

## บทที่ 2

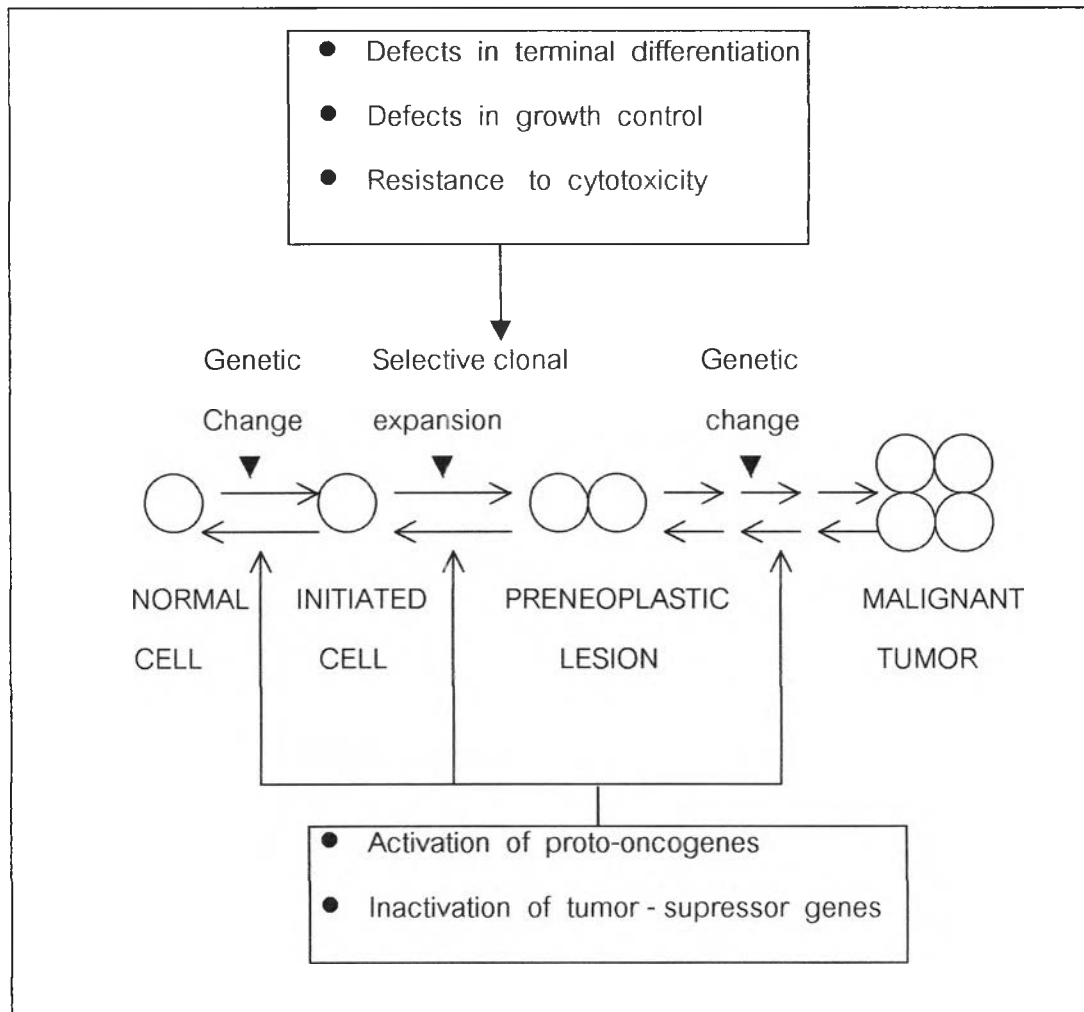
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

##### ขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง

การเกิดมะเร็งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เป็นขั้นเป็นตอน โดยเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและจำนวนของโครโมโซม เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ (DNA) การกระตุ้นยีนก่อมะเร็ง และการยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนต้านมะเร็ง การเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมดังกล่าวจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายขั้นตอน จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและคุณสมบัติของเซลล์จากเซลล์ปกติเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ก่อนเป็นมะเร็ง (pre-malignant cell) และกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (malignant cell) ในที่สุด<sup>26</sup> แสดงดังรูปที่ 2.1 ยีนก่อมะเร็ง (oncogenes) คือยีนซึ่งเมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะทำให้การเปลี่ยนแปลงไปสู่การเป็นมะเร็ง ยีนก่อมะเร็งอาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีนปกติที่เรียกว่า proto-oncogene สำหรับยีนต้านมะเร็งที่เรียกว่า Tumor suppressor genes เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดมะเร็งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างและจำนวนของโครโมโซมมีส่วนสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเกิดโรคมะเร็ง ความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยโรคมะเร็งเกิดได้ทั้งจากการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากขึ้นผิดปกติเช่น การเพิ่มของโครโมโซมคู่ที่ 7 และ 17 ในการเกิดมะเร็งของศีรษะและคอ การเพิ่มแขนของโครโมโซม การสับเปลี่ยนตำแหน่งของโครโมโซม (chromosome translocation) ซึ่งทำให้ยีนสองยีนจากโครโมโซมต่างคู่กันมาอยู่ใกล้กัน มีผลให้การควบคุมการทำงานของยีนนั้นผิดปกติไป และเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งเช่น การสับเปลี่ยนตำแหน่งของโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 22 ทำให้เกิด Philadelphia chromosome ทำให้ยีน *BCR* และ *ABL* จากโครโมโซมดังกล่าวมาต่อกันเกิดเป็นยีนใหม่และเป็นสาเหตุของมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด chronic myelogenous leukemia (CML)



รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการเกิดเซลล์มะเร็ง<sup>27</sup>

### วัฏจักรของเซลล์และการเกิดโรคมะเร็ง<sup>28,29</sup>

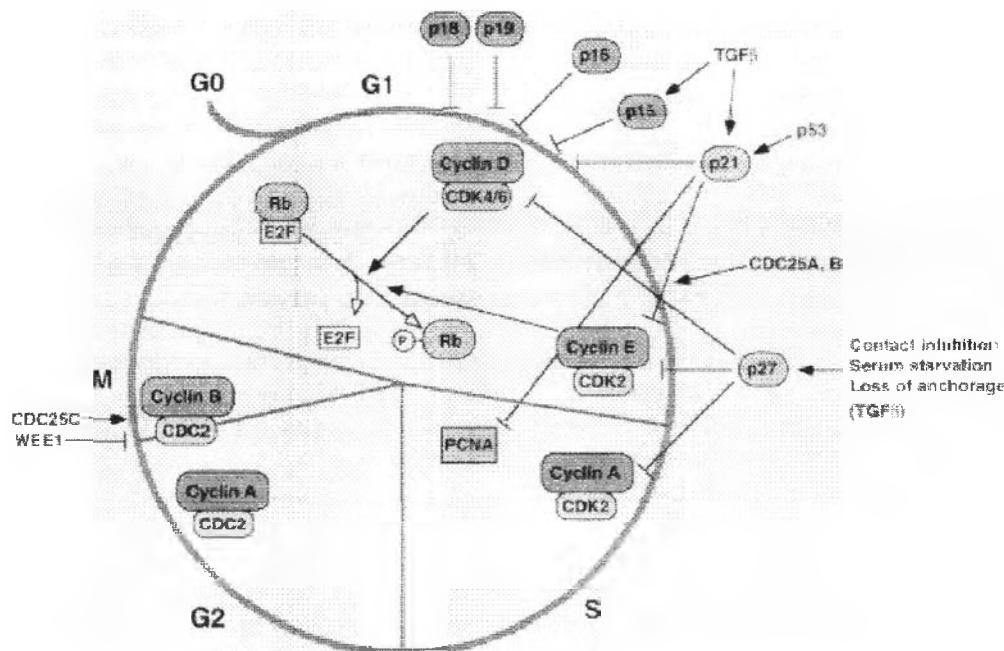
โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ผิดปกติโดยที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ขบวนการสำคัญที่นำไปสู่การเพิ่มจำนวนเซลล์คือวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) วัฏจักรของเซลล์แบ่งได้เป็น 4 ระยะได้แก่ ระยะ G1 (pre-synthetic phase) เป็นระยะที่เซลล์เริ่มมีการเตรียมการสร้างดีเอ็นเอและสารต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์ ระยะ S (DNA synthetic phase) เป็นระยะที่มีการสร้างดีเอ็นเอและสารต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์ ระยะ G2 (pre-mitotic phase) เป็นระยะก่อนที่จะเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์ และระยะ M (mitotic phase) เป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์ในเซลล์ปกติการเพิ่มจำนวนเซลล์จะเริ่มเป็นขั้นตอนทุกระยะตามลำดับตั้งแต่ระยะ G1 จนถึงสิ้นสุดที่ระยะ M อย่างสมบูรณ์โดยไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้น

การทำงานของวัฏจักรของเซลล์เกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนสองประเภทคือ โปรตีน cyclin และโปรตีน cyclin dependent kinase (CDK) โดยที่โปรตีนทั้งสองประเภทนี้จะรวมกันเป็นสารประกอบไปกระตุ้นขั้นตอนต่าง ๆ ที่จะได้กล่าวต่อไปจนท้ายที่สุดมีการปลดปล่อย E2F ทำให้เซลล์เปลี่ยนจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S โปรตีน CDK มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ปัจจุบันนี้พบว่า CDK มี 6 ชนิดได้แก่ CDK1 CDK2 CDK3 CDK4 CDK5 และ CDK6 ส่วน cyclin มี 9 ชนิดได้แก่ cyclin-A cyclin-B cyclin-C cyclin-D1 cyclin-D2 cyclin-D3 cyclin-E cyclin-F และ cyclin-G

ในปัจจุบันเชื่อว่าวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 เริ่มต้นจากการทำงานของ cyclin C จับกับ CDKX (ยังไม่ทราบว่า CDKX เป็น CDK ชนิดใด) จนกระทั่งเข้าสู่จุด R (restriction point หรือ R point) ซึ่งเป็นจุดที่วัฏจักรเซลล์ไม่ถูกควบคุมด้วย growth factors ต่าง ๆ ในน้ำเหลืองอีกต่อไป ที่จุด R นี้ cyclin-D1 cyclin-D2 และ cyclin-D3 จับกับ CDK2 CDK4 และ CDK5 และกระตุ้น proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของ DNA polymerase S และมีความจำเป็นต่อการเกิด DNA replication จากนั้น cyclin E และ CDK2 จะร่วมกันทำงานตรงรอยต่อระหว่างระยะ G1 และระยะ S โดย cyclin E เมื่อรวมตัวกับ CDK2 จะกระตุ้นให้เกิด phosphorylation กับโปรตีนที่มีลักษณะโมเลกุลคล้ายโปรตีนพี Rb เช่น โปรตีน Rb โปรตีนพี107 และโปรตีนพี130 ทำให้โปรตีนเหล่านี้ปลดปล่อย transcription factors คือ E2F ซึ่งไปทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของสารพันธุกรรมที่มีความจำเป็นต่อการออกจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S

ในระยะ S cyclin-E ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกับ cyclin-E จะรวมตัวกับ CDK2 เพื่อให้ได้ E2F จนเซลล์เข้าสู่ระยะต่อระหว่างระยะ S กับระยะ G2 ที่ระยะค่อนี้ cyclin-B จะจับกับ CDC2 และกระตุ้นเซลล์เข้าสู่ระยะ G2 เพื่อเตรียมพร้อมที่จะดำเนินต่อไปจนเข้าสู่ระยะ M แล้ว cyclin-B จะถูกทำลายไปในระยะ M ในระยะ M นี้ cyclin A จะจับกับ CDC2 จนกระทั่งเซลล์สิ้นสุดการแบ่งตัว แสดงดังรูปที่ 2.2

