ทำให้ไม่มีการกำหนดข้อมูลที่ต้องรวบรวมจากผู้ป่วยไว้ก่อนล่วงหน้า อาจทำให้มีข้อมูลของผู้ป่วยที่บันทึกไว้ไม่ครบถ้วนตามที่ต้องการหรือมีการขาดหายของภาวะเป็ยได้

3.9.2 การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง ดังนั้นอาจมีปัจจัยกวนที่เข้ามาเกี่ยวข้องในการรักษาโดยไม่สามารถควบคุมได้ เช่น การตรวจติดตามหลังจากรักษาแล้ว ไม่ได้เหมือนกัน ในทุก

คนเนื่องจากขึ้นกับแพทย์ที่รักษาเพราะไม่ได้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้าที่จะกำหนดแบบแผนการตรวจติดตามชัดเจน อาจทำให้การมาตรวจเจอว่ามีการลุกลามเพิ่มขึ้นอาจไม่เท่ากันในแต่ละคน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากผู้ป่วยทั้งหมดรักษาและตรวจติดตามที่หน่วยมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ดังนั้นมาตรฐานการตรวจติดตามจึงไม่ได้แตกต่างกันมากระหว่างแพทย์แต่ละบุคคล

3.9.3 ข้อจำกัดในการแปลผลเนื่องจากการศึกษานี้ทำในโรงพยาบาลเดียว ไม่ได้มีการสุ่มประชากรจากทั่วประเทศ ดังนั้นการนำไปใช้ในประชากรโดยรวมอาจต้องระวังในการแปลผลเนื่องจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เป็นโรงเรียนแพทย์ ดังนั้นผู้ป่วยอาจจะแตกต่างไปจากประชากรส่วนใหญ่ของประเทศและมาตรฐานการรักษาอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับศักยภาพของแต่ละโรงพยาบาล เป็นต้น

3.9.4 ข้อจำกัดด้านขึ้นเนื้อ การเก็บรักษาชิ้นเนื้อผ่านการตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังไว้ในพาราฟิน (FFPE) ไว้เป็นเวลานาน ร่วมกับสภาพภูมิอากาศ ความชื้นและสูตรผสมของฟอร์มาลินไทยทำให้เนื้อเยื่อมะเร็งอาจมีคุณภาพด้อยลงเรื่อยๆ จากข้อจำกัดนี้การใช้ FFPE block ที่มีอายุเกิน 3 ปี มีโอกาสที่ทำให้การสกัดดีเอ็นเอล้มเหลวได้สูง และอาจจะต้องใช้เวลาานานกว่าปกติ เนื่องจากต้องสกัดหลายครั้งหรืออาจจะทำไม่ได้เลย

3.10 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration & Time Schedule)

กิจกรรม	พ.ศ. 2560			พ.ศ.2561				พ.ศ.2562			
	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6
1.การศึกษาเตรียมงาน											
2. เก็บข้อมูล											
3. วิเคราะห์ข้อมูล											
4. รายงานผลการวิจัย											

3.11 งบประมาณ (Budget)

แหล่งทุนวิจัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยา เป็นผู้สนับสนุนค่าใช้จ่าย

รายการ	ค่าใช้จ่าย
ค่าตรวจ whole exome sequencing (12000 บาท/ครั้ง)	300000
ค่าใช้จ่ายทั่วไป	5000
รวมจำนวนเงินทั้งสิ้น	305000



บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา

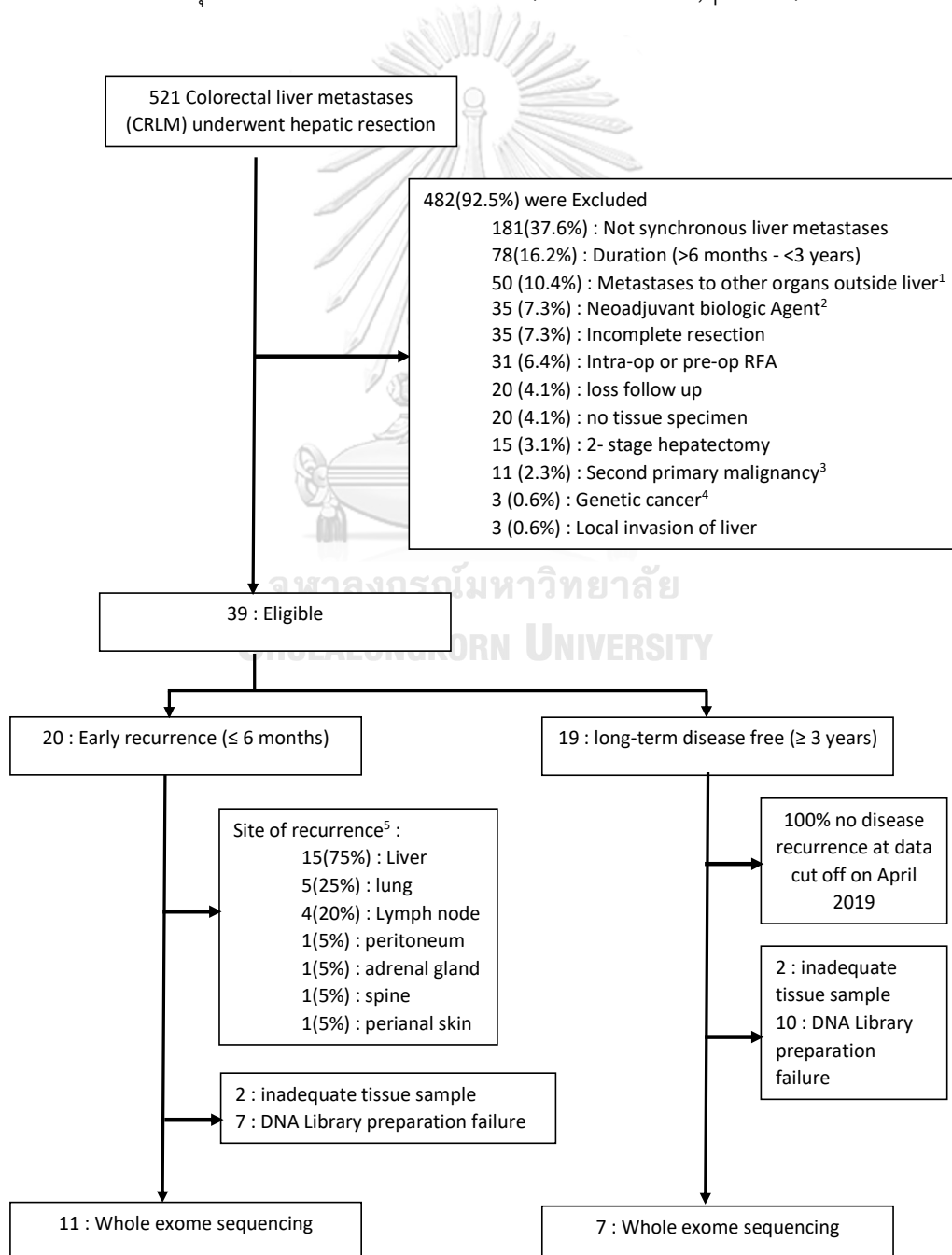
ผู้ป่วยที่วินิจฉัยเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Adenocarcinoma) ที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับตั้งแต่แรก ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดเนื้อมะเร็งทั้งบริเวณลำไส้ใหญ่หรือไส้ตรงและที่ตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2550 จนถึงวันที่ 19 เมษายน 2562 จำนวนทั้งสิ้น 521 คน, ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยทั้งหมด 39 คน (7.5%) ที่ตรงกับเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย (Inclusion Criteria) โดย 20 คน อยู่ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือน, 19 คนอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าหลัง 3 ปีขึ้นไป ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3, อวัยวะที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคมามากที่สุด (75%) รองลงมา ได้แก่ ปอด (25%) และต่อมน้ำเหลือง (20%), ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือนมี 7 คนที่เคยมีประวัติตรวจยีนกลายพันธุ์เคราส (KRAS) ไว้แล้ว พบว่าทั้งเจ็ดคนไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนนี้, ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าพบว่าทั้ง 19 คน (100%) ยังไม่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคและยังมีชีวิตอยู่ ณ วันสุดท้ายของการเก็บข้อมูล (วันที่ 19 เมษายน 2562); อัตราการรอดชีวิตที่ 3 ปี (3 year survival rate) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้าเท่ากับ 100% เทียบกับ 30% ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว ($p < 0.001$); ค่ามัธยฐานของระยะเวลาที่ติดตามอาการ (median follow up time) ของผู้ป่วยทั้ง 39 คน เท่ากับ 4.4 ปี (IQR 2-7) โดยกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้ามีระยะเวลาที่นานกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.5 (IQR 4.8-9.0) vs 2 (IQR 1.2-3.35); $p < 0.001$); มีผู้ป่วยจำนวน 11 คนในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วภายใน 6 เดือน, 7 คนอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าหลัง 3 ปีขึ้นไปที่สามารถตรวจตรวจยีนกลายพันธุ์แบบ whole exome sequencing (WES) ได้, ผู้ป่วยที่เหลือไม่สามารถตรวจได้เนื่องจากไม่ผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) (ภาพที่ 18)