การที่เซลล์เข้าสู่วัฏจักรเซลล์และดำเนินไปจนครบวงจรจำเป็นต้องมีขบวนการตรวจสอบเพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมไม่ให้เข้าสู่วัฏจักรเซลล์และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น เรียกการตรวจสอบนี้ว่าการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell-cycle control หรือ checkpoints) เซลล์ที่ผิดปกติจะถูกหยุดไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์และได้รับการแก้ไขซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่ผิดปกติก่อนที่จะแบ่งตัวต่อไป หรือหากไม่สามารถแก้ไขซ่อมแซมได้ก็จะถูกบังคับให้เข้าสู่ภาวะ apoptosis ต่อไป การควบคุมวัฏจักรเซลล์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณรอยต่อของแต่ละระยะเช่น รอยต่อระยะ G1/S รอยต่อระยะ G2/M เป็นต้น ปัจจุบันรอยต่อระยะ G1/S ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและเข้าใจกลไกที่เกิดขึ้นค่อนข้างสมบูรณ์ ทำให้ทราบว่าโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนต้านมะเร็ง P53 ทำหน้าที่ในตำแหน่งรอยค่อนี้



รูปที่ 2.2 แสดงวัฏจักรเซลล์ เริ่มจากระยะ G1 ผ่านเข้าสู่ระยะ S, G2 และ M ตามลำดับ<sup>28,29</sup>

การที่เซลล์เข้าสู่วัฏจักรเซลล์และดำเนินไปจนครบวงจรจำเป็นต้องมีขบวนการตรวจสอบเพื่อป้องกันและกำจัดเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรมไม่ให้เข้าสู่วัฏจักรเซลล์และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น เรียกการตรวจสอบนี้ว่าการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell-cycle control หรือ checkpoints) เซลล์ที่ผิดปกติจะถูกหยุดไว้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์และได้รับการแก้ไขซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่ผิดปกติก่อนที่จะแบ่งตัวต่อไป หรือหากไม่สามารถแก้ไขซ่อมแซมได้ก็จะถูกบังคับให้เข้าสู่ภาวะ apoptosis ต่อไป การควบคุมวัฏจักรเซลล์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณระยะต่อของแต่ละระยะเช่น รอยต่อระยะ G1/S รอยต่อระยะ G2/M เป็นต้น ปัจจุบันรอยต่อระยะ G1/S ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและเข้าใจกลไกที่เกิดขึ้นค่อนข้างสมบูรณ์ ทำให้ทราบว่าโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนต้านมะเร็ง P53 ทำหน้าที่ในตำแหน่งรอยต่อนี้

### ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes)<sup>30</sup>

ยีนต้านมะเร็งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดมะเร็ง การกลายพันธุ์ของยีนต้านมะเร็งมีผลให้ยีนนี้ไม่สามารถทำงานได้และอาจมีการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติไปสู่ลูกหลานต่อไป ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีนต้านมะเร็งจึงเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งทั้งที่เป็นกรรมพันธุ์และเกิดขึ้นเอง (sporadic)

ยีนต้านมะเร็งได้รับการค้นพบครั้งแรกจากการศึกษาเซลล์ร่างกาย (Somatic cells) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เมื่อนำเซลล์มะเร็งมาผสมรวมกับเซลล์ปกติจะได้เซลล์

ลูกหลานที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็ง แต่เมื่อใดก็ตามเมื่อสูญเสียยีนด้านมะเร็งที่ปกติไปเซลล์ลูกหลานถัดมาก็สามารถแสดงคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งได้อีกครั้งหนึ่ง แสดงให้เห็นว่ามะเร็งมีพฤติกรรมการถ่ายทอดแบบยีนด้อย

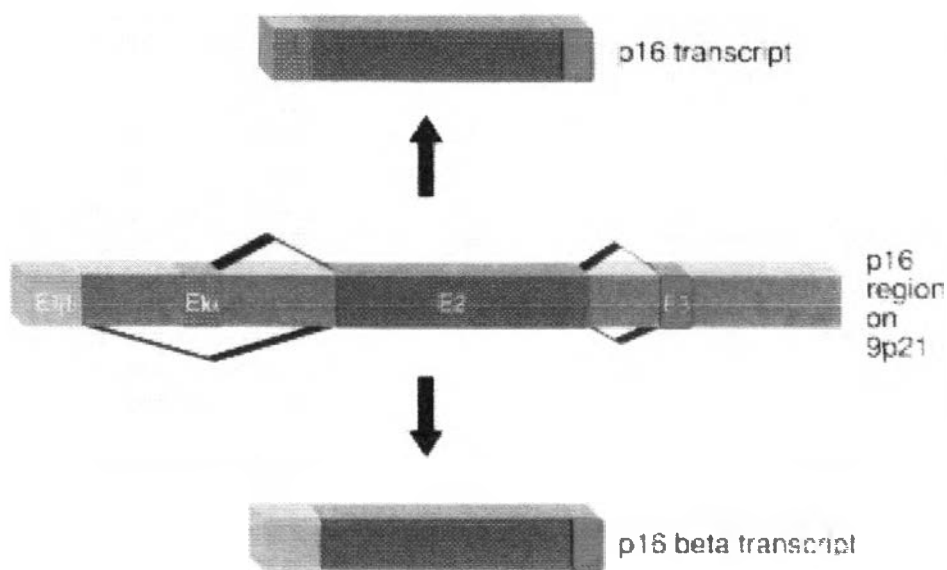
จากการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ของเซลล์มะเร็งพบว่าผู้ป่วยมะเร็งชนิดที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเช่น retinoblastoma และ Wilms' tumor แสดงให้เห็นว่ามีการขาดหายไปของโครโมโซมเฉพาะที่เกี่ยวข้องชนิดของโรคมะเร็ง โดยเฉพาะการขาดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 13q14 เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง retinoblastoma และการขาดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 11p13 เกี่ยวข้องกับ Wilms' tumor จากข้อมูลเหล่านี้สรุปได้ว่าการเกิดมะเร็งแต่ละชนิดต้องมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมที่จำเพาะในแต่ละโรค ทำให้โครโมโซมของทั้งสองตำแหน่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่าเป็นตำแหน่งของยีนด้านมะเร็งชนิด retinoblastoma (RB1) และ Wilm' tumor (WT-1)

จากการวิเคราะห์ของ Knudson ในโรคมะเร็งชนิด retinoblastoma ในกลุ่มผู้ป่วยที่มะเร็งเป็นชนิดที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งมักเป็นโรคมะเร็งชนิดนี้ตั้งแต่วัยเด็กและในกลุ่มผู้ป่วยที่มะเร็งเป็นชนิดsporadicหรือไม่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้เขาสันนิษฐานว่าการเกิดต้องอาศัยการกลายพันธุ์สองครั้งเพื่อให้เกิดความผิดปกติของทั้งสอง alleles ของยีนด้านมะเร็งและผลของการกลายพันธุ์ทำให้ยับยั้งการทำหน้าที่ไป ในมะเร็ง retinoblastoma ที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมการกลายพันธุ์ครั้งแรกเกิดในเซลล์ germline และครั้งที่สองเกิดในเซลล์โซมาติก ส่วนในมะเร็ง retinoblastoma ที่เป็น sporadic การกลายพันธุ์ทั้งสองครั้งเกิดในเซลล์โซมาติก ความผิดปกติของยีนนี้สามารถเห็นได้จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ แต่โดยปกติแล้วโรคมะเร็งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมไม่สามารถเห็นความผิดปกติจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ เพราะความผิดปกตินั้นเกิดเพียงเล็กน้อยเช่น การขาดหายไปของยีนเพียงเล็กน้อย หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ชนิด point mutation

แม้ว่ายีน P53 เป็นยีนด้านมะเร็งที่ได้รับการศึกษาและความสนใจมากที่สุดในขณะนี้ แต่ในหัวข้อของยีนด้านมะเร็งในบทความในวิทยานิพนธ์นี้จะขอกล่าวรายละเอียดเฉพาะยีน P16 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการศึกษาวิจัยนี้เท่านั้น

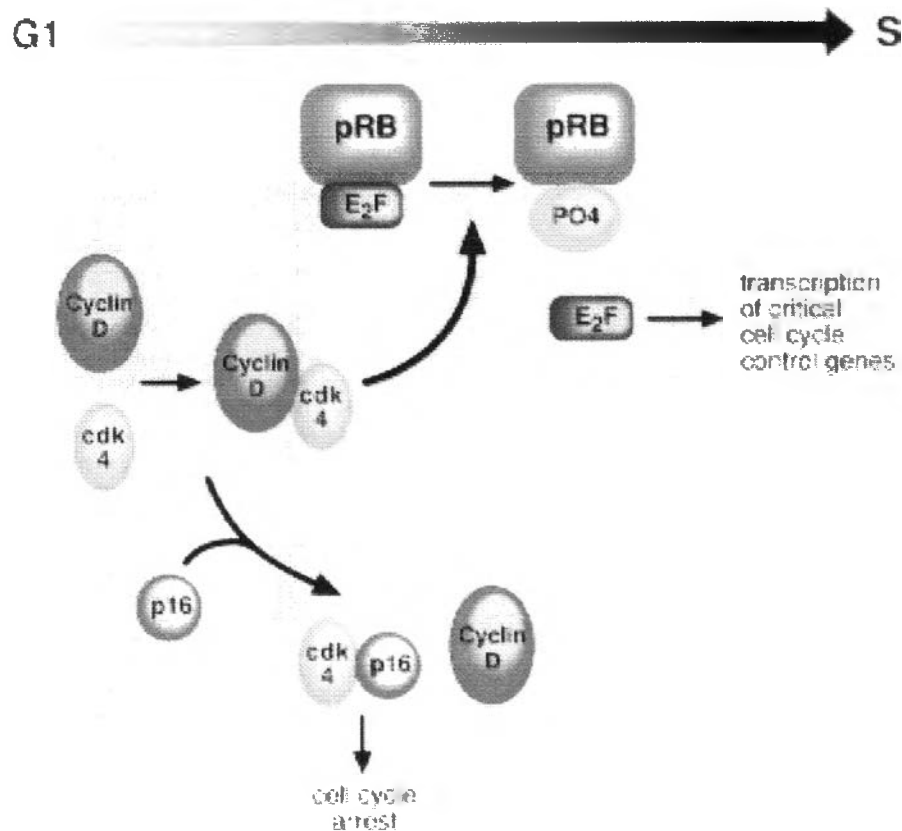
ยีน *P16*<sup>7</sup>

*P16* เป็นยีนต้านมะเร็งชนิดหนึ่งถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2536 (ค.ศ.1993) มีชื่อเรียกหลายชื่อ ได้แก่ major tumor suppressor 1 (*MTS-1*) หรือ inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a (*INK 4a*) หรือ cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) เป็นยีนที่พบที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ใน ระยะ G1 มีตำแหน่งของยีนอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9p21 ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งที่พบความผิดปกติได้บ่อยในมะเร็งหลายชนิดที่เกิดในมนุษย์ ยีน *p16* ประกอบด้วย 3 exon แสดงดังรูปที่ 2.3 ซึ่งประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 156 ชนิด มีน้ำหนัก 15.8kD<sup>7</sup>