4.2 ปัจจัยทางคลินิก

ผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 39 คน มีค่ามัธยฐานของอายุเท่ากับ 62.5 ปี (IQR, 50.8-72.8), 1 ใน 3 เป็นผู้ชายและผู้ป่วยเกือบทั้งหมดมีสถานะภาพทางร่างกาย (ECOG) 0-1, 95% ของผู้ป่วยทั้งหมดมีตำแหน่งของมะเร็งลำไส้อยู่ฝั่งซ้าย (left-sided colon cancer), 70% ของผู้ป่วยมีขนาดมะเร็งที่ตบน้อยกว่า 5 ซม., 77% ของผู้ป่วยมีมะเร็งอยู่ในระยะ T3 และ 80% ของผู้ป่วยมีการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง, ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีค่า CEA ก่อนผ่าตัดสูงกว่าปกติและกลับสู่ปกติหลังผ่าตัด, พบว่า

ปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม แม้ว่ากลุ่มที่กลับเป็นซ้ำซ้ำมีแนวโน้มที่จะมีค่า CEA ก่อนผ่าตัดสูงกว่าอีกกลุ่ม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วไม่มีข้อมูลของค่า CEA ถึง 9 จากทั้งหมด 20 คน

ค่ามัธยฐานของจำนวนมะเร็งที่ดับเท่ากับ 2 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็ว เทียบกับ 1 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.02$), ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วมีแนวโน้มที่จะมีการกระจายของมะเร็งที่ดับในทั้ง 2 โลบ มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคร้าย (35% vs 16%, $p=0.27$), และมีการประเมินการผ่าตัดได้ของมะเร็งที่ดับโดยศัลยแพทย์เป็นผ่าตัดได้น้อยกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคร้าย (80% vs 100%, $p=0.11$)



ภาพที่ 18

¹ ปอด 28, เยื่อช่องท้อง 9, รังไข่ 4, ต่อมหมวกไต 1, ต่อม้ำเหลืองรอบเส้นเลือดแดงใหญ่(para-aortic LN) 1, ต่อม้ำเหลืองบริเวณไห ปลาย 1, สมอง 1, สดือ 1

² Bevacizumab 31, Cetuximab 4

³ มะเร็งต่อมลูกหมาก 2, มะเร็งท่อน้ำดี 1, มะเร็งกระเพาะอาหาร 1, มะเร็งตับ 1, มะเร็งรังไข่ 1, มะเร็งไทรอยด์ 3, มะเร็งถุงน้ำดี 1, มะเร็งเต้านม 1

⁴ HNPCC: 1, FAP 2

⁵ 4 คนมีการกลับเป็นซ้ำของโรคมมากกว่า 1 ตำแหน่ง

4.3 ปัจจัยทางพยาธิวิทยา

ประมาณ 45% ของผู้ป่วยทั้งหมดมีเกรดของมะเร็งเป็นชนิด well differentiate, 55% เป็นชนิด moderately differentiate, 65% มีการกระจายเข้าระบบน้ำเหลือง (Lymphatic, Neural, Vascular Invasion), ค่ามัธยฐานของระยะระหว่างขอบเนื้อมะเร็งกับเนื้อดีที่ตัดออกมา (Liver Resection Margin) เท่ากับ 0.1 ซม.ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็ว เทียบกับ 0.2 ซม.ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้า พบว่าปัจจัยที่กล่าวทั้งหมดข้างต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่ม

4.4 ปัจจัยทางด้านการรักษาเสริม

ปริมาณผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาก่อนผ่าตัดทั้งฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด (CCRT) และ/หรือ เคมีบำบัดมีจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (65% vs 21.1%, $p=0.006$) และมีแนวโน้มที่ได้รับการผ่าตัดตับชนิด hepatectomy มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้า (30% vs 5%, $p=0.13$), ปริมาณผู้ป่วยที่ได้รับยาออกซาลิพลาติน(Oxaliplatin) ในช่วงก่อนผ่าตัดและ/หรือหลังผ่าตัดไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 กลุ่ม

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 20)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 19)	P value	รวมทั้งหมด (N = 39)
อายุ (ปี)				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	59.9 (50.6-76.1)	63.4 (52.6-71.8)	0.63	62.5 (50.8-72.8)
เพศ (%)				
● ชาย	13 (65)	12 (63.2)	0.9	25 (64.1)
สถานะภาพทางร่างกาย ECOG (%)¹				
● 0	4 (20)	8 (42.1)	0.23	12 (30.8)
● 1	15 (75)	11 (57.9)		26 (66.7)
ตำแหน่งมะเร็งลำไส้ (%)				
● ลำไส้ตรง(Rectum)	9 (45)	9 (47.4)	0.81	18 (46.2)
● ซิกมอยด์(sigmoid)	9 (45)	9 (47.4)		18 (46.2)
● ลำไส้ใหญ่ส่วนทอดลงล่าง(Descending colon)	1 (5)	0		1 (2.6)
● ซีกัม(Cecum)	1 (5)	1 (5.3)		2 (5.1)
ค่า CEA ก่อนผ่าตัด²				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	9.6 (5.3-36.9)	33.14 (16.6-105.6)	0.05	27.1 (9.7-76.3)
ค่า CEA หลังผ่าตัด³				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	3.0 (1.4-7.4)	2.5 (1.2-2.8)	0.42	2.5 (1.4-4.4)
ระยะที่ (T Stage) (%)⁴				
● T3	15 (75)	15 (79)	0.61	30 (77)
● T4	5 (25)	4 (21)		9 (23)
ระยะเอ็น (N Stage) (%)				
● N0	4 (20)	4 (21.1)	0.42	8 (20.5)
● N1	9 (45)	5 (26.3)		14 (35.9)
● N2	7 (35)	10 (52.6)		17 (43.6)

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 20)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 19)	P value	รวมทั้งหมด (N = 39)
จำนวนมะเร็งที่ตับ (%)				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	2 (1.0-4.0)	1 (1.0-2.0)	0.02	2 (1.0-3.0)
● ≤ 3	14 (70)	17 (89.5)	0.24	31 (79.5)
● > 3	6 (30)	2 (10.5)		8 (20.5)
มะเร็งที่ตับตามโหลบ (lobe) (%)				
● 1 โหลบ (Unilateral)	13 (65)	16 (84.2)	0.27	29 (74.4)
● 2 โหลบ (Bilateral)	7 (35)	3 (15.8)		10 (25.6)
ขนาดมะเร็งที่ตับ (ซม.) + จำนวนมะเร็งที่ตับ (nodule)				
● ≥ 5 ซม. & > 3	1 (5)	1 (5.3)	0.323	2 (5.1)
● ≥ 5 ซม. & ≤ 3	5 (25)	4 (21.1)		9 (23.1)
● < 5 ซม. & > 3	5 (25)	1 (5.3)		6 (15.4)
● < 5 ซม. & ≤ 3	9 (45)	13 (68.4)		22 (56.4)
เกรดของมะเร็ง (%)				
● ดี (Well)	10 (50)	7 (36.8)	0.41	17 (43.6)
● ปานกลาง (Moderately)	10 (50)	12 (63.2)		22 (56.4)
การกระจายเข้าระบบน้ำเหลือง (Lymphatic, Neural, Vascular Invasion) (%)⁵				
● ผลบวก	13 (65)	12 (63.2)	0.92	25 (64.1)
การประเมินการผ่าตัดได้ของ มะเร็งที่ตับโดยศัลยแพทย์				
● ผ่าได้ (Resectable)	16 (80)	19 (100)	0.11	35 (89.7)
● มีโอกาสผ่าตัด (Potential Resectable) ⁶	4 (20)			4 (10.3)

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 20)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 19)	P value	รวมทั้งหมด (N = 39)
ระยะระหว่างขอบเนื้องอกมะเร็งกับ เนื้อที่ที่ตัดออกมา(Liver Resection Margin) (ซม.) ⁷ ● ค่ามัธยฐาน (IQR)	0.1 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.5)	0.61	0.15 (0.1-0.55)
เทคนิคการผ่าตัดมะเร็งที่ลำไส้ (%) ● APR ● LAR ● AR ● Sigmoidectomy ● Colectomy ● Pelvic Exenteration	2 (10) 8 (40) 2 (10) 5 (25) 3 (15) 0	1 (5.3) 11 (57.9) 3 (15.8) 1 (5.3) 1 (5.3) 2 (10.5)	0.25	3 (7.7) 19 (48.7) 5 (12.8) 6 (15.4) 4 (10.3) 2 (5.1)
เทคนิคการผ่าตัดมะเร็งที่ตับ (%) ● Wedge Resection ● Segmentectomy ● Hepatectomy	11 (55) 3 (15) 6 (30)	14 (73.7) 4 (21.1) 1 (5.3)	0.13	25 (64.1) 7 (17.9) 7 (17.9)
การรักษาก่อนผ่าตัด(%) ● ฉายแสงร่วมกับเคมี บำบัด(CCRT) และ/ หรือ เคมีบำบัด	13 (65) ⁸	4 (21.1) ⁹	0.006	17 (43.6)
ได้รับยาออกซาลิพลาทิน (Oxaliplatin) ในช่วงก่อนผ่าตัด และ/หรือหลังผ่าตัด (%) ● ได้รับ	13 (65)	15 (78.9)	0.33	28 (71.8)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับระหว่าง 2 กลุ่ม

- ¹ 1 คน(5%) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วมี ECOG 3
- ² ไม่มีข้อมูล : 9 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว, 2 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า
- ³ ไม่มีข้อมูล : 3 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว, 4 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า
- ⁴ ไม่มีผู้ป่วยในระยะ T1 และ T2
- ⁵ ไม่มีข้อมูล : 2 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว, 2 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า
- ⁶ สาเหตุที่พิจารณาเป็นมีโอกาสดำได้ : 1 คน มะเร็งติด medial hepatic vein, 1 คน มะเร็งลุกลามเข้าไปใน right hepatic vein และติด left portal vein, 1 คน มะเร็งลุกลามเข้าไปใน major hepatic vessels, 1 คน มีมะเร็งกระจายหลายตำแหน่ง
- ⁷ ไม่มีข้อมูล : 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว
- ⁸ เคมีบำบัดอย่างเดียว 9(45%), ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด 1(5%), ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัดตามด้วยเคมีบำบัด 3(15%)
- ⁹ เคมีบำบัดอย่างเดียว 3(15.8%), ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด 1(5.3%)

4.5 ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม

จากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 39 คน มีผู้ป่วยจำนวน 18 คนที่สามารถตรวจตรวจยีนกลายพันธุ์แบบ whole exome sequencing ได้ ผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจได้เนื่องจากเนื่องจากไม่ผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) โดยทุกคนสามารถสกัดปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเพียงพอจากการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด 2 รอบ โดยรอบแรกผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมด 11 คน ผู้วิจัยจึงได้สกัดดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่ไม่ผ่านเพื่อส่งตรวจซ้ำ ผลจากการสกัดรอบที่ 2 มีผู้ป่วยผ่านเพิ่มอีก 7 คน จึงรวมเป็นผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจทั้งหมด 18 คน(ตารางที่2)

ผู้ป่วยคนที่	การสกัดดีเอ็นเอรอบที่1 ปริมาณ(ng/ul)	การสกัดดีเอ็นเอรอบที่2 ปริมาณ(ng/ul)	ขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library).
1	47.09		ผ่าน
2	44.97		ผ่าน
3	11.38		ผ่าน
4	37.66		ผ่าน
5	13.5	11	ผ่าน
6	19.8	98.7	ผ่าน
7	15.32	37.9	ผ่าน
8	47.38		ผ่าน
9	23.91		ผ่าน
10	52.24		ผ่าน
11	5.34		ผ่าน
12	17.72		ผ่าน
13	26.59		ผ่าน
14	43.91		ผ่าน
15	13.7	41.1	ผ่าน
16	21.4	120	ผ่าน

ผู้ป่วยคนที่	การสกัดดีเอ็นเอรอบที่1 ปริมาณ(ng/ul)	การสกัดดีเอ็นเอรอบที่2 ปริมาณ(ng/ul)	ขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library).
17	32.8	94.9	ผ่าน
18	8.6	41.23	ผ่าน
19	6.836	15.9	ไม่ผ่าน
20	17.465	42.7	ไม่ผ่าน
21	22.977	45.8	ไม่ผ่าน
22	14.263	32.9	ไม่ผ่าน
23	10.549	28.1	ไม่ผ่าน
24	7.709	23.1	ไม่ผ่าน
25	32.146	76	ไม่ผ่าน
26	6.639	12.9	ไม่ผ่าน
27	2.969	29.4	ไม่ผ่าน
28	13.855	33.4	ไม่ผ่าน
29	19.648	62.5	ไม่ผ่าน
30	23.368	53.1	ไม่ผ่าน
31	8.489	33	ไม่ผ่าน
32	17.18	52.3	ไม่ผ่าน
33	21.922	63.4	ไม่ผ่าน
34	18.498	42	ไม่ผ่าน
35	26.964	54.6	ไม่ผ่าน

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้และผลการตรวจในขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของผู้ป่วยรายบุคคล(คนที่ 1-7 อยู่ในกลุ่มกลับเป็นซ้ำช้า,คนที่ 8-18 อยู่ในกลุ่มกลับเป็นซ้ำเร็ว)

ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าพบว่าทั้ง 7 คน(100%)ยังไม่มีอาการกลับเป็นซ้ำของโรคและยังมีชีวิตอยู่ ณ วันสุดท้ายของการเก็บข้อมูล (วันที่ 19 เมษายน 2562; อัตราการรอดชีวิตที่ 3 ปี (3 year survival rate) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้าเท่ากับ 100% เทียบกับ 36.4% ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว ($p=0.01$); ค่ามัธยฐานของระยะเวลาที่ติดตามอาการ(median follow up time) ของผู้ป่วยทั้ง 18 คน เท่ากับ 3.55 ปี (IQR 1.58-7.25) โดยกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้ามีระยะเวลาที่นานกว่าอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7 (IQR 3.8-7.0) vs 2.4 (IQR 0.9-3.4); $p=0.002$);

พบว่าลักษณะทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับของผู้ป่วยที่สามารถตรวจ WES ได้คล้ายกับกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 39 คน ค่ามัธยฐานของจำนวนมะเร็งที่ดับเท่ากับ 2 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็ว เทียบกับ 1 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้าซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.035$); ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วมีแนวโน้มที่จะมีการกระจายของมะเร็งที่ดับในทั้ง 2 โลบ มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำ (45.5% vs 0%, $p=0.1$); และมีการประเมินการผ่าตัดได้

ของมะเร็งที่ตัดโดยศัลยแพทย์เป็นผ่าตัดได้น้อยกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคลำไส้ (72.7% vs 100%, p=0.25); ปริมาณผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาก่อนผ่าตัดทั้งฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด (CCRT) และ/หรือ เคมีบำบัดมีจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็ว (63.6% vs 0%, p=0.06) และมีแนวโน้มที่ได้รับการผ่าตัดระดับชนิด hepatectomy มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้า (18.2% vs 0%, p=0.48); ปริมาณผู้ป่วยที่ได้รับยาออกซาลิพลาติน(Oxaliplatin) ในช่วงก่อนผ่าตัดและ/หรือหลังผ่าตัดไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 กลุ่ม; ค่า CEA ก่อนผ่าตัด ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคลำไส้พบว่ามีค่ามากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(33.1 vs 6, p= 0.028) แต่พบว่าไม่มีข้อมูล 6 คน(54.6%) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว; ปัจจัยอื่น ๆ ไม่แตกต่างกันระหว่าง 2 กลุ่ม (ตารางที่3)

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18)
อายุ (ปี)				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	62.5 (50.8-76.8)	67.2 (60.5-72.8)	0.75	64.7 (12.2)
เพศ (%)				
● ชาย	7 (63.6)	5 (71.4)	1	12 (66.7)
สถานะภาพทางร่างกายECOG (%) ¹				
● 0	1 (9.1)	3 (42.9)	0.2	4 (22.2)
● 1	9 (81.8)	4 (57.1)		13 (72.2)
ตำแหน่งมะเร็งลำไส้ (%) ²				
● ลำไส้ตรง(Rectum)	5 (45.5)	4 (57.1)	0.45	9 (50)
● ซิกมอยด์(sigmoid)	5 (45.5)	2 (28.6)		7 (38.8)
ค่า CEA ก่อนผ่าตัด ³				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	6 (3.2-23.2)	33.1 (12.9-45.2)	0.028	16.3 (6.9-40.7)
ค่า CEA หลังผ่าตัด ⁴				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	2.1 (1.4-5.5)	2.6 (1.9-3.3)	0.9	2.5 (1.5-4)
ระยะที่ (T Stage) (%) ⁴				
● T3	7 (63.6)	6 (85.7)	0.32	13 (72.2)
● T4	4 (36.4)	1 (14.3)		5 (27.8)

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18)
ระยะเอ็น (N Stage) (%)				
● N0	2 (18.2)	0	0.29	2 (11.1)
● N1	5 (45.5)	3 (42.9)		8 (44.4)
● N2	4 (36.4)	4 (57.2)		8 (44.4)
ขนาดมะเร็งที่ตัด (ซม.)				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	3.5 (2.8-4.2)	4 (2.3-6)	0.44	3.75 (2.67-4.27)
● ≥ 5 cm (%)	2 (18.2)	2 (28.6)	1	4 (22.2)
● < 5 cm (%)	9 (81.8)	5 (71.4)		14 (77.8)
จำนวนมะเร็งที่ตัด (%)				
● ค่ามัธยฐาน (IQR)	2 (1-4)	1 (1-2)	0.035	2 (1-3)
● ≤ 3	3 (27.3)	0	0.25	3 (16.7)
● > 3	8 (72.7)	7 (100)		15 (83.3)
มะเร็งที่ตัดตามโหลบ (lobe) (%)				
● 1 โหลบ (Unilateral)	6 (54.5)	7 (100)	0.1	13 (72.2)
● 2 โหลบ (Bilateral)	5 (45.5)	0		5 (27.8)
ขนาดมะเร็งที่ตัด (ซม.) + จำนวนมะเร็งที่ตัด (nodule)				
● ≥ 5 ซม. & > 3	0	0	0.31	0
● ≥ 5 ซม. & ≤ 3	2 (18.2)	2 (28.6)		4 (22.2)
● < 5 ซม. & > 3	3 (27.3)	0		3 (16.7)
● < 5 ซม. & ≤ 3	6 (54.5)	5 (71.4)		11 (61.1)
เกรดของมะเร็ง (%)				
● ดี (Well)	6 (54.5)	2 (28.6)	0.37	8 (44.4)
● ปานกลาง (Moderately)	5 (45.5)	5 (71.4)		10 (55.6)
การกระจายเข้าระบบน้ำเหลือง (Lymphatic, Neural, Vascular Invasion) (%)				
● ผลบวก	8 (72.7)	4 (57.1)	1	12 (66.7)