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของยีน *P16*<sup>7</sup>

ยีน *P16* ผลิตโปรตีน p16 ซึ่งโปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (cyclin-dependent kinase inhibitor หรือ CDKI) ชนิดหนึ่ง โดยโปรตีน p16 จับกับ CDK4 หรือ CDK6 ซึ่งทำให้ cyclin จับกับ cyclin-dependent kinase (CDK) ไม่ได้ จึงไม่เกิดสารประกอบ cyclin-CDK ทำให้โปรตีน pRb ไม่ปลดปล่อย E2F (แสดงดังรูปที่ 2.4) โปรตีน p16 จึงเป็นโปรตีนที่สำคัญชนิดหนึ่งในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในระยะ G1 (G1 phase หรือ presynthetic phase) ไม่ให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S (S phase หรือ DNA synthetic phase) ดังนั้น ถ้ามีการสูญเสียการทำงานของโปรตีน p16 อาจนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์จนเป็นมะเร็ง



รูปที่ 2.4 แสดงการทำงานของวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 ต่อไปยังระยะ S โดยการทำงานประสานกันระหว่าง cyclin-D CDK4 E2F โปรตีน p16 และ โปรตีน pRB<sup>7</sup>

#### กลไกยับยั้งการทำงานของยีน P16

ในอดีตมีข้อโต้แย้งกันว่าการยับยั้งการทำงานของยีน P16 เกิดเฉพาะในเซลล์ในหลอดทดลองหรือเซลล์ในก้อนมะเร็งปฐมภูมิที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเท่านั้นจริงหรือไม่ เนื่องจากพบว่า homozygous deletion หรือการกลายพันธุ์ภายในยีน (intragenic mutation) ของยีน P16 พบได้ไม่บ่อยในมะเร็งปฐมภูมิที่มี LOH ที่ตำแหน่ง 9p21 แต่ข้อถกเถียงนี้ถูกหักไปเมื่อมีการพบว่าการขาดหายไปของยีน P16 ทั้งสองตำแหน่ง (p16 alleles) นั้นเป็นเพียงบริเวณเล็ก (microdeletion) ที่มีความยาวน้อยกว่า 200 กิโลเบส ทำให้การตรวจพบค่อนข้างยากเนื่องจากมีเซลล์ปกติปะปนอยู่ภายในก้อนมะเร็งต้องตรวจด้วยเทคนิค microsatellite ต่างไปจากยีนตำแหน่งอื่นที่ความผิดปกติของยีนเป็นชนิด point mutation ในขณะที่ยีน P16 มักเป็นชนิด small homozygous deletion ซึ่งถือเป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งการทำงานของยีน P16 ชนิด homozygous deletion ตัวอย่างของโรคมะเร็งที่มีความผิดปกติของยีน P16 ได้แก่ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งสมอง glioma มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด adenocarcinoma มะเร็งรังไข่ชนิด adenocarcinoma มะเร็งไต มะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด T-cell ALL มะเร็ง mesothelioma มะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน และมะเร็งผิวหนัง melanoma

ยีน *P16* ยังสามารถให้กำเนิดสำเนาที่มีชื่อว่ายีน *P16* เบต้า (*p16 $\beta$* ) หรือเรียกว่า p19ARF ในหนู ซึ่งประกอบด้วย exon 1 $\beta$  exon 2 และ exon 3 แสดงดังรูปที่ 2.3 ยีนนี้สร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 13.8 กิโลดาลตันซึ่งโปรตีนชนิดนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับโปรตีน p16 หลักฐานทางพันธุกรรมพบว่ายีนนี้มีความสำคัญน้อยเพราะจากการวิเคราะห์ก่อนมะเร็งปฏุมภูมิจำนวน 50 ตัวอย่างที่มียีน *P16* ปรกติไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของ exon1 $\beta$  เลย ทำให้เชื่อว่ายีน *P16 $\beta$*  ไม่ได้เป็นเป้าหมายแรกในการเกิดมะเร็ง แต่ยีนนี้กลับมีการขาดหายไปเมื่อเกิดความผิดปกติของยีน *P16* ด้วย จึงคาดคะเนว่าน่าจะเกิดจากทฤษฎี double-hit คือเมื่อเกิดการกลายพันธุ์แบบ silent หรือ missense ของยีน *P16* อาจมีผลอย่างรุนแรงต่อการอ่านรหัสของยีน *P16 $\beta$*  แต่จากการศึกษาที่ไม่ ยืนยันทฤษฎีนี้เพราะได้มีการทดลองสอดใส่ยีน *P16* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation ที่ exon 2 เพื่อหวังผลให้มีเกิดการเปลี่ยนแปลงในการถอดรหัสของยีน *P16 $\beta$*  เข้าไปในหนูทดลองปรากฏว่าเซลล์ยังคงสามารถยับยั้งการทำงานของวัฏจักรเซลล์ได้ เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาในเซลล์เนื้องอกชนิด glioma ที่เกิดขึ้นในมนุษย์พบว่าแม้ว่าจะมีการกลายพันธุ์ของยีน *P16* ก็ตามก็จะไม่ส่งผลให้คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของวัฏจักรเซลล์เสียไป แสดงให้เห็นว่าการเกิดการกลายพันธุ์แบบ silent หรือ missense ใน exon2 ของยีน *P16* จะไม่มีผลต่อการทำงานของยีน *P16*

นอกเหนือจากการเกิด homozygous deletion และ point mutation แล้วอาจมี methylation ในบริเวณ promotor ของ *P16* เกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็นเป้าหมายสำคัญในการเกิดมะเร็งของมนุษย์ ความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation กำลังได้รับความสนใจศึกษาอย่างกว้างขวางและเป็นเป้าหมายสำคัญของการเกิดมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์

ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ แม้จะพบว่าส่วนใหญ่จะมีการขาดหายไปของยีนบริเวณ 9p คือ มีการเกิด homozygous deletions ของยีน *p16* หรือการมีการเปลี่ยนแปลงของยีน Rb(mutations)<sup>54</sup> แต่ร้อยละ 30-40 พบว่าเกิด hypermethylation ของยีน *p16*<sup>53</sup> การยับยั้งการทำงานของยีน *p16* โดยผ่านขบวนการ hypermethylation พบบ่อยในมะเร็งหลายชนิดได้แก่ มะเร็งของสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งศีรษะและลำคอ มะเร็งกะเพาะปัสสาวะ มะเร็งหลอดอาหาร และมะเร็งปอดชนิด non-small-cell รวมทั้งในมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin's lymphoma ชนิด high grade<sup>34</sup>

### การทำงานของยีน *P16*

เซลล์ที่อยู่ในระยะพักหรืออยู่ในระยะ G0 เมื่อเซลล์เข้าสู่วัฏจักรเซลล์จะมีการสังเคราะห์ cyclin D และ E ในระหว่างที่เซลล์อยู่ในระยะ G1 ทั้ง cyclin D และ E มีความสำคัญในการเข้าสู่ระยะ S ของเซลล์ cyclin D ซึ่งแบ่งได้เป็น cyclinD1 cyclinD2 และ cyclinD3 เมื่อรวมตัวกับ CDK4 หรือ CDK6 มีผลให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation และยับยั้งการทำงานของ pRB ทำให้ E2F ถูกปลดปล่อยเป็นอิสระ E2F เป็นกุญแจสำคัญที่เปิดให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ได้(แสดงดังรูป 2.4) โปรตีน p16 พบครั้งแรกว่าเป็นตัวยับยั้ง cyclin-dependent kinase ชนิดหนึ่ง ยีน *P16* มีหน้าที่ในการสร้าง



โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15,845 คาลตัน โปรตีน p16 รวมตัวกับ CDK4 หรือ CDK6 เกิดเป็นสารประกอบที่ขาดคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ kinase มีผลขัดขวางการรวมตัวของ CDK4 และ CDK6 กับ cyclin D

หลักฐานทางชีวเคมีพบว่า ยีน *P16* อาจเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญในการทำงานของวัฏจักรเซลล์ และมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็งชนิดหนึ่ง จากการศึกษาโดยการเติมยีน *P16* เข้าไปในเซลล์มะเร็งของมนุษย์หลายชนิดโดยไม่คำนึงถึงว่าเซลล์นั้นจะมีหรือไม่มีคุณสมบัติของยีน *P16* พบว่าสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งหยุดการแบ่งตัวได้ในระยะ G1/S การทำงานของยีน *P16* ขึ้นกับยีน *pRB* โดยพบว่าถ้าเซลล์ไม่มีการทำงานของยีน *pRB* แม้ว่าจะเติมยีน *P16* เข้าไปในเซลล์ก็ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์ได้

ยีน *P16* เป็นยีนที่คล้ายกับเป็นสำเนาของยีน *P16* โดยมีส่วนประกอบเป็น E1 และ E2 ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของยีน *P16* ในมนุษย์พบว่ายีน *P16* เเบด้าผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 13.8 กิโลคาลตัน ซึ่งโปรตีนอาจมีบทบาทในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ เมื่อสอดใส่ยีนนี้เข้าไปในเซลล์มะเร็งศีรษะและคอชนิด squamous cell carcinoma และเซลล์ HeLa พบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งและมีสัดส่วนของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นในระยะ G1 แสดงว่าเซลล์หยุดการเติบโตในระยะ G0/G1 ต่อมาเมื่อมีการพบ polyclonal antibody ต่อยีน *P16* ทำให้ยืนยันแน่ชัดว่าวัฏจักรเซลล์หยุดการทำงานเนื่องจากยีนชนิดนี้ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 15.8 กิโลคาลตันไปยับยั้งการเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์ที่ขาดการทำงานของ *pRB* ยีน *P16* สามารถทำงานยับยั้งการเติบโตของเซลล์ได้ ดังนั้นการทำงานของยีน *P16* จึงเป็นอิสระไม่ขึ้นกับยีน *P16* และ *pRB* ข้อมูลในปัจจุบันนี้ดูเหมือนว่ายีน *p16* ทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งชนิดหนึ่ง โดยมีวิถีทางของยีน *P16* อาจเป็นไปได้ว่ายีน *P16* ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเติบโตของเซลล์อีกชนิดหนึ่ง

#### วิถีทางของยีน *P16* cyclin D1 และโปรตีน RB(*p16/cyclinD1/pRB pathway*)

วิถีทางของยีน *P16* cyclin D1 และโปรตีน pRB มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งในมนุษย์หลายชนิด จากหลักฐานทางพันธุกรรมพบว่ายีน *P16* CDK4 CDK6 cyclin D1 และโปรตีน pRB มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็ง ยีน *pRB* เป็นยีนควบคุมการเกิดมะเร็งชนิด retinoblastoma และมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer) cyclin D1 บนโครโมโซมคู่ที่ 11q13 มีการเพิ่มจำนวนและการแสดงออกในมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งศีรษะและคอ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับชนิดเฮปาโตเซลล์ลูต้าคาร์ซิโนมา cyclin D1 ก็มีส่วนในการเกิดมะเร็ง จากข้อมูลในหนูทดลองที่ตัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ cyclin D1 อย่างมาก พบว่าเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุท่อน้ำนมและมะเร็งเต้านม ในทางตรงข้ามถ้ากำจัด cyclin D1 ในหนูทดลองพบว่าการเติบโตของเต้านมผิดปกติไป การเพิ่มจำนวนของ CDK4 และ CDK6 อาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งก็เป็นได้ CDK4 อยู่บน

โครโมโซมคู่ที่ 12q13 จากหลักฐานที่พบว่าเมื่อมีการกลายพันธุ์ทำให้เกิดมะเร็งชนิด glioma ที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้และมีการเพิ่มจำนวนของ CDK4 ในมะเร็งชนิด sarcoma และ glioma ทำให้เชื่อว่า CDK4 อาจมีบทบาทในการเกิดมะเร็ง

ยีน *P16* เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง การสูญเสียของโปรตีน *P16* หรือโปรตีน *RB* มีผลให้ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ได้ ในทางตรงข้ามการเพิ่มจำนวนของ cyclin D1 หรือ CDK ทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของ *pRB* และยับยั้งการทำงานของยีน *P16* บางทีวิถีทางของยีน *P16* cyclin D1 และโปรตีน *pRB* อาจเทียบเท่าวิถีทางของยีน *P53* ในมะเร็งของทางเดินอาหารและทางเดินหายใจเช่น มะเร็งปอด มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งศีรษะและคอ พบว่าเกือบร้อยละ 100 ที่ก้อนมะเร็งปฐมภูมิมีความผิดปกติไม่ส่วนใดก็ส่วนหนึ่งของวิถีทางของยีน *P16* cyclin D1 และ โปรตีน *pRB* ในเซลล์ปกติความสัมพันธ์ระหว่าง *pRB* และยีน *P53* พบว่าถ้าเซลล์ถูกขวางกั้นในส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีทางของยีน *p16* cyclin D1 และโปรตีน *pRB* มีผลให้เซลล์หยุดการเติบโตแล้วชักนำให้เกิดการตายของเซลล์โดยผ่านทางกลไกของยีน *P53* แต่ถ้าเซลล์ขาดการทำงานของยีน *P53* พบว่าเซลล์ไม่สามารถควบคุมการเติบโตของเซลล์ต่อไปได้

#### บทบาททางชีววิทยาของยีน *P16*

แบบจำลองการเติบโตของเซลล์มะเร็งมีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของยีนและพยาธิวิทยาของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาเบื้องต้นของแบบจำลองการเติบโตของเซลล์มะเร็งของศีรษะและคอ และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบว่ามี การสูญเสียของโครโมโซมคู่ที่ 9p21 ตั้งแต่เริ่มแรกของการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบได้บ่อยว่ารอยโรคก่อนเกิดมะเร็ง (pre-malignant lesions) ก็มีการสูญเสียการทำงานของยีน *P16* ด้วย ดังนั้นถ้า ยีน *P16* ทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็งเสียการทำงานไปจะมีผลให้เกิดเซลล์มะเร็งตามมา ยีน *P16* จึงอาจมีบทบาทเป็นยามเฝ้าประตู (gate keeper) เพื่อป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับยีน adenomatous polyposis coli ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็งชนิดหนึ่งเมื่อเกิดการสูญเสียการทำงานร่วมกับการกระตุ้นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) ก็จะทำให้เกิดมะเร็งถ้าได้ใหญ่ แต่ความเป็นจริงแล้วปัจจุบันนี้ความเข้าใจในการทำงานของยีน *P16* ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน จากการศึกษาเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองทำให้เชื่อว่ายีน *P16* อาจเป็นส่วนหนึ่งในการควบคุมการทำงานของเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ fibroblast ของมนุษย์ในหลอดทดลองพบว่าเมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนสักระยะหนึ่งเซลล์จะหยุดการเติบโต ตรวจพบว่าระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนของยีน *P16* และระดับ cyclin D1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์มะเร็งเมื่อมีการสูญเสียการทำงานของยีน *P16* อาจนำไปสู่การเป็นอมตะของเซลล์ (immortalization) ซึ่งมีข้อมูลยืนยันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งของระบบทางเดินปัสสาวะมนุษย์พบว่าเมื่อเซลล์หยุดแบ่งตัวจะมีระดับโปรตีน *p16* สูงขึ้น แต่เมื่อเซลล์สูญเสียการทำงานของยีน *P16* เซลล์เหล่านี้จะเป็นอมตะและมีการแบ่งเซลล์ต่อไปเรื่อย ๆ จากการศึกษาเซลล์

สปีพันธุ์ของหนูทดลองก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เมื่อกำจัดยีน *P16* ในเซลล์สปีพันธุ์ของหนูทดลองพบว่าหนูสามารถเจริญเติบโตโดยปกติและไม่มี ความพิการ ทำให้ยืนยันว่ายีน *P16* ไม่มี ความจำเป็นในการเติบโตและการพัฒนาของอวัยวะของหนูทดลอง แต่เมื่อเลี้ยงหนูต่อมาพบว่าหนูเหล่านี้เกิดมะเร็งตั้งแต่อายุน้อยและมีความไวสูงในการเกิดมะเร็งเมื่อได้รับสารก่อมะเร็งเช่น dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) หรือแสงอุลตราไวโอเลตชนิดบี

ทำไมมะเร็งหลายชนิดจึงสูญเสียการทำงานของยีน *P16* ข้อมูลปัจจุบันนี้สนับสนุนบทบาทของยีน *P16* ในการชะลอการทำงานของวัฏจักรเซลล์ ภายหลังจากเกิดมะเร็งแล้วอาจมีปัจจัยบางอย่างเป็นตัวกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *P16* และโปรตีน p16 เริ่มมีการสะสมภายในเซลล์แต่ก็ยังไม่ทราบปัจจัยนี้คืออะไร สันนิษฐานว่าการทำงานของยีน *P16* เริ่มต้นจากมีปัจจัยที่ทำอันตรายต่อดีเอ็นเอไม่รุนแรงเช่น การสัมผัสสารก่อมะเร็ง หรือการได้รับแสงอุลตราไวโอเลตชนิดบี แล้วมีการทำงานของโปรตีน p16 ทำให้เซลล์หยุดการเติบโตในระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมความผิดปกติของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นหรือถ้าความเสียหายที่เกิดขึ้นต่อดีเอ็นเอมีมากก็อาจชักนำให้เซลล์ตายไป (apoptosis) การทำงานของยีน *P53* มีความแตกต่างจากยีน *P16* ตรงที่ยีน *P53* ตอบสนองต่ออันตรายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเออย่างรุนแรง จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่ามะเร็งที่สูญเสียการทำงานของยีน *P16* มักเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นจากการสัมผัสสารก่อมะเร็งยาวนานเช่น มะเร็งปอด มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งศีรษะและคอ มะเร็งตับอ่อน และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ดังนั้นมะเร็งเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ไม่สามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้

จากข้อมูลต่าง ๆ ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *P16* เป็นยีนด้านมะเร็งชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในมะเร็งหลายชนิด คำถามสำคัญที่ยังไม่มีคำตอบในขณะนี้ก็คือการสูญเสียการทำงานของยีน *P16* เกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง (pre-malignant lesion) หรือไม่ และมีปัจจัยอะไรที่ควบคุมการแสดงออกและควบคุมการทำงานของยีน *P16* นอกจากนี้ยีน *P16* มีบทบาทในการเกิดมะเร็งหรือไม่ ในอนาคตถ้ามนุษย์ทราบการทำงานของยีน *P16* นี้มากขึ้นก็อาจเป็นไปได้ว่ามนุษย์อาจมีวิธีการรักษามะเร็งด้วยวิธีใหม่เพิ่มขึ้น

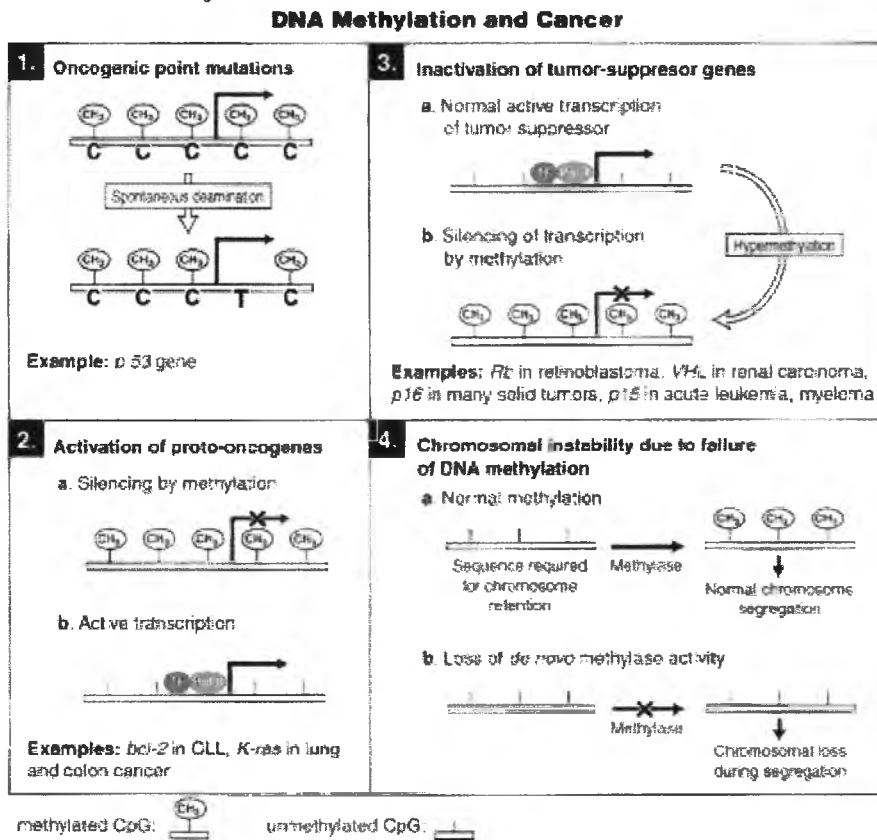
#### บทบาทของ DNA methylation ในกลไกการเกิดมะเร็ง (oncogenesis)

ขบวนการ DNA methylation มีบทบาทชัดเจนและสำคัญในการควบคุมเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีบทบาทอย่างมากในขบวนการการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ขบวนการ DNA methylation ไม่เพียงแต่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในเซลล์ปกติของสิ่งมีชีวิต เช่น การยับยั้งการแสดงออกของยีนบนโครโมโซม X ในผู้หญิง ยังมีบทบาทสำคัญในขบวนการเกิดโรคมะเร็งซึ่งเป็นผลจาก DNA methylation ที่ผิดปกติ ดังจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

บทบาทของขบวนการ DNA methylation ในกลไกการเกิดมะเร็ง (oncogenesis) ได้มีการตั้งสมมติฐานมานานหลายปี การศึกษาจำนวนมาก พบว่า มีความผิดปกติในบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ methyltransferase ของดีเอ็นเอ (aberrations in DNA methyltransferase activity) ในเซลล์มะเร็ง<sup>31-33</sup> ภายในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป (transformed cells) มักจะมีความผิดปกติดังนี้