	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18)
การประเมินการผ่าตัดได้ของมะเร็ง ที่ตัดโดยศัลยแพทย์ <ul style="list-style-type: none"> ● ผ่าได้ (Resectable) ● มีโอกาสผ่าตัด(Potential Resectable)⁶ 	8 (72.7) 3 (27.3)	7 (100) 0	0.25	15 (83.3) 3 (16.7)
ระยะระหว่างขอบเนื้อมะเร็งกับเนื้อ ดีที่ตัดออกมา(Liver Resection Margin) (ซม.) ⁷ <ul style="list-style-type: none"> ● ค่ามัธยฐาน (IQR) 	0.35 (0.1-1)	0.3 (0.1-0.5)	0.92	0.3 (0.1-0.9)
เทคนิคการผ่าตัดมะเร็งที่ลำไส้ (%) <ul style="list-style-type: none"> ● APR ● LAR ● AR ● Sigmoidectomy ● Colectomy 	1 (9.1) 5 (45.4) 1 (9.1) 2 (18.2) 2 (18.2)	1 (14.3) 4 (57.1) 1 (14.3) 0 1 (14.3)	0.8	2 (11.1) 9 (50) 2 (11.1) 2 (11.1) 3 (16.7)
เทคนิคการผ่าตัดมะเร็งที่ตับ (%) <ul style="list-style-type: none"> ● Wedge Resection ● Segmentectomy ● Hepatectomy 	8 (72.7) 1 (9.1) 2 (18.2)	6 (85.7) 1 (14.3) 0	0.48	14 (77.8) 2 (11.1) 2 (11.1)
การรักษาก่อนผ่าตัด(%) <ul style="list-style-type: none"> ● ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด (CCRT) และ/หรือ เคมี บำบัด 	7 (63.6) ⁸	0	0.06	7 (38.9)
ได้รับยาออกซาลิพลาติน (Oxaliplatin) ในช่วงก่อนผ่าตัด และ/หรือหลังผ่าตัด (%) <ul style="list-style-type: none"> ● ได้รับ 	7 (63.6)	7 (100)	0.12	14 (77.8)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิก, ข้อมูลทางพยาธิวิทยา, การรักษาที่ได้รับระหว่าง 2 กลุ่มที่สามารถตรวจตรวจยีนกลายพันธุ์ได้

¹ 1 คน(9.1%) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วมี ECOG 3

² 1 คน(9.1%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วมีตำแหน่งมะเร็งลำไส้ที่ descending colon, 1 คน(14.3%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้ามีตำแหน่งมะเร็งลำไส้ที่ cecum

³ ไม่มีข้อมูล : 6 คน(54.6%) ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว

⁴ ไม่มีข้อมูล : 2 คน(18.2%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว, 1 คน(14.3%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า

⁵ ไม่มีข้อมูล : 1 คน(14.3%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า

⁶ สาเหตุที่พิจารณาเป็นมีโอกาสดำได้ : 1 คน มะเร็งดัด medial hepatic vein, 1 คน มะเร็งลุกลามเข้าไปใน right hepatic vein และดัด left portal vein, 1 คน มะเร็งลุกลามเข้าไปใน major hepatic vessels, 1 คน มีมะเร็งกระจายหลายตำแหน่ง

⁷ ไม่มีข้อมูล : 1 คน(9.1%)ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า

⁸ เคมีบำบัดอย่างเดียว 4(36.4%), ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด 2(18.2%), ฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัดตามด้วยเคมีบำบัด 1(9.1%)

IQR = interquartile range

สำหรับลักษณะของการกลายพันธุ์ของยีนที่ตรวจพบ พบว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว พบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ได้มากกว่า (18.2% vs 0%, p=0.5) โดยชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ที่พบจำนวน 2 คน ได้แก่ Q61R (exon3 codon 61) และ G12A (exon2 codon12) ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานะข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค; แต่ถ้าพิจารณาโดยรวมยีนในกลุ่ม *RAS* ทั้งหมด พบว่าทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน, การกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ที่พบในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว ได้แก่ G13D (exon2 codon13) จำนวน 2 คน และ G12V (exon2 codon12) จำนวน 1 คน การกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ที่พบในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า ได้แก่ G13D (exon2 codon13), A59E (exon2 codon59), และ G12V (exon2 codon12) อย่างละ 1 คน ชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ที่ตรวจพบทั้งหมดเคยมีการรายงานในฐานะข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค; ยีน *KRAS* และ *NRAS* ไม่พบพร้อมกัน (mutually exclusive); ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* ชนิด c.2011C>T (nonV600E) ได้ 1 คน ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานะข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคในมะเร็งกระเพาะอาหาร; พบการกลายพันธุ์ของยีน *PIK3CA* ชนิด c.325_327delGAA ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานะข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance); พบการกลายพันธุ์ของยีน *APC* ได้ประมาณ 90% ในทั้ง 2 กลุ่ม ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว พบการกลายพันธุ์ชนิด c.694C>T, c.4161T>A, c.3469G>T, c.637C>T, c.4285C>T, c.6907G>A, c.646C>T, c.3991A>T, c.2287G>T และ c.4199C>A ซึ่งทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค, ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคช้า พบการกลายพันธุ์ชนิด

c.1458T>C, c.847C>T, c.3982C>T, c.694C>T, c.2626C>T, c.2626C>T และ c.4285C>T ซึ่งทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค และการกลายพันธุ์ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่ความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance) อีก 2 ชนิด ได้แก่ c.4339C>T และ c.4627A>G; พบการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่ม MMR ได้น้อยกว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว 9.1% เทียบกับ 28.6% ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคช้า อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.53$) โดยพบการกลายพันธุ์ชนิด c.1927G>T ในยีน *MSH2* ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่ความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance), พบการกลายพันธุ์ชนิด c.3083C>T ในยีน *MSH6* ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค, พบการกลายพันธุ์ชนิด c.1576G>A ในยีน *PMS2* ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่ความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค (uncertain significance); ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *CTTNB1* และ *SMAD4*; มีผู้ป่วย 1 คน ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วพบการกลายพันธุ์ร่วมกันในยีน *KRAS*, *BRAF* และ *PMS2* (ตารางที่ 4); รายงานผลการตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้งหมดก่อนการคัดเลือกตามวิธีในหัวข้อ 3.5.6 และ 3.5.7 อยู่ในภาคผนวก ก และ ข

ยีน	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11) (%)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7) (%)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18) (%)
<i>RAS</i> ¹	5(54.5)	3(42.9)	1	8(44.4)
• <i>KRAS</i>	3(27.3)	3(42.9)	0.63	6(33.3)
• <i>NRAS</i>	2(18.2)	0(0)	0.5	2(11.1)
<i>BRAF</i> ²	1(9.1)	0(0)	1	1(5.6)
<i>PIK3CA</i>	1(9.1)	0(0)	1	1(5.6)
<i>APC</i>	10(90.9)	6(85.7)	1	16(88.9)
<i>CTNNB1</i>	0(0)	0(0)		0(0)
<i>SMAD4</i>	0(0)	0(0)		0(0)
MMR gene	1(9.1)	2(28.6)	0.53	3(16.7)
• <i>MLH1</i>	0(0)	0(0)		0(0)
• <i>MSH2</i>	0(0)	1(14.3)	0.39	1(5.6)
• <i>MSH6</i>	0(0)	1(14.3)	0.39	1(5.6)
• <i>PMS2</i>	1(9.1)	0(0)	1	1(5.6)

ตารางที่ 4 ผลตรวจยีนกลายพันธุ์ชนิด SNPs หรือ Indels.

¹ *KRAS* และ *NRAS* ไม่พบพร้อมกัน (mutually exclusive)

² 1 คนพบทั้ง *KRAS*, *BRAF* และ *PMS2* กลายพันธุ์พร้อมกัน

ผลตรวจยีนกลายพันธุ์หาการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (CNV) ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำ พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *KRAS* และ *BRAF* แต่พบการลดลงของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *NRAS* และ *PMS2* ได้มากกว่าอีกกลุ่ม; ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วพบการลดลงของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *CTNNB1* และ *MLH1* ได้มากกว่าอีกกลุ่มอย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่มในทุกยีน (ตารางที่ 5)

ยีน	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11) (%)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7) (%)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18) (%)
<i>KRAS</i>				
• Amplification	0(0)	2(28.6)	0.15	2(11.1)
• Delete	3(27.3)	2(28.6)		5(27.8)
<i>NRAS</i>				
• Amplification	1(9.1)	0(0)	0.38	1(5.6)
• Delete	3(27.3)	4(57.1)		7(38.9)
<i>BRAF</i>				
• Amplification	5(45.5)	6(85.7)	0.15	11(61.1)
• Delete	0(0)	0(0)		0(0)
<i>PIK3CA</i>				
• Amplification	2(18.2)	1(14.3)	0.76	3(16.7)
• Delete	3(27.3)	1(14.3)		4(22.2)
<i>APC</i>				
• Amplification	0(0)	0(0)	0.63	0(0)
• Delete	4(36.4)	4(57.1)		8(44.4)
<i>CTNNB1</i>				
• Amplification	2(18.2)	2(28.6)	0.2	4(22.2)
• Delete	4(36.4)	0(0)		4(22.2)
<i>SMAD4</i>				
• Amplification	0(0)	0(0)	0.5	0(0)
• Delete	9(81.8)	7(100)		16(88.9)
<i>MLH1</i>				
• Amplification	0(0)	0(0)	0.12	0(0)
• Delete	4(36.4)	0(0)		4(22.2)
<i>MSH2</i>				
• Amplification	3(27.3)	2(28.6)	0.42	5(27.8)
• Delete	0(0)	1(14.3)		1(5.6)

ยีน	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11) (%)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7) (%)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18) (%)
<i>MSH6</i>				
• Amplification	3(27.3)	2(28.6)	0.42	5(27.8)
• Delete	0(0)	1(14.3)		1(5.6)
<i>PMS2</i>				
• Amplification	2(18.2)	2(28.6)	0.14	4(22.2)
• Delete	1(9.1)	3(42.9)		4(22.2)