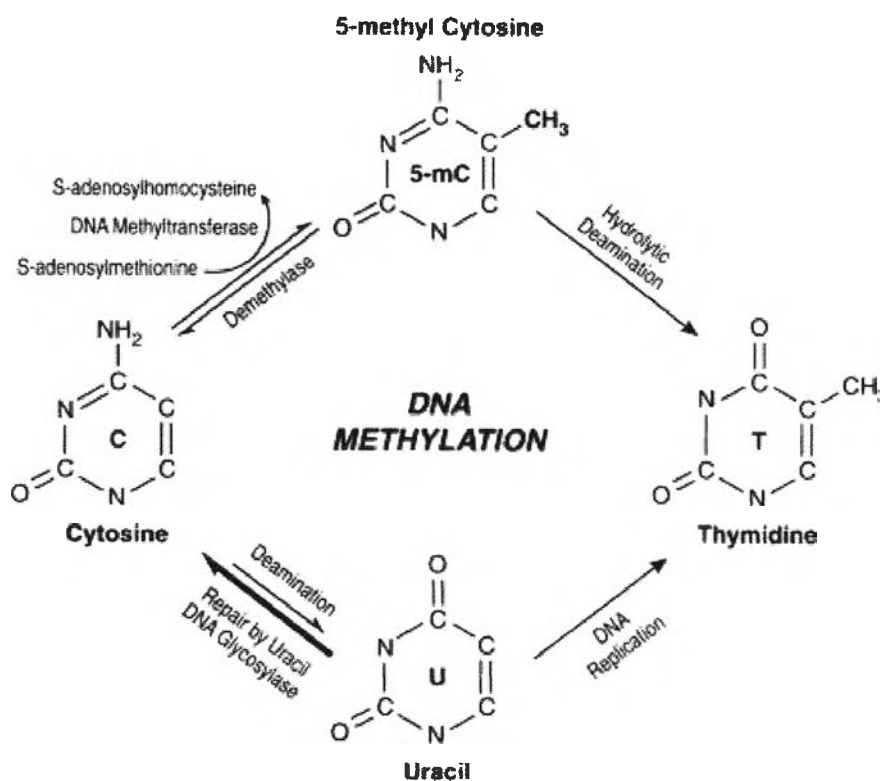
- (1) มีการเพิ่มขึ้นของบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ methyltransferase ของดีเอ็นเอ (DNA-MTase activity)
- (2) มีการสูญเสียอย่างกว้างขวางของการเมทิลเลชัน (widespread loss of methylation) จากตำแหน่งเมทิลเลชันตามปกติ และ
- (3) มีการเกิด hypermethylation หลายตำแหน่งของดีเอ็นเอ<sup>34</sup>

บทบาทสำคัญของ DNA methylation ในการก่อมะเร็ง (oncogenesis) เกิดขึ้นจากกลไกหลายอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ภาพจำลอง (Models) ของกลไกแบบต่างๆของการเกิด cytosine methylation ที่สามารถ promote การเกิดมะเร็งได้ (oncogenesis)

1. การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก C ไปเป็น T (Signature C→T mutation) ในเซลล์มะเร็ง อัตราการเปลี่ยนแปลงอย่างสูงของ cytosine residues ภายใน dinucleotide CpG ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายสำคัญของเอนไซม์ DNA-Mtase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จาก C ไปเป็น T ในอัตราที่สูง (cytosine to thymine transitions) ซึ่งเป็นผลที่ตามมาจากการ hydrolytic deamination ของ 5-mC<sup>35</sup> (ดังรูปที่ 2.6) กลไกการเปลี่ยนแปลง (mutation) นี้เริ่มแรกตรวจพบใน prokaryotic systems<sup>36</sup>



รูปที่ 2.6 แสดงภาพรวมของวิถีทางชีวเคมี (biochemical pathways) ของการเกิด cytosine methylation การเกิด demethylation และการเกิด mutagenesis ของ cytosine และ 5-mC

cytosine ที่ยังไม่ถูกเมทิลเลต (unmethylated cytosine) สามารถเข้าสู่ขบวนการ deamination กลายเป็น uracil ได้ด้วย แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ Uracil-DNA glycosylase มีความสามารถเพียงพอในการซ่อมแซม G:U แต่จะไม่สามารถซ่อมแซม G:T mismatch ได้<sup>37</sup> อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ DNA-MTase อาจยับยั้งการซ่อมแซมนี้ได้ โดยช่วยทำให้เกิดการส่งผ่านจาก C→U→T (C→U→T transition) เอนไซม์ DNA-MTase อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก 5-mC→T (5-mC→T transition) ที่ตำแหน่งของ CpG dinucleotides ภายในได้สถานการณ์บางอย่างที่มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของเอนไซม์ DNA-Mtase หรือการลดลงของระดับของสาร S-adenosylmethionine ภายในเซลล์<sup>38</sup>

ตัวอย่างที่ชัดเจนของขบวนการนี้ว่านำไปสู่การเกิดเป็นมะเร็งได้อย่างไร ได้แก่ ยีนต้านมะเร็ง *p53* การเปลี่ยนแปลงกลายพันธุ์ของยีน *p53* เกิดขึ้นมากกว่าร้อยละ 50 ของมะเร็งในมนุษย์ (human solid tumors)<sup>39</sup> ประมาณร้อยละ 24 ของการเปลี่ยนแปลงกลายพันธุ์เหล่านี้เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงจาก C→T (C→T transitions) ที่ตำแหน่ง CpG dinucleotides บ่งชี้ว่า DNA methylation อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงกลายพันธุ์เหล่านี้<sup>40</sup>

## 2. DNA hypomethylation ในมะเร็ง

การลดลงของระดับ methylation ภายในยีน โดยรวมเป็นสิ่งที่พบบ่อยมากในกลไกการเกิดมะเร็ง (tumorigenesis)<sup>41</sup> การลดลงนี้มักจะเกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นก่อนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งอย่างชัดเจน (frank tumor formation)<sup>42-43</sup> นอกจากการลดลงของระดับ methylation ภายในยีน โดยรวม (overall genomic hypomethylation) แล้ว ยีนมะเร็งที่เฉพาะ (specific oncogenes) ก็ตรวจพบว่ามี การเกิด hypomethylate ได้ในมะเร็งที่เกิดกับมนุษย์ ความสัมพันธ์ที่ไปด้วยกันอย่างดีระหว่างการเกิด methylation ภายในยีนกับ การแสดงออกของยีน (gene expression) ตรวจพบได้ในยีนบางอย่าง เช่น ยีน *bcl-2* ที่เกี่ยวข้องกับ antiapoptotic ในมะเร็ง B-cell chronic lymphocytic leukemia<sup>44</sup> และยีน *k-ras* proto-oncogene ในมะเร็งปอดและมะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>45</sup>

## 3. Hypermethylation ของยีนต้านมะเร็ง (tumor-suppressor genes)

นอกจากกลไกที่เกิดจาก point mutations และ gene deletions แล้ว การกดการทำงานของ ยีน (transcriptional repression) ยังเกิดจากกลไกการ hypermethylation ของ promoter sequences บ่งชี้ว่า hypermethylation เป็นหนทางหนึ่งที่ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีนต้านมะเร็ง (tumor-suppressor genes) ในโรคมะเร็ง สิ่งนี้อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ DNA-Mtase ซึ่งพบในมะเร็งหลายชนิด<sup>31</sup> หรืออาจเป็นผลจากเหตุการณ์บางอย่างที่ทำให้การ transcription ของ ยีนต้านมะเร็งหยุดพักไปชั่วคราว

ยีน retinoblastoma (Rb) เป็นยีนแรกที่เป็นตัวอย่างที่ชัดเจนว่ามี CpG island hypermethylation เกิดขึ้นโดยจากการศึกษาหนึ่ง พบ 3 รายใน 21 รายที่เป็น sporadic<sup>46</sup> และ 5 รายใน 32 รายในอีกการศึกษาหนึ่ง<sup>47</sup> ทั้ง 7 ราย มีการเกิด hypermethylation ของ CpG islands ที่ตำแหน่งปลายส่วน 5' ของยีน Rb ในเวลาต่อมาเมื่อมีการศึกษาในห้องทดลอง ที่แสดงให้เห็นว่า การ methylation ของบริเวณ promoter region ของยีน Rb ทำให้มีการยับยั้ง promoter activation โดยตรง<sup>48</sup>

การยับยั้งการทำงานของยีน von Hippel-Lindau (VHL) เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงใน เซลล์ของร่างกายที่เกิดขึ้นภายหลัง (somatically acquired mutations) ใน one copy ของยีน VHL ควบคู่ไปกับการสูญเสีย second allele ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบตั้งแต่แรกในมะเร็งของไคชนิด clear-cell ที่

เกิดขึ้นเอง<sup>49</sup> Herman และคณะ<sup>50</sup> พบว่า hypermethylation ของยีน VHL ที่ CpG island และมีการสูญเสียการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นไปพร้อมกัน (concomitant lack of expression) ในผู้ป่วย 5 ราย ใน 26 ราย ที่เป็น sporadic form ของมะเร็งของไตชนิด clear cell แต่ไม่มีการเกิด intragenic mutations ภายในยีนนี้เลย การรักษาของโรคมะเร็งไตชนิด clear cell ใน cell line ด้วย 5-deoxyazacytidine ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่แรงมากต่อเอนไซม์ DNA-Mtase เป็นผลทำให้มี demethylation เกิดขึ้นและทำให้มีการแสดงออกของยีน VHL ขึ้นมาใหม่ได้

โปรตีนสำคัญที่สุดตัวหนึ่งในการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle regulatory proteins) คือโปรตีน P16 (ซึ่งมีชื่อเรียกอีกหลายชื่อ ได้แก่ MTS-1 หรือ major tumor suppressor 1 และ INK4a สำหรับ Inhibitor of cyclin-dependent Kinase 4a และ CDKN2a for Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2a) ผลทางชีวเคมีที่สำคัญของ p16 คือ หยุดการเคลื่อนไปของวัฏจักรของเซลล์ที่ระยะ G1/S และการสูญเสียหน้าที่การทำงานของ p16 อาจนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์จนกลายเป็นมะเร็งในที่สุด<sup>51</sup> การเปลี่ยนแปลงของยีนที่พบบ่อยใน cell lines ของมะเร็งและในมะเร็งปฐมภูมิที่ยังไม่ลุกลามมาก คือ loss of heterozygosity (LOH) ของโครโมโซม 9p21 ซึ่งมีทั้งยีน p16 และ ยีน p15 อยู่

ในการศึกษาในมะเร็งส่วนใหญ่ พบว่า ที่ตำแหน่ง CpG island ในส่วนปลาย 5' ของยีน p16 เป็นตำแหน่งที่มีการ methylation เกิดขึ้นบ่อยและการรักษาเซลล์มะเร็งที่มีการเกิด hypermethylation นี้ด้วย 5-azacytidine มีผลกระตุ้น transcription ของยีนได้<sup>52-53</sup> การเกิดขึ้นไม่ว่าทั้งการหายไปของ coding region หรือการมี promoter hypermethylation ของยีน p16 พบว่า มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดมีการเปลี่ยนแปลงของยีน Rb (mutations) ในมะเร็งหลายชนิด<sup>34</sup> สิ่งที่น่าสนใจ คือ ในบางครั้งการเกิดมี p16 promoter hypermethylation อาจเป็นเหตุสำคัญอันเดียวที่ยับยั้งการทำงานของ alleles ทั้งสองของยีนนี้ และอาจเป็นสิ่งผิดปกติอันเดียวที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียการทำงานในวิถีทางของ cyclin D-Rb<sup>34</sup> ในมะเร็งลำไส้ใหญ่ แม้จะพบว่าส่วนใหญ่จะมีการขาดหายไปของยีนบริเวณ 9p คือ มีการเกิด homozygous deletions ของยีน p16 หรือการมีการเปลี่ยนแปลงของยีน Rb (mutations)<sup>54</sup> แต่ร้อยละ 30-40 พบว่าเกิด hypermethylation ของยีน p16<sup>53</sup> การยับยั้งการทำงานของยีน p16 โดยผ่านขบวนการ hypermethylation พบบ่อยในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งของสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งศีรษะและคอ และมะเร็งปอดชนิด non-small-cell รวมทั้งในมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin's lymphoma ชนิด high grade<sup>34</sup>

ยีน P15 หรือ ยีน INK4b เป็นตัวยับยั้งของ cyclin-dependent kinases ได้แก่ CDK4 และ CDK6 และมีบทบาทในการตอบสนองต่อการยับยั้ง transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ -mediated growth inhibition responses)<sup>55</sup> การยับยั้งการทำงานของยีน p15 ผ่านขบวนการ methylation พบบ่อยในมะเร็งระบบโลหิต (hematopoietic neoplasms) เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิด acute myelogenous leukemia และชนิด acute lymphoblastic leukemia และมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด

Burkitt's lymphoma<sup>34</sup> ถ้าสุดท้ายยังตรวจพบ hypermethylation ของยีน p15 ในกลุ่มโรค myelodysplastic syndromes<sup>56</sup> และ hypermethylation ของทั้งยีน p15 และ p16 ในมะเร็ง multiple myeloma<sup>57</sup>

#### 4. Induction of chromosomal instability

Lengauer และ คณะ<sup>58</sup> ได้ริเริ่มการศึกษาเรื่อง exogenous CpG-rich sequences ในลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับไวรัส ที่มีชื่อว่า retrovirally contained  $\beta$ -galactosidase gene ในเซลล์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่ 10 cell lines พบว่า 5 ใน 10 cell lines ไม่แสดงออกของการทำงานของยีน  $\beta$ -gal และพบว่าเซลล์เหล่านี้มีความบกพร่องในเรื่องการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่จับคู่ผิดพลาดไป (mismatch activity repair)(MMR-) ในขณะที่เซลล์ที่เหลืออื่นๆที่ไม่มีความบกพร่องนี้(MMR+) สามารถแสดงออกซึ่งการทำงานของยีน  $\beta$ -gal

ในเซลล์ที่มีความบกพร่อง MMR(MMR-) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ methylation (methylation proficient) (MET+) ส่วนเซลล์ที่ MMR+ พบว่ามีความบกพร่องของ methylation (methylation deficient)(MET-) (โดยอาศัยวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ Southern blot analysis) และสามารถกระตุ้นให้เกิด methylation อีกครั้งโดยใช้ 5-azacytidine (5-azacytidine-induced reactivation) ต่อยีน  $\beta$ -gal สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มี mismatch repair proficient จะมี ความบกพร่องใน methylation(MET-) เป็นผลโดยตรงต่อการได้มาและการขาดหายไปของโครโมโซมทั้งหมด นำไปสู่ genomic instability และการเกิดมะเร็งต่อมา ตรงกันข้ามในเซลล์ที่ MMR- และมี methylation ตามปกติ เซลล์จะเกิด genomic instability โดยหนทางอื่น(alternative pathway)ของ ความบกพร่องของ mismatch repair<sup>59</sup> เช่นเดียวกับการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ hypomethylation ในการเกิด chromosomal instability ซึ่งเป็นการศึกษาโดย Chen และคณะ<sup>60</sup>

การศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมในเวลาต่อมาที่สนับสนุนสมมติฐานเกี่ยวกับ DNA methylation โดย Feinberg และคณะ<sup>61</sup> ได้แสดงให้เห็นว่า โดยเฉลี่ยจะมีการลดลงของ genomic 5-mC content คิดเป็นร้อยละ 8 และร้อยละ 10 ใน adenomas และมะเร็ง adenocarcinomas ของลำไส้ใหญ่ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างเนื้องอก(benign) และมะเร็ง (malignant tumors) ที่น่าสนใจ คือ ผู้ป่วยสามรายที่มี 5-mC content สูงที่สุดในเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ(normal colon) พบว่าเป็นกลุ่มอาการ Lynch syndrome (HNPCC) ซึ่งพบในเวลาต่อมาว่าเป็นชนิด MMR- phenotype<sup>61</sup>

การศึกษาล่าสุดการศึกษาหนึ่งเกี่ยวกับ methylation พบว่า มีการเกิดขึ้นทั้ง methylation บนส่วนกว้างของ genome (genome-wide under methylation) การเพิ่มจำนวนขึ้นของ retroviral element(retroviral element amplification) และการสร้างแบบตัวอย่างใหม่ของโครโมโซม(chromosome remodeling) ใน interspecific mammalian hybrid (*Macropus eugenii* × *Wallabia bicolor*) ส่วนของ centromeres ที่เปลี่ยนแปลงยาวออกไป(atypically extended centromeres) ของโครโมโซมชนิดที่เป็น autosomes ของ *Macropus eugenii* จะประกอบด้วย amplified retroviral



elements ที่ไม่ถูก methylated จะไม่สามารถตรวจพบได้ใน parental species แสดงให้เห็นถึงความล้มเหลวของขบวนการ DNA methylation<sup>62</sup>

ขบวนการ DNA methylation มีบทบาทชัดเจนและสำคัญในการควบคุมเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง(vertebrates) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีบทบาทมากในการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ในปัจจุบันพบหลักฐานจากการศึกษามากมายว่า DNA methylation มีบทบาทสำคัญมากในการ silencing ของยีนเฉพาะบางอย่าง (specific genes) ระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ (development and cell differentiation) การเปลี่ยนแปลงภายใน (intrinsic mutagenicity) ของ 5-mC การกระตุ้นยีนที่เป็น proto-oncogenes ผ่านขบวนการ hypomethylation การยับยั้งการ transcription ของยีนต้านมะเร็ง (tumor-suppressor genes) ผ่านขบวนการ hypermethylation และความบกพร่องในการแยกตัวของโครโมโซม (chromosomal segregation) เนื่องจากความผิดพลาดในการ methylation เอง (de novo methylation) อาจทำให้เกิดมะเร็งตามมา ดังนั้นการปรับเปลี่ยนขบวนการ DNA methylation อาจมีความสำคัญในทางการแพทย์ (clinical implications) ในการป้องกันการเกิดมะเร็งและการรักษามะเร็ง

ในการพัฒนากลยุทธ์ในการรักษาเพื่อให้การรักษามีความปลอดภัยและได้ผลดี จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ methylation และ demethylation ให้เข้าใจถ่องแท้เสียก่อน การศึกษาในขณะนี้ พบว่าขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของยีน (gene regulation) โดยรวมมีอยู่ 2 กลไกหลัก คือ ขบวนการ DNA methylation และขบวนการ histone deacetylation การศึกษาต่อไปที่จำเป็น ได้แก่ ความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์อันสลับซับซ้อนระหว่างเอ็นซัยม์ methyltransferases เอ็นซัยม์ demethylases โปรตีนที่จับกับ methyl cytosine (methyl cytosine binding proteins) กับขบวนการ histone acetylation และการ transcription ของยีน

### เทคนิคในการตรวจเกี่ยวกับ DNA methylation<sup>63</sup>

เทคนิคที่เริ่มต้นใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับขบวนการ DNA methylation ที่ตำแหน่งเฉพาะ (site-specific DNA methylation) นั้นอาศัยพื้นฐานความรู้เรื่องความสามารถของเอ็นซัยม์ชนิด restriction enzymes ชนิดที่ 2 (inability of methylation-sensitive type II restriction enzymes) ในการตัด (cleave) บริเวณ sequences ที่ประกอบด้วย CpG ที่มี methylated เกิดขึ้นหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่งร่วมกับวิธี Southern hybridization แต่วิธีการนี้ต้องการปริมาณดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงในปริมาณมากในการตรวจค้น methylation ที่เกิดขึ้นเพียงไม่มาก (few percent) บน alleles และบอกข้อมูลแค่เพียงว่ามีตำแหน่งของ CpG ที่มี methylation เกิดขึ้นใน sequence ที่ตัดโดยเอ็นซัยม์ methylation-sensitive restriction enzymes

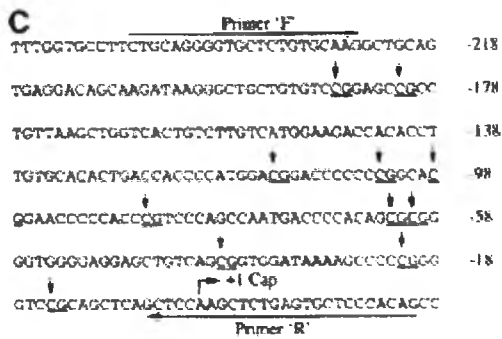
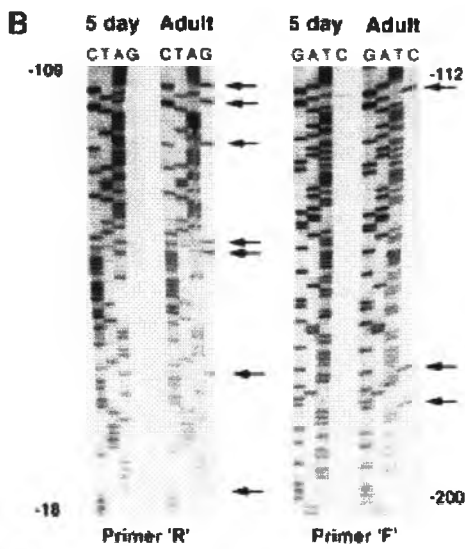
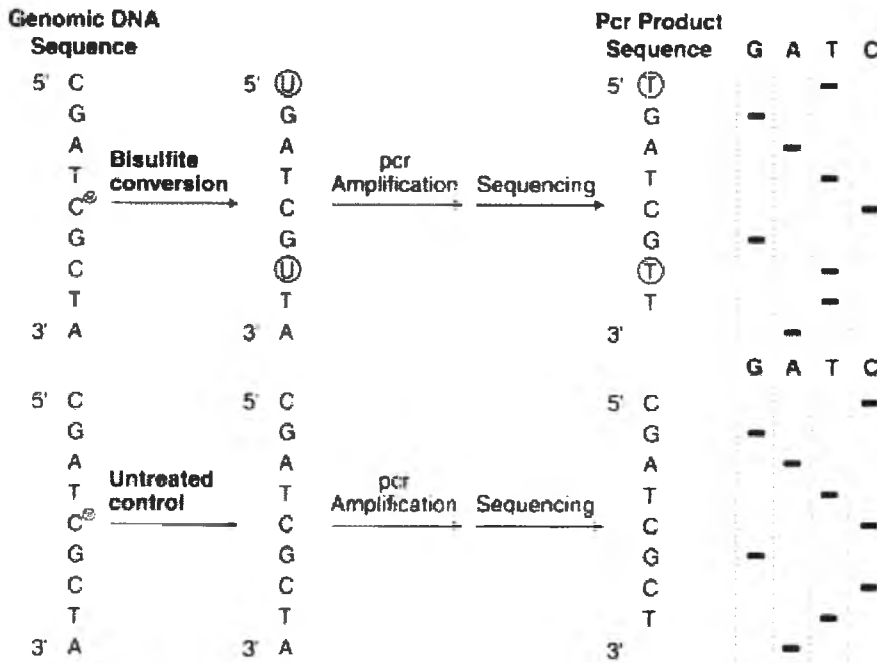
Singer-Sam และคณะ ได้พัฒนา ความไวในการตรวจค้น methylation โดยใช้เอนไซม์ restriction enzymes ร่วมกับวิธีการของ polymerase chain reaction (PCR) หลังจากมีการตัด (cleaving) ดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ methylation-sensitive restriction endonucleases เช่น *Hpa* II แล้ว จะมีการใช้ขบวนการ PCR amplification ด้วย specific primers ประกบข้างหรือจับกับ restriction site ซึ่งการจับหรือประกบนี้จะเกิดขึ้นต่อเมื่อการตัดดีเอ็นเอ(DNA cleavage)นั้นมีการป้องกันด้วย ขบวนการ methylation อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ คล้ายคลึงกับวิธีSouthern-based ที่สามารถตรวจค้น เพียงว่ามีตำแหน่งของ CpG ที่มี methylation เกิดขึ้นใน sequence ที่ตัดโดยเอนไซม์ methylation-sensitive restriction enzymes เท่านั้น นอกจากนี้ ผลบวกดวง (false-positive result) อาจเกิดขึ้นได้ จากการย่อยดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ของ restriction enzyme