ตารางที่ 5 ผลตรวจยีนกลายพันธุ์หาการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (CNV)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 กลุ่มผู้ป่วยที่กลับเป็นซ้ำเร็วพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ได้บ่อยกว่า และมีการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่ม *MMR* ที่น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.1.2 ลักษณะทางคลินิก, พยาธิวิทยา, และการรักษาที่ได้รับมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคหลังการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดอย่างสมบูรณ์ โดยกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วมีจำนวนมะเร็งที่ตับและได้รับการรักษาก่อนผ่าตัดมากกว่ากลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.1.3 ผู้ป่วยที่มีลักษณะการกระจายของโรคมักสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคหลังการรักษาที่ไม่ดี

5.1.4 จำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันในกลุ่มประชากรที่มากขึ้น

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาชนิดยีนอื่นหลังนี้แสดงให้เห็นถึงลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดอย่างสมบูรณ์ ระหว่างกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วและช้า โดยแสดงถึงการกลายพันธุ์ประเภทซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs), การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels) และการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (copy number variation) ในยีนที่สำคัญในมะเร็งลำไส้ใหญ่ ได้แก่ ยีน *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *APC*, *CTNNB1*, *SMAD4*, and *MMR gene*(*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* และ *PMS2*); โดยการศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่กลับเป็นซ้ำเร็วพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ได้บ่อยกว่า และมีการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่ม *MMR* ที่น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำ; ผลตรวจยีนกลายพันธุ์หากการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (CNV) พบความแตกต่างของการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอระหว่าง 2 กลุ่มในยีน *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *CTNNB1*, *PMS2* และ *MLH1* อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 กลุ่มในทุกยีน

ปัจจุบันการรักษามาตรฐานในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่แก่การรักษาโดยการผ่าตัด อย่างไรก็ตามพบว่ามีผู้ป่วยบางกลุ่มไม่ได้ประโยชน์จากการผ่าตัด;

ได้มีการศึกษามากมายเพื่อพยายามที่จะหาปัจจัยทำนายโรคในแง่ของลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วยกลุ่มนี้ แม้ว่าขณะนี้จะมีการแบ่งประเภทของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะทางโมเลกูลาร์ (consensus molecular subtypes (CMSs)) ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกและการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าการแบ่งประเภทมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามลักษณะทางโมเลกูลาร์ (CMSs) นั้นมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคหรือการกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการผ่าตัดอย่างไร (16, 17); ยีนที่มีบทบาทมากสุดในปัจจุบันต่อการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายยังคงเป็นยีนในกลุ่ม *RAS*, *BRAF* และ ภาวะ MSI; จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยผู้วิจัยได้เปรียบเทียบความแตกต่างทั้งลักษณะทางคลินิกและพันธุกรรมระหว่าง 2 กลุ่มประชากร คือกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ป่วยที่ไม่น่าจะจะได้ประโยชน์จากการผ่าตัด กับกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคช้าซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ป่วยที่น่าจะได้ประโยชน์จากการผ่าตัด

ยีนในกลุ่ม *RAS* ประกอบด้วยยีน *KRAS* และ *NRAS* พบการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม *RAS* ได้ทั้งหมด ประมาณ 50-60% ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย โดยพบในยีน *KRAS* ได้บ่อยกว่า (40-50%) พบการกลายพันธุ์ในยีน *NRAS* ได้ประมาณ 3-5%; การตรวจพบยีนกลายพันธุ์ในกลุ่ม *RAS* สัมพันธ์กับการไม่ตอบสนองต่อการใช้ยากกลุ่มยามุ่งเป้า ชนิด anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MoAbs) ได้แก่ Cetuximab และ Panitumumab ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย ซึ่งให้ผลสอดคล้องตรงกันในหลายงานวิจัย ทำให้มีระยะเวลารอดชีวิตที่แยกว่า ปัจจุบันจึงมีการตรวจ *RAS* ซึ่งใช้เป็นตัวทำนายการตอบสนองต่อยากก่อนเริ่มการรักษาด้วยยามุ่งเป้ากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามการใช้การกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* เพื่อใช้พยากรณ์โรคยังเป็นที่ยกเถียงกัน เนื่องจากบางการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการมีการมีหรือไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* มีการพยากรณ์โรคไม่แตกต่างกันโดยไม่ขึ้นกับการได้รับยามุ่งเป้า ขณะที่บางการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการมีการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ทำให้มีการพยากรณ์โรคที่แยกว่าในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย (12, 38)

การกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าพบได้บ่อยที่กลายพันธุ์ในตำแหน่ง exon 2 (45%) และ exon 3 (55%); พบว่าการมีการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* จะมีการพยากรณ์โรคที่กว่าผู้ป่วยที่มีกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* หรือผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *RAS* เลย และพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ที่ตำแหน่ง exon 2 และมีการพยากรณ์โรคที่แยกว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon 3 (38)

การกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* พบได้ประมาณ 5% ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจาย ปัจจุบันการมีการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* เป็นที่ยอมรับกันว่าทำให้มีการพยากรณ์โรคที่แยกว่าโดยไม่ขึ้นกับการรักษาที่ได้รับ (21)

ในการศึกษานี้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม *RAS* จำนวน 44.4% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษา ก่อน ๆ หน้านี้ที่มีรายงานว่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 30-52%(21) แต่กลับพบสัดส่วนของการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าที่เคยมีการรายงานมา โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วจำนวน 18.2% เทียบกับ 0% ในกลุ่มที่มีกลับเป็นซ้ำของโรคช้า แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.5$) อีกทั้งการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบนั้นเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่พบได้บ่อยในยีนนี้และเคยมีการรายงานมาแล้วว่าเป็นชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค ได้แก่ Q61R (exon3 codon 61) และ G12A (exon2 codon12) ผู้วิจัยจึงเชื่อว่าการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบนั้นน่าจะเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจริง; อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ที่รายงานก่อนหน้านี้เป็นการตรวจในตรวจในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแพร่กระจายทั่วไป ยังไม่ค่อยมีการรายงานเปอร์เซ็นต์การตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในกลุ่มผู้ป่วยเฉพาะเช่นที่ศึกษาในงานวิจัยนี้; การกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ที่ตรวจพบในการศึกษานี้เกือบทั้งหมดเป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 2,3 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบได้บ่อยของการกลายพันธุ์ในยีนนี้ และการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ที่ตรวจพบทั้งหมดเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* รวมถึงยีน *BRAF* ที่ตรวจพบในการศึกษานี้ค่อนข้างไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 กลุ่ม; มีงานวิจัยเพื่อศึกษาปัจจัยพยากรณ์โรคเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* และ *BRAF* ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัด แต่กลุ่มประชากรในการศึกษานี้ๆ ก็ยังมีความแตกต่างกับประชากรในการศึกษานี้ โดยทั่วไปงานวิจัยอื่นมักเป็นการศึกษาที่รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดที่เป็นการกระจายไปที่ตับทั้งแบบ synchronous และ metachronous, มีทั้งกลุ่มคนที่สามารถผ่าตัดได้หมด(R0) และผ่าตัดได้ไม่หมด(R1), รวมถึงวิธีการตรวจและขึ้นเนื้อที่นำมาตรวจมีทั้งจากบริเวณตับและลำไส้ปะปนกัน ทำให้สามารถรวบรวมจำนวนประชากรได้มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่กล่าวมา มีการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *RAS* ได้ 30-52% ส่วนใหญ่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่แย่ บางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค(21, 39-42); การกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* พบได้ 2-4%ในประชากรกลุ่มนี้ ซึ่งโดยมากเป็นการศึกษาในการกลายพันธุ์ชนิด V600Eและพบว่าสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคแย่(39, 40, 43); สำหรับความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* กับการพยากรณ์เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดตัดยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจน; การพบการกลายพันธุ์ของยีน *NRAS* ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงในกลุ่มผู้ป่วยที่เฉพาะเจาะจงเช่นในการศึกษานี้ จึงอาจใช้เป็นตัวทำนายผู้ป่วยที่อาจไม่ได้ประโยชน์จากการผ่าตัดตัดได้

การศึกษานี้ตรวจพบว่ามีผู้ป่วย 1 คนในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว มีการกลายพันธุ์ร่วมกันในยีน *KRAS*, และ *BRAF* โดยการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* เป็นชนิด G13D(exon2 codon13) ซึ่งมีรายงานว่า เป็นชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค สำหรับการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* เป็นชนิด c.2011C>T (nonV600E) ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคในมะเร็งกระเพาะอาหาร; จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การพบการกลายพันธุ์ร่วมกันในยีน *KRAS*, และ *BRAF* ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงพบได้น้อยมาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาชนิดที่เป็น case report, ลักษณะทางคลินิกและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้ร่วมกันยังไม่มีคำตอบชัดเจน; อย่างไรก็ตามการเกิดการกลายพันธุ์ร่วมกันของยีนนี้อาจเกิดได้จากการที่เซลล์ตั้งต้นของมะเร็งลำไส้ใหญ่ในผู้ป่วยนั้นๆ มีโคลนที่มีเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* ร่วมกับอีกโคลนที่มีเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* และมีการเจริญเติบโตร่วมกันมาทั้ง 2 โคลน หรือการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* ที่ตรวจพบในการศึกษานี้ไม่ใช่การกลายพันธุ์ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมะเร็งลำไส้ใหญ่ก็อาจเป็นไปได้(44) จึงต้องแปลผลด้วยความระมัดระวัง

การเปลี่ยนแปลงในยีน MMR เป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็งโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่รวมถึงโรคมะเร็งลำไส้ทางกรรมพันธุ์ (HNPCC) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดได้จากความผิดปกติโดยตรงต่อยีน mismatch repair (MMR) หรือจากการมี methylation บริเวณส่วน epigenetic ที่ทำให้การทำงานที่ลดลง (deficient mismatch repair (dMMR)) ซึ่งยีนนี้โดยปกติมีหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดปกติ ความผิดปกติที่ทำให้การทำงานลดลงของยีนนี้ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบริเวณที่เป็น microsatellite เกิดเป็นภาวะที่เรียกว่า Microsatellite instability(MSI) ภาวะนี้สามารถตรวจพบได้โดยการตรวจดู immunohistochemistry ของ MMR โปรตีน 4 ตัว คือ MLH1, MSH2, MSH6, และ PMS2 หรือโดยการตรวจดูภาวะเอ็มเอสไอโดยตรงก็ได้; ในการศึกษานี้เป็นการตรวจที่เฉพาะการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, และ *PMS2*) ซึ่งถ้าการกลายพันธุ์ประเภทที่ตรวจพบเป็นชนิดที่ทำให้มีการทำงานของยีนนี้ลดลง ก็จะแสดงถึงการมี deficient mismatch repair (dMMR) หรือ Microsatellite instability ได้; การศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนในกลุ่ม MMR ที่น้อยกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(9.1% vs 28.6%, p=0.53) โดยในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วตรวจพบการกลายพันธุ์ในยีน *PMS2* ชนิด c.1576G>A ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance) สำหรับในกลุ่มที่มีกลับเป็นซ้ำซ้ำ ตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ยีน *MSH2* ชนิด c.1927G>T ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance) และตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ยีน *MSH6* ชนิด c.3083C>T ซึ่งมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค อย่างไรก็ตามจะพบว่ามีผู้ป่วยใน 2 ยีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูล

ว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค(uncertain significance) อาจจำเป็นต้องตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าการกลายพันธุ์ประเภทนี้ทำให้เกิดการเสียหายที่การทำงานของยีน ซึ่งสามารถตรวจได้โดยการตรวจดู immunohistochemistry ของยีน MMR นั้น หรือตรวจยืนยันภาวะ MSI โดยตรง; จากข้อมูลที่มีในปัจจุบัน พบว่าสามารถตรวจพบภาวะ MSI ได้มากกว่าในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะต้น และพบได้ลดลงในระยะแพร่กระจาย โดยพบประมาณ 20% ในระยะที่1 และ2 พบประมาณ 12% ในระยะที่ 3 และพบประมาณ 4% ในระยะที่ 4; ภาวะ MSI สามารถใช้พยากรณ์โรคได้ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะ 2 และ3 โดยการมีภาวะ MSI สูง (MSI-H) จะมีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า(12); สำหรับประโยชน์ของ MSI ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะ 4 ใช้สำหรับทำนายการตอบสนองต่อการใช้ยากกลุ่มอิมมูโน (immune therapy) แต่ยังไม่สามารถใช้เพื่อพยากรณ์โรคได้(14, 25) ดังนั้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงใน MMR ยีนอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สามารถใช้พยากรณ์โรคได้

ในการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA จำนวนเพียง 1 คน ชนิด c.325_327delGAA ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว คิดเป็น 5.6% ของผู้ป่วยทั้งหมด ซึ่งเคยมีการรายงานในฐานข้อมูลว่าเป็นการกลายพันธุ์ชนิดที่ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่แน่นอนกับการเกิดโรค (uncertain significance); อย่างไรก็ตามในการศึกษาก่อนหน้านี้ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับพบว่าสามารถพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้ 13.4% และการกลายพันธุ์ของยีนนี้สัมพันธ์กับการกลับมาของโรคหลังการรักษา(time to relapse)ที่เร็วกว่า แต่ไม่สัมพันธ์กับการตายจากโรคมะเร็ง (cancer-specific mortality)(45)

สำหรับยีน CTNNB1 ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในการศึกษานี้; มีการรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้ประมาณ 6%(16) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทั้งหมด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีนนี้กับการพยากรณ์โรค

ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน SMAD4 ในการศึกษานี้; มีการรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้ประมาณ 10%(16, 46) ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทั้งหมด และพบว่าสัมพันธ์กับการมีพยากรณ์โรคที่แย่(46); มีหนึ่งการศึกษาที่ศึกษาในในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดพบว่า พบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้ 13% และสัมพันธ์กับการมีพยากรณ์โรคที่แย่(47)

ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน APC ได้ประมาณ 90% ในทั้ง 2 กลุ่ม ใกล้เคียงกับที่มีการรายงานการตรวจพบในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงทั้งหมด(48); ในแง่ของศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีนนี้กับการพยากรณ์โรคมียังมีความขัดแย้งระหว่างงานวิจัย(49, 50); ยังไม่มีการรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนนี้ในในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับและได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด

ผลการตรวจการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอ (CNV) พบว่า ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำพบการเพิ่มจำนวนของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *KRAS* และ *BRAF* มากกว่าอีกกลุ่ม และพบการลดลงของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *NRAS* และ *PMS2* มากกว่าอีกกลุ่ม; ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วพบการลดลงของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *CTNNB1* และ *MLH1* เมื่อเทียบกับอีกกลุ่ม ซึ่งทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่า 94% ของผู้ป่วยทั้งหมดตรวจพบความผิดปกติของการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอได้มากกว่า 1 ยีนในแต่ละคน; ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอยังมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาในหลายพันธุชนิดที่เป็นซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลิมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels); เปรียบเทียบการตรวจพบการแปรผันของจำนวนชุดดีเอ็นเอของยีนต่างๆ ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงยังไม่ชัดเจน; มีการศึกษาที่รายงานถึงการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีน *KRAS* ว่าพบประมาณ 0.67% (7 คน จาก 1039 คน) (51), อีกหนึ่งการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 10 คน พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอ ในยีน *KRAS* 10%, ยีน *ERBB2* 20%, ยีน *MET* 10% และอีกหนึ่งการศึกษารายงานการตรวจพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอ ในยีน *FGFR1* 3% ทุกการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าการพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีนเหล่านี้จะมีการตอบสนองต่อการใช้ยามุ่งเป้าชนิด anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MoAbs) ไม่ดี(52, 53); ในพยาธีกำเนิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงตามที่ได้กล่าวไว้ในบทปริทัศน์วรรณกรรม จะพบว่าในขั้นตอนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีนบางตัว ซึ่งเป็นพยาธีกำเนิดที่สำคัญ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงในจำนวนชุดดีเอ็นเอในยีนเหล่านี้อาจทำให้ค้นพบปัจจัยสำคัญในการทำนายการดำเนินโรคได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมให้มากกว่าเดิม

ในด้านของลักษณะทางคลินิก, พยาธิวิทยา, และการรักษาที่ได้รับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็วหลังการรักษา โดยกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็วสามารถพบได้มากกว่าในผู้ป่วยที่มีการกระจายของมะเร็งที่ระดับเยาะกว่า ซึ่งพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีจำนวนมะเร็งที่กระจายไปที่ระดับเท่ากับ 2 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็ว เทียบกับ 1 ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้า($p=0.02$), ในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วมีแนวโน้มที่จะมีการกระจายของมะเร็งที่ตับในทั้ง 2 โลบ มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำ, มีการประเมินการผ่าตัดได้ของมะเร็งที่ตับโดยศัลยแพทย์เป็นผ่าตัดได้น้อยกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซ้ำ, มีแนวโน้มที่ได้รับการผ่าตัดตับชนิด hepatectomy มากกว่ากลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำช้า เป็นการแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปริมาณการกระจายของมะเร็งไปที่ตับ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้(6, 10) ตามที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าผู้ป่วยที่มีการกระจายของมะเร็งไปที่ตับเยาะกว่า โดยเฉพาะการกระจายที่มี

รูปแบบของจำนวนก้อนมะเร็งปริมาณมากและตำแหน่งการกระจายอยู่ในทั้ง 2 โลบของตับ มีความสัมพันธ์กลับการเป็นซ้ำของโรคเร็วหลังการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดอย่างสมบูรณ์

ในการศึกษานี้ปริมาณผู้ป่วยที่รับการรักษาก่อนผ่าตัดทั้งฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด (CCRT) และ/หรือ เคมีบำบัดมีจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่มีการกลับเป็นซ้ำเร็วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, จากข้อมูลของการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดอย่างสมบูรณ์ ถ้าได้รับการรักษาเสริมโดยยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัดและหลังการผ่าตัดจะมีระยะปลอดโรค (disease-free survival) ที่นานกว่าเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเพียงอย่างเดียว(54), ซึ่งจากศึกษานี้ก็แสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคเร็ว มีลักษณะของการกระจายของมะเร็งไปที่ตับเยอะกว่า นำไปสู่การได้รับการรักษาเสริมก่อนการผ่าตัดที่เยอะกว่า แม้จะได้รับการรักษาเสริมเพื่อลดขนาดของตัวโรครก่อนการผ่าตัด ก็ยังมีการกลับเป็นซ้ำของโรคที่มากกว่า แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะต้องมีปัจจัยทางพันธุกรรมบางอย่างที่เป็นตัวกำหนดให้มะเร็งมีลักษณะการดำเนินโรคแย่กว่าถึงแม้จะได้รับการรักษาอย่างเต็มที่แล้วก็ตาม