วิธีการที่ใช้ในการตรวจ (genomic sequencing protocols) ที่ใช้ในการศึกษา DNA methylation ก่อนหน้านี้โดย Maxam และ Gilbert คือการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการตัดดีเอ็นเอ (chemical cleavage reactions) ร่วมกับเทคนิค PCR ที่เรียกว่า linker-mediated PCR (LMPCR) ในการเพิ่ม หรือ enhance signal เทคนิคนี้อาศัยพื้นฐานข้อมูลที่ว่า 5-mC จะไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ระหว่างการทำปฏิกิริยามาตรฐานของ Maxam และ Gilbert ข้างต้น ดังนั้น 5-mC จะถูกตรวจพบได้ใน sequencing gel โดยไม่มีแบนด์ที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับผลิตภัณฑ์(lack of a band that corresponds to a cleavage product) ของปฏิกิริยา cytosine degradation ซึ่งเทคนิควิธีการนี้พบว่าให้ผลทั้งผลบวก (false-positive) และผลลบดวง(false-negative)

การศึกษาโดย Frommer และคณะ โดยใช้วิธีการตรวจที่อาศัยพื้นฐานเรื่องปฏิกิริยา bisulfite-induced oxidative deamination ของดีเอ็นเอ(genomic DNA) ภายใต้ง่อนไขว่า cytosine จะถูกเปลี่ยนไปเป็น uracil ส่วน 5-mC จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากนั้น sequence ที่เป็นเป้าหมายจะถูกเพิ่มจำนวน(amplified) โดยวิธีPCR ที่ใช้ strand-specific primers บน sequencing ของดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นนั้น uracil และ thymine ที่มีอยู่จะตรวจพบเป็น thymine ทั้งหมด และจะเพียงแต่ 5-mC ที่เหลืออยู่เท่านั้นที่ตรวจพบเป็น cytosines วิธีการนี้ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในปัจจุบันและใช้ในการศึกษานี้

การตรวจวิธีนี้มีความรวดเร็วในการตรวจค้น5-mCที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยา bisulfite deamination ร่วมกับ PCR amplification การตรวจนี้มีความเหมาะสมในการตรวจค้น CpG dinucleotides ที่มีจำนวนจำกัดซึ่งพบได้ทั้งภายใน หรือข้างๆ PCR primer sequences และ ภายใน restriction enzyme recognition sequence

### A Determination of Cytosine Methylation by Bisulfite Conversion Genomic Sequencing



รูปที่ 2.7 (A) รูปแสดงขั้นตอนในการตรวจค้น methylation ของ cytosines ภายใน DNA sequence ที่รู้จักโดยวิธี bisulfite conversion (B) รูปแสดงในสิ่งมีชีวิต (In vivo) เกี่ยวกับการเกิด methylation

ของ CpG dinucleotides ของ rho promoter ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่และลูกไก่ที่มีอายุ 5 วัน โดยใช้วิธี bisulfite conversion ถูกสรุปแสดงให้เห็น methylated cytosines และพบแต่ในเซลล์ของไก่ที่โตแล้ว(adult erythroid cells) ส่วนตัวเลขแสดงถึงตำแหน่งที่ใกล้กับตำแหน่งเริ่มต้นของการ transcription แสดงให้เห็นว่า cytosines ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับ CpG dinucleotides ทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็น thymidines ทั้งในเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่และลูกไก่ที่มีอายุ 5 วัน (C) รูปแสดงการเกิด methylation ของ CpG dinucleotides ของ rho promoter ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่และลูกไก่ที่มีอายุ 5 วัน โดยใช้วิธี bisulfite conversion ถูกสรุปแสดง methylated cytosines และเห็นได้ชัดเจนจากรูป(A) Primers R และ F บ่งชี้ลำดับของ rho globin promoter ที่ใช้สำหรับการออกแบบ primers ภายใน (designating internal primers) และสำหรับการ sequencing<sup>63</sup>

### วิธีการตรวจ Methylation-Specific PCR

วิธีการตรวจ Methylation-Specific PCR เป็นการตรวจที่มีความจำเพาะมาก มีความไวมาก ทำได้รวดเร็ว และไม่แพง ในการตรวจหา methylation จากตัวอย่างดีเอ็นเอ แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอจะถูกเปลี่ยนแปลงไปโดย การเติม bisulfite เพื่อเปลี่ยนแปลง cytosine ที่ไม่ถูก methylated ให้เป็น uracil ส่วน cytosine ที่ถูก methylated จะไม่เปลี่ยนแปลงไป ขั้นตอนในการตรวจมีดังนี้

#### ขั้นตอนการเตรียม bisulfite-modified DNA

1. ใช้สารละลาย hydroquinone ที่มีความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อ 5 ซีซีของน้ำที่จัดเตรียมไว้ นำมาเจือจางลง 1 ต่อ 10 (hydroquinone เป็น antioxidant ที่ใช้ป้องกัน ปฏิกิริยา oxidation ระหว่างขบวนการต่อไป)
2. เตรียมสารละลาย bisulfite ที่มีความเข้มข้น 1.88 กรัมต่อ 5 ซีซีของน้ำ นำมาทำให้มีความเป็นด่างมากขึ้นโดยหยดสาร 19.5 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5 หยด(ขบวนการนี้เป็นการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับ bisulfite)
3. เตรียมดีเอ็นเอ 1-2 ไมโครกรัมเจือจางในน้ำ 50 ไมโครลิตร
4. เติมน้ำ 2 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5.5 ไมโครลิตร(ที่เตรียมจาก fresh stock)ลงในข้อ 3.
5. ตั้งไว้(Incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
6. หลังจากนั้น เติมน้ำ สารละลาย hydroquinone ที่เจือจางในข้อ 1. จำนวน 30 ไมโครลิตร และ vortex
7. แล้ว เติมน้ำ สารละลาย bisulfite ในข้อ 2. จำนวน 520 ไมโครลิตร และ vortex

8. แล้วจึงเติมน้ำมัน mineral oil จำนวน 200 ไมโครลิตร(เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ)และตั้งไว้(Incubate) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
9. นำส่วนที่เป็นน้ำมันออกและเติม Wizard™ resin จำนวน 1 ซีซี ลงในแต่ละหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากันอย่างดี(Wizard™ resin จะช่วยแยกดีเอ็นเอออกจากsodium bisulfite ที่มีความเข้มข้นสูงได้)
10. ใส่สารในข้อ 9 ลงในหลอด หรือ syringe ที่ต่ออยู่กับ column ซึ่งยึดอยู่บน vacuum manifold ที่มีทางออกหลายทาง และ apply vacuum
11. ระหว่างที่ปล่อยน้ำออก ด้วยตัว สารละลาย 80% isopropanol จำนวน 2 ซีซี และ apply vacuum ค่อยไปด้วย
12. ระหว่างที่ปล่อยน้ำออก แยกดีเอ็นเอออกจาก column โดยการล้างละลาย(elute) ด้วยน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จำนวน 50 ไมโครลิตร และปั่นหมุน (spin) ใน microfuge ที่ความเร็ว 10000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที (น้ำอุ่นจะช่วยชะล้างละลายดีเอ็นเอที่ถูกเปลี่ยนแปลงแล้วออกจาก resin)
13. หลังจากนั้นเติม สาร 3 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5.5 ไมโครลิตรและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที (กระบวนการนี้กระทำเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ cytosine ให้เป็น uracil อย่างสมบูรณ์)
14. แล้วเติม สาร 10 M NH<sub>4</sub>OAc จำนวน 17 ไมโครลิตร และเอทานอล 95% ปริมาณ 2-3 เท่าของสารละลายรวมในข้อ 13
15. ตั้งทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อให้ตกตะกอน(precipitate)
16. นำมาหมุนเหวี่ยง นาน 25 นาที จากนั้นแยกส่วนที่เป็น supernatant ออกทิ้ง แล้วล้างด้วยเอทานอล 70 %
17. ทำให้แห้งโดยใช้ speed vacuum หลังจากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอจะอยู่สภาพที่พร้อมจะเข้าสู่ขบวนการทำPCR

#### ขั้นตอนการเตรียม PCR mixes

1. ละลาย(thaw) PCR buffer 4dNTP mix และ primers โดยการกำหนดปริมาณแต่ละอย่างที่ใช้และเตรียม master mixes สำหรับการทำให้ PCR reaction ซึ่งประกอบด้วย (1) 1x PCR buffer (2) 2 mM 4dNTP mix (3) sense primer กับ antisense primer 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ (4) Taq DNA polymerase(Perkin-Elmer) 1 unit
2. ใส่ PCR master mixes จากข้อ 18 ลงใน PCR tubes แต่ละหลอด

3. เติม template ของดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพพร้อมที่เตรียมไว้จากข้อ 17 จำนวน 7 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ปริมาณสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร
4. เติมน้ำมัน 1-2 หยด คือ ประมาณ 25-50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดและทิ้งไว้ใน thermal cycler

#### ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน PCR products

1. เริ่มต้นการทำ PCR ด้วยขบวนการ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที
2. เข้าสู่ขบวนการ PCR amplification ด้วยการกำหนด parameters ดังนี้
  - 35 รอบ 60 วินาที 95 องศาเซลเซียส สำหรับการ denaturation
  - 35 รอบ 60 วินาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส สำหรับ primer จำเพาะในการ annealing
  - 35 รอบ 60 วินาที 72 องศาเซลเซียส สำหรับการ elongation
  - 1 รอบ 4 นาที 72 องศาเซลเซียส สำหรับการ elongation เป็นขั้นตอนสุดท้าย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์บน gel

#### ขั้นตอนการวิเคราะห์ PCR products โดย gel electrophoresis

1. เตรียม 27% Agarose gels ที่ nondenaturing ด้วย 1x TBE buffer
2. run แต่ละตัวอย่างบน gel ข้างต้น
3. stain gel ด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพด้วย UV illumination

### ลักษณะทางกายวิภาคและพยาธิสภาพ

#### ลักษณะทางกายวิภาค

โพรงหลังจมูกเป็นช่องรูปสี่เหลี่ยมถูกล้อมรอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ด้านบนและด้านหลัง ล้อมรอบด้วย basisphenoid, basiocciput และกระดูกสันหลังของคอข้อที่ 1 และ 2 ขอบเขตของ โพรงหลังจมูก เริ่มจากฐานกะโหลกศีรษะไปถึง soft palate
2. ด้านข้างของโพรงหลังจมูกมีท่อเชื่อมโยงกับหูส่วนกลางเรียกว่า Eustachian tube ซึ่งจะตรวจพบส่วนนูนของกระดูกอ่อนที่เรียกว่า tour tubarius อยู่ทางด้านหลังของรูเปิดของ Eustachian tube ด้านบนและด้านหลังของ tour tubarius มีช่องเรียกว่า Rosenmuller fossa หรือ lateral pharyngeal recess ซึ่งมักเป็นตำแหน่งที่เกิดของมะเร็งชนิดนี้

### 3. ด้านหน้าของ โพรงหลังจมูก ต่อกับช่องจมูกทาง posterior choaca

นอกจากนี้ โพรงหลังจมูกยังติดต่อกับช่องของฐานของกะโหลกศีรษะ 6 ช่อง ได้แก่ 1. foramen lacerum 2. foramen spinosum 3. foramen ovale 4. hypoglossal canal 5. jugular foramen และ 6. carotid canal ช่องกะโหลกศีรษะเหล่านี้เป็นตำแหน่งที่เส้นประสาทสมองและเส้นเลือดผ่านเข้าออกมาก การที่มะเร็งเกิดที่โพรงหลังจมูกซึ่งอยู่ใกล้เคียงกับช่องติดต่อกับฐานสมองเหล่านี้ทำให้มะเร็งอาจลุกลามเข้าไปในกะโหลกศีรษะด้านในบริเวณของฐานสมองได้ง่ายทำลายหน้าที่การทำงานของเส้นประสาทสมองต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้เกิดอาการและอาการแสดงทางคลินิกของโรคนี