5.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดคือ รวบรวมประชากรที่ศึกษาได้น้อย ถึงแม้ว่าปริมาณผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการแพร่กระจายไปที่ตับที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาจะมีปริมาณมากถึง 500 คน เนื่องจากการศึกษานี้มีการกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัยที่เข้มงวด เพื่อพยายามตัดปัจจัยรบกวนอื่นๆ ที่จะมีผลต่อการทำนายโรค ซึ่งพบได้บ่อยจากการศึกษาแบบย้อนหลัง เช่น มีการกระจายของตัวโรคไปอวัยวะอื่น ๆ นอกจากตับ, ได้รับการผ่าตัดแบบสองขั้นตอน(Two-stage hepatectomy) หรือมีการใช้ยากกลุ่มสารชีวภาค(biologic agent) ในการรักษา ได้แก่ ยาด้านการสร้างหลอดเลือด(Angiogenesis inhibitors) หรือยาด้านอีจีเอฟอาร์ (anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MoAbs)) เป็นต้น เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้

จำนวนผู้ป่วยที่สามารถตรวจ whole exon sequencing ได้สำเร็จมีจำนวนเพียง 18 จากทั้งหมด 39 คน ซึ่งสาเหตุที่ตรวจไม่สำเร็จเนื่องจากไม่ผ่านในขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) ซึ่งได้พยายามแก้ไขโดยการสกัดดีเอ็นเอเพื่อส่งตรวจซ้ำและได้วัดปริมาณว่ามีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอก่อนส่งไปซ้ำอีกรอบ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถตรวจได้ครบทุกคน ซึ่งสาเหตุสามารถเป็นได้จากดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ไม่ดีถึงแม้จะมีปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอก็ตาม โดยอาจจะ

การเจือปนของอนุภาคอื่นในปริมาณมาก(e.g. proteins, organic compounds, other) เนื่องจากชิ้นเนื้อส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาในการวิจัยนี้ส่วนใหญ่มีอายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไป ในชิ้นเนื้อที่เก็บไว้นานๆ จะมีการสลายของดีเอ็นเอได้ทำให้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดี นอกจากนี้สาเหตุยังอาจเป็นจากตัวเทคนิคการตรวจเอง ได้แก่ PCR introduces bias ซึ่งคือการที่ในช่วงการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบจะต้องมีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งอาจจะเกิดการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณต่างๆ ได้ไม่เท่ากัน บางบริเวณเพิ่มขึ้นได้มาก บางบริเวณเพิ่มขึ้นได้น้อย ทำให้การนำไปตรวจในขั้นตอนต่อไปมีปัญหา

ข้อจำกัดของการตรวจทางพันธุกรรมแบบ whole exome sequencing ด้วยเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ที่ไม่สามารถตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ทุกประเภท ได้แก่ ความผิดปกติในด้าน epigenetic change หรือ gene rearrangement

ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษาดังกล่าว ในกลุ่มประชากรที่มากขึ้น, มีระบบการเก็บฐานข้อมูลที่ดีขึ้น, ทำการศึกษาร่วมกันของโรงพยาบาลหลายแห่ง รวมถึงเพิ่มเทคนิคการตรวจเพื่อหาความผิดปกติทางพันธุกรรมอื่น ๆ ที่มากขึ้น

บรรณานุกรม

1. Arkom. Hospital Based Cancer Registry. National Cancer Institute, THAILAND. 2015.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2016;66(1):7-30.
3. Hayashi M, Inoue Y, Komeda K, Shimizu T, Asakuma M, Hirokawa F, et al. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. BMC surgery. 2010;10:27.
4. Muratore A, Zorzi D, Bouzari H, Amisano M, Massucco P, Sperti E, et al. Asymptomatic colorectal cancer with un-resectable liver metastases: immediate colorectal resection or up-front systemic chemotherapy? Annals of surgical oncology. 2007;14(2):766-70.
5. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved Survival in Metastatic Colorectal Cancer Is Associated With Adoption of Hepatic Resection and Improved Chemotherapy. Journal of Clinical Oncology. 2009;27(22):3677-83.
6. Memon MA, Beekingham IJ. Surgical resection of colorectal liver metastases. Colorectal Disease. 2001;3(6):361-73.
7. Gomez D, Sangha VK, Morris-Stiff G, Malik HZ, Guthrie AJ, Toogood GJ, et al. Outcomes of intensive surveillance after resection of hepatic colorectal metastases. The British journal of surgery. 2010;97(10):1552-60.
8. Takahashi S, Konishi M, Nakagohri T, Gotohda N, Saito N, Kinoshita T. Short time to recurrence after hepatic resection correlates with poor prognosis in colorectal hepatic metastasis. Japanese journal of clinical oncology. 2006;36(6):368-75.
9. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. American Journal of Clinical Oncology. 1982;5(6):649-56.
10. Viganò L, Capussotti L, Lapointe R, Barroso E, Hubert C, Giuliani F, et al. Early Recurrence After Liver Resection for Colorectal Metastases: Risk Factors, Prognosis, and Treatment. A LiverMetSurvey-Based Study of 6,025 Patients. Annals of surgical oncology. 2014;21(4):1276-86.
11. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-Stage Hepatectomy: A

Planned Strategy to Treat Irresectable Liver Tumors. *Annals of Surgery*. 2000;232(6):777-85.

12. Cuyle PJ, Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer.

Acta clinica Belgica. 2017;72(2):103-15.

13. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J,

et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Critical reviews in*

oncology/hematology. 2017;109:9-19.

14. Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, et al. Metastatic

Pattern of Stage IV Colorectal Cancer with High-Frequency Microsatellite Instability as a

Prognostic Factor. *Anticancer research*. 2017;37(1):239-47.

15. Mundade R, Imperiale T, Prabhu L, Loehrer P, Lu T. Genetic pathways, prevention, and

treatment of sporadic colorectal cancer 2014. 400-6 p.

16. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The

consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015;21:1350.

17. Roseweir AK, McMillan DC, Horgan PG, Edwards J. Colorectal cancer subtypes:

Translation to routine clinical pathology. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;57:1-7.

18. Arends MJ. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Applied immunohistochemistry &*

molecular morphology : AIMM. 2013;21(2):97-102.

19. Jeong W-J, Ro EJ, Choi K-Y. Interaction between Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways

and an anti-cancer strategy via degradations of β -catenin and RAS by targeting the Wnt/ β -catenin

pathway. *npj Precision Oncology*. 2018;2(1):5.

20. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer

metastasis: A system review. *Pathology - Research and Practice*. 2015;211(8):557-69.

21. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Galvano A, Vincenzi B, Russo A. Can KRAS and BRAF

mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic

review and meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;99:150-7.

22. Chaiyapan W, Duangpakdee P, Boonpipattanapong T, Kanngern S, Sangkhathat S. Somatic

mutations of K-ras and BRAF in Thai colorectal cancer and their prognostic value. *Asian Pacific*

journal of cancer prevention : APJCP. 2013;14(1):329-32.

23. Luu L-J, Price TJ. BRAF Mutation and Its Importance in Colorectal Cancer. *Advances in*

the Molecular Understanding of Colorectal Cancer: IntechOpen; 2019.

24. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87.e3.
25. Haddad R, Ogilvie RT, Croitoru M, Muniz V, Gryfe R, Pollet A, et al. Microsatellite instability as a prognostic factor in resected colorectal cancer liver metastases. *Annals of surgical oncology*. 2004;11(11):977-82.
26. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15:273.
27. Cojocneanu R, Pop L, Jurj A, Raduly L, Dumitrascu D, Dragos N, et al. Next generation sequencing applications for breast cancer research 2015. 278 p.
28. Wilantho A, Praditsup O, Charoenchim W, Kulawonganuchai S, Assawamakin A, Tongsimma S. Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. *Genomics and Genetics*. 2012;5(2):104-29.
29. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*. 2009;25(4):195-203.
30. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif)*. 2013;6:287-303.
31. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(10):1932-41.
32. Jinawath N. Application of next-generation sequencing technology in the diagnosis, treatment, and cancer research. *Thai Journal of Genetics*. 2013;S.1(Special Issue 1):62-5.
33. อุโฆษกิจ ก. เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคที่สองและสาม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 2015;23(4):633-50.
34. Manipulating NGS data with Galaxy [Available from: <https://galaxyproject.org>].
35. Batut B. Exome sequencing data analysis [Available from: <https://galaxyproject.org>].
36. Batut B. Quality Control [Available from: <https://galaxyproject.org>].
37. Wolff J. Mapping [Available from: <https://galaxyproject.org>].
38. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, Hechtman JF, Kemeny N, Saltz L, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(16):4753-60.

39. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, Casagrande M, Lonardi S, Aprile G, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *British journal of cancer*. 2015;112(12):1921-8.
40. Karagkounis G, Torbenson MS, Daniel HD, Azad NS, Diaz LA, Jr., Donehower RC, et al. Incidence and prognostic impact of KRAS and BRAF mutation in patients undergoing liver surgery for colorectal metastases. *Cancer*. 2013;119(23):4137-44.
41. Kemeny NE, Chou JF, Capanu M, Gewirtz AN, Cercek A, Kingham TP, et al. KRAS mutation influences recurrence patterns in patients undergoing hepatic resection of colorectal metastases. *Cancer*. 2014;120(24):3965-71.
42. Vauthey JN, Zimmitti G, Kopetz SE, Shindoh J, Chen SS, Andreou A, et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 2013;258(4):619-26; discussion 26-7.
43. Teng HW, Huang YC, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Jiang JK, et al. BRAF mutation is a prognostic biomarker for colorectal liver metastasectomy. *Journal of surgical oncology*. 2012;106(2):123-9.
44. Larki P, Gharib E, Yaghoob Taleghani M, Khorshidi F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Asadzadeh Aghdaei H. Coexistence of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. *Cell J*. 2017;19(Suppl 1):113-7.
45. Loes IM, Immervoll H, Sorbye H, Angelsen JH, Horn A, Knappskog S, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. *International journal of cancer*. 2016;139(3):647-56.
46. Sarshekeh AM, Advani S, Overman MJ, Manyam G, Kee BK, Fogelman DR, et al. Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0173345.
47. Mizuno T, Cloyd JM, Vicente D, Omichi K, Chun YS, Kopetz SE, et al. SMAD4 gene mutation predicts poor prognosis in patients undergoing resection for colorectal liver metastases. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2018;44(5):684-92.
48. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2017;109(8).

49. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005;54(9):1283-6.
50. Schell MJ, Yang M, Teer JK, Lo FY, Madan A, Coppola D, et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nature Communications*. 2016;7:11743.
51. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *International journal of cancer*. 2013;133(5):1259-65.
52. Bertotti A, Papp E, Jones S, Adleff V, Anagnostou V, Lupo B, et al. The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature*. 2015;526(7572):263-7.
53. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, Lafer I, Lax S, Auer M, et al. Changes in colorectal carcinoma genomes under anti-EGFR therapy identified by whole-genome plasma DNA sequencing. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004271-e.
54. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(12):1208-15.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงความผิดปกติชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels) ที่ตรวจพบทั้งหมด ก่อนการพิจารณาเลือกเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น missense, nonsense mutation หรือการกลายพันธุ์ประเภทอื่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

ยีน	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11) (%)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7) (%)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18) (%)
<i>RAS</i> ¹	7(63.6)	5(71.4)	1	12(66.7)
• <i>KRAS</i>	5(45.5)	4(57.1)	1	9(50)
• <i>NRAS</i>	5(45.5)	1(14.3)	0.32	6(33.3)
<i>BRAF</i> ²	2(18.2)	1(14.3)	1	3(16.7)
<i>PIK3CA</i>	8(72.7)	1(14.3)	0.05	9(50)
<i>APC</i>	10(90.9)	7(100)	1	17(94.4)
<i>CTNNB1</i>	2(18.2)	2(28.6)	1	4(22.2)
<i>SMAD4</i>	3(27.3)	3(42.9)	0.63	6(33.3)
MMR gene	7(63.6)	4(57.1)	1	11(61.7)
• <i>MLH1</i>	4(36.4)	0(0)	0.11	4(22.2)
• <i>MSH2</i>	3(27.3)	1(14.3)	1	4(22.2)
• <i>MSH6</i>	3(27.3)	2(28.6)	1	5(27.8)
• <i>PMS2</i>	2(18.2)	2(28.6)	1	4 (22.2)

¹ พบ KRAS ร่วมกับ NRAS 2 คน ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว

² พบ RAS ร่วมกับ BRAF 2 คน ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว, 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงความผิดปกติชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึม (single nucleotide polymorphisms ;SNPs) หรือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของลำดับเบส (insert/deletion; indels) ที่ตรวจพบทั้งหมด หลังการพิจารณาเลือกเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น missense, nonsense mutation หรือการกลายพันธุ์ประเภทอื่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

ยีน	กลับเป็นซ้ำเร็ว (N = 11) (%)	กลับเป็นซ้ำช้า (N = 7) (%)	P value	รวมทั้งหมด (N = 18) (%)
<i>RAS</i> ¹	5(45.5)	3(42.9)	1	8(44.4)
• <i>KRAS</i>	3(27.3)	3(42.9)	0.63	6(33.3)
• <i>NRAS</i>	2(18.2)	0(0)	0.5	2(11.1)
<i>BRAF</i> ²	1(9.1)	1(14.3)	1	2(11.1)
<i>PIK3CA</i>	2(18.2)	1(14.3)	1	3(16.7)
<i>APC</i>	10(90.9)	6(85.7)	1	16(88.9)
<i>CTNNB1</i>	0(0)	0(0)		0(0)
<i>SMAD4</i>	1(9.1)	0(0)	1	1(5.6)
MMR gene ³	2(18.2)	2(28.6)	1	4(22.2)
• <i>MLH1</i>	2(18.2)	0(0)	0.5	2(11.1)
• <i>MSH2</i>	0(0)	1(14.3)	0.39	1(5.6)
• <i>MSH6</i>	0(0)	1(14.3)	0.39	1(5.6)
• <i>PMS2</i>	1(9.1)	0(0)	0.39	1(5.6)

¹ ไม่พบ *KRAS* ร่วมกับ *NRAS*

² 1 คนพบทั้ง *KRAS*, *BRAF* และ *PMS2* กลายพันธุ์พร้อมกันในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว

³ 1 คนพบ *MLH1* ร่วมกับ *MSH6* ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว

*** หลังตรวจประเมินความสำคัญของการกลายพันธุ์ที่พบในฐานข้อมูล NCBI และ Cosmic พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ไม่พบการรายงานในฐานข้อมูลคือ

- *BRAF*(c.1695_1711delATGTTCTGTAGATTTTCGAGGCCAGAGTCCTTTAGCCCTACTCAGGTTAAAATGATGTTTTGTTTT CAGTTACTTACACGCCAAGT(Splice Site)) 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า
- *PIK3CA*(c.2784_2798delTTTTGGTGTCTTAATTTATTCAAGACATTTTGT(Splice Site)) 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำช้า
- *PIK3CA*(c.1350_1379delTGGATTAGAAGATTGCTGAACCTATTGG (In Frame Del)) 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว
- *SMAD4*(c.955_992delGGATGTTCTTTCCATTTATTTCTATAGCTCCTGA(Splice Site), c.1658G>C(non stop mutation)) 1 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว
- *MLH1*(c.1050_1129delAGGACTTGCTGGCCCTCTGGGAGATGGTTAAATCCACAACAAGTCTGACCTCGTCTTCTACTT CTGGAAGTAGTGATA(Frame Shift Del), c.658_677delTTTGAAATGCTGTTAGTCGGTATGTCGAT AACCTAT(Splice Site)) 2 คนในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำเร็ว

ภาคผนวก ค

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Case record form)

ID No.

Baseline characteristics

1. Ageyrs
2. Gender Male Female
3. Performance status 0 1 2 3 4
4. Co-morbid
5. Family history of cancer Yes..... No
6. สิทธิการรักษา ข้าราชการรัฐวิสาหกิจ/ ประกันสังคม บาท 30
เงินสด

Clinical data

1. TNM staging by AJCC cancer staging 7th Edition (2010) : T.....N.....M.....,
stage.....
2. Pre-op CEA.....
3. Primary tumor site cecum ascending colon transverse colon
descending colon
sigmoid rectum other.....
4. Liver metastasis size ≥ 5 cm < 5 cm
5. No. of hepatic metastases >3 ≤3
bilateral lobe unilateral lobe
6. liver resection margin <1 cm ≥ 1cm

Treatment

1. Date of surgery
 - 1.1. Primary tumor/...../.....
 - 1.2. Liver/...../.....

2. Type of surgery

2.1. Primary tumor.....

Post-op complication.....

2.2. Liver.....

Post-op complication.....

3. Chemotherapy

3.1. Neoadjuvant chemotherapy :

regimen.....cycle.....

.....

Dose reduction/delay

yes.....NO.....

Start date.....end date.....

3.2. Adjuvant chemotherapy :

Regimen.....cycle.....

.....

Start date.....end date.....

Dose reduction/delay

yes.....NO.....

4. Radiotherapy

Preop-CCRT PORT other

Total dose.....Gy

.....Fractions.....Weeks

Date of RT : Start...../...../..... Finish...../...../.....

Histopathology

1. Primary tumor

1.1. Histology subtype.....

1.2. Histology grade.....

1.3. Presence of lymphatic, neural, vascular invasion yes noother.....1.4. Margin status R0 R1 R2

1.5. LN involvement.....

2. Liver

2.1. Histology subtype.....

2.2. Histology grade.....

2.3. Presence of lymphatic, neural, vascular invasion yes no

other.....

2.4. Margin status R0 R1 R2

Mutation

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Follow-up

1. Recurrent

1.1. Date...../...../.....

1.2. Site of recurrent.....

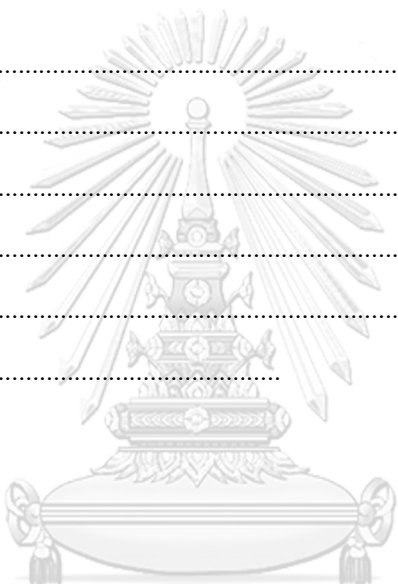
1.3. Disease free intervalyears.....months.....days

2. Date of last follow up...../...../.....

2.1. Status last follow up Death Alive

3. Date of death...../...../.....

3.1. Overall survivalyears.....months.....days



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสาริศ อารยะพงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	23 กรกฎาคม 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดสุรินทร์
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) พ.ศ. 2558-2562 นิสิตปริญญาโท แพทย์ประจำบ้าน ภาควิชา อายุรศาสตร์ สาขา มะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	158 ถนนธนะสาร ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000