เยื่อผิวของโพรงหลังจมูก ประกอบด้วย mucosal epithelium, lymphoid tissue, และ minor salivary gland เยื่อผิว(mucosal epithelium)มีหลายชนิดประกอบด้วยเยื่อแบบ stratified squamous epithelium แบบ ciliated pseudostratified epithelium และแบบ indeterminate epithelium ในระยะแรกของการเจริญเติบโตเยื่อผิวของโพรงหลังจมูกส่วนใหญ่เป็น ciliated pseudostratified epithelium ต่อมาเปลี่ยนแปลงไปเป็น stratified squamous epithelium เมื่อเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่แล้วพบว่าด้านบนและด้านข้างของโพรงหลังจมูก จะถูกปกคลุมด้วยเยื่อผิวชนิด ciliated pseudostratified epithelium ส่วนด้านหลังจะเป็น stratified squamous epithelium

เซลล์ของต่อมน้ำเหลืองบริเวณโพรงหลังจมูกเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบีลิมโฟไซท์ (B cell lymphocytes) น้ำเหลืองจากบริเวณนี้จะไหลไปสู่ต่อมทั้งสองด้านไปสู่ lateral retropharyngeal nodes of Rouviere โดยที่เส้นน้ำเหลืองจะทอดไปตามหลอดเลือดดำ jugular vein และเส้นประสาท spinal accessory nerve แต่เนื่องจาก lateral retropharyngeal nodes อยู่ลึกในบริเวณด้านหลังของ pharynx เมื่อมะเร็งกระจายมาสู่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณนี้จึงมักจะไม่สามารถตรวจพบอาการทางคลินิก ต้องตรวจเพิ่มเติมเพื่อค้นหาการเติบโตที่ผิดปกติของ retropharyngeal nodes ด้วยเอกซเรย์คอมพิวเตอร์หรือเอกซเรย์สนามแม่เหล็ก ส่วนต่อมน้ำเหลืองอื่น ๆ ที่รับน้ำเหลืองจากโพรงหลังจมูกซึ่งมะเร็งกระจายมาแล้วสามารถตรวจพบได้ทางคลินิกคือ ต่อมน้ำเหลือง jugulodigastric nodes และ ต่อมน้ำเหลือง spinal accessory chain<sup>64</sup>

#### พยาธิสภาพ

การที่โพรงหลังจมูกประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิดอยู่รวมกัน จึงสามารถพบมะเร็งหลายชนิดที่เกิดจากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน<sup>64</sup> ได้แก่

1. มะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด nasopharyngeal carcinoma เกิดจาก epithelium ของโพรงหลังจมูก มักเกิดที่บริเวณ Rosenmuller's fossa มะเร็งของโพรงหลังจมูกส่วนมากจะเป็นมะเร็งชนิดนี้

2. มะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด salivary gland adenocarcinoma เกิดจากเซลล์ของ minor salivary gland บริเวณโพรงหลังจมูก เป็นมะเร็งที่พบน้อยในบริเวณนี้

3. มะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด malignant lymphoma เกิดจาก lymphoid tissue ของโพรงหลังจมูก มักเป็นชนิด B cell และ large cell ในบางครั้ง diffuse large-cell lymphoma จะคล้าย undifferentiated nasopharyngeal carcinoma เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ดังนั้นจึงต้องอาศัยการย้อมพิเศษทาง immunocytochemistry เช่น การตรวจ immunophenotypes หรือตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

4. มะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด sarcoma เนื่องจาก soft tissue เป็นเนื้อเยื่อที่พบได้ทั่วไป ในโพรงหลังจมูกและอาจกลายเป็นมะเร็งชนิด sarcoma ได้ อุบัติการณ์ของ sarcoma บริเวณโพรงหลังจมูกพบน้อยมาก ในเด็กอาจพบ embryonal rhabdomyosarcoma ได้ที่บริเวณ โพรงหลังจมูก

5. มะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด plasmacytoma เกิดจาก plasma cell อาจพบที่โพรงหลังจมูกได้ในผู้ป่วยบางราย

องค์การอนามัยโลกแบ่งมะเร็งของโพรงหลังจมูกชนิด nasopharyngeal carcinoma (NPC) ออกเป็น 3 ชนิดตามลักษณะพยาธิสภาพ<sup>65</sup> ดังนี้

1. Keratinizing Squamous Cell Carcinoma (WHO type 1)
2. Nonkeratinizing Carcinoma (WHO type 2)
3. Undifferentiated Carcinoma (WHO type 3)

เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าพยาธิสภาพทั้ง 3 ชนิด เป็นมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma ต่างกันที่ differentiation ของเซลล์โดยที่ WHO type 1 เป็น well differentiated squamous cell carcinoma ส่วน WHO type 3 เป็น undifferentiated squamous cell carcinoma

1. WHO type 1 carcinoma ประกอบด้วย keratin และ intracellular bridges เป็น well และ moderately differentiated carcinoma มีลักษณะทางพยาธิสภาพเหมือนกับมะเร็งของศีรษะและคอ ชนิด squamous cell carcinoma อื่นๆโดยทั่วไป พบได้ประมาณร้อยละ 20 ของมะเร็ง NPC ในประเทศสหรัฐอเมริกา ไม่มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อไวรัส ebstein-barr<sup>66</sup>

2. WHO type 2 carcinoma ไม่พบหรือพบ keratin เพียงเล็กน้อย มีลักษณะของ squamous cell carcinoma ตั้งแต่เป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature cell) ไปจนถึงเซลล์ที่มีลักษณะแปลกๆ (anaplastic cells) บางครั้งเรียกว่า transitional cell carcinoma เพราะมีลักษณะทางพยาธิสภาพคล้าย transitional cell carcinoma ของกะเพาะปัสสาวะ ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 10 ของมะเร็ง NPC ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยจะสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส epstein-barr ในมะเร็งชนิดนี้ได้มากและผู้



ป่วยจะตรวจพบว่ามี anti-EBV antibodies แสดงว่าการติดเชื้อไวรัสที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเกิดโรค

3. WHO type3 carcinoma มีลักษณะทางพยาธิสภาพหลายอย่างตั้งแต่ lymphoepitheliomatous, anaplastic, clear cell, spindle cell variants ลักษณะที่จำเพาะของมะเร็ง NPC ชนิดนี้คือเป็น undifferentiated หรือ anaplastic carcinoma ที่มี lymphoid infiltrates ในประเทศสหรัฐอเมริกาจะพบพยาธิสภาพชนิดนี้มาก ประมาณร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็ง NPC<sup>64</sup> บางครั้งอาจแยกจากมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด large-cell lymphoma ต้องอาศัย immunocytochemistry หรือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการแยกโรค และมีความเชื่อว่าพยาธิสภาพชนิดนี้เกิดจากเชื้อไวรัส Epstein-Barr เนื่องจากพบ DNA ของไวรัสในเซลล์มะเร็ง และผู้ป่วยมี antibodies ต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้<sup>67</sup>

### พยาธิกำเนิด

โรคมะเร็ง NPC อาจแบ่งตามพยาธิกำเนิดได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Epstein-Barr viral associated NPC ประกอบด้วย WHO ชนิด 2 และ 3 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส Epstein-Barr

2. Non-Epstein-Barr viral-associated NPC คือ WHO ชนิด 1 (well differentiated squamous cell carcinoma) มีพยาธิกำเนิดเหมือนกับมะเร็งของศีรษะและคอชนิด squamous cell carcinoma ส่วนมากพบร่วมกับการสูบบุหรี่ และดื่มเหล้า ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส Epstein-Barr<sup>16</sup>

เชื้อไวรัส Epstein-Barr จะพบอยู่ในเซลล์มะเร็ง NPC WHO ชนิด 2 และ 3 โดยมักพบอยู่ใน nucleus ของเซลล์นอกโครโมโซม (episomal form) มีส่วนน้อยที่พบแทรกเข้าไปในสายโครโมโซม (integrated form) เมื่อตรวจลักษณะของโครโมโซมของเซลล์มะเร็ง NPC ของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัส Epstein-Barr อยู่ในเซลล์ พบว่ามีการขาดหายไปอยู่บางส่วนของโครโมโซมบางอัน ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 3p, 9p, 11q<sup>69</sup> การที่มีการขาดหายไปของโครโมโซมดังกล่าวอาจเกิดจากผลของเชื้อไวรัสที่เข้าไปในเซลล์ และตำแหน่งที่ขาดหายไปของโครโมโซมอาจเป็นที่อยู่ของยีนต้านมะเร็ง เมื่อขาดยีนที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งของเซลล์ดังกล่าวจะมีผลทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งได้ง่ายขึ้น เมื่อได้รับสารก่อมะเร็งเข้าไปในเซลล์

เชื้อไวรัส Epstein-Barr สามารถสร้างโปรตีนหลายชนิดเมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ได้แก่ Epstein-Barr nuclear virus antigen (EBNA1 และ EBNA2) latent membrane protein (LMP)<sup>70</sup> LMP1 สามารถยับยั้ง differentiation ของเซลล์เยื่อหุ้มของมนุษย์<sup>71</sup> การเกิด differentiation ทำให้เซลล์ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์แก่ (mature cell) จึงคงอยู่ในสภาพของเซลล์อ่อน (stem cell) ทำ

ให้มีการเจริญเติบโตอย่างผิดปกติ (hyperproliferative stage) มีผลให้เซลล์ดังกล่าวเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งได้ง่ายขึ้น สำหรับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งของเชื้อไวรัสที่มีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ EBNA2 จะเกี่ยวข้องกับ cellular differentiation ใน well differentiated squamous cell carcinoma (WHO ชนิด 1) และจะไม่พบ LMP1 แต่ EBNA2 พบประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วย NPC ที่มีพยาธิสภาพแบบ non-keratinizing carcinoma (WHO ชนิด 2) และพบในผู้ป่วยทุกรายที่เป็น undifferentiated NPC (WHO ชนิด 3)<sup>72</sup>

ลักษณะเฉพาะของเชื้อไวรัสนี้ คือสามารถทำให้เซลล์เป็นอมตะ (immortalization) เซลล์ปกติจะพัฒนาเป็นเซลล์แก่และตายไป แต่เซลล์ที่มีเชื้อไวรัสสามารถอยู่ได้นานโดยไม่ตายไปตามปกติ การตายของเซลล์เรียกว่า apoptosis ซึ่งเกิดจากการควบคุมของยีนหลายชนิด ยีนชนิดหนึ่งที่ป้องกันการตายของเซลล์เรียกว่ายีน bcl-2 oncogene พบว่าเซลล์มะเร็ง NPC มีการสร้างโปรตีน bcl-2 ขึ้นมากกว่าปกติ<sup>73</sup> จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้เซลล์เป็นอมตะโดยกระตุ้นการทำหน้าที่ของยีน bcl-2 ซึ่งยับยั้งการตายตามปกติของเซลล์ ทำให้เซลล์ต่าง ๆ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแทนที่จะตายไปตามขบวนการปกติจนเกิดเป็นก้อนเนื้อออกซันได้ในที่สุด

#### ระบาดวิทยาและสาเหตุ

มะเร็ง NPC พบมากในเอเชียโดยเฉพาะคนจีนหรือคนที่มีเชื้อสายจีนพบถึง ร้อยละ 18 ของมะเร็งทั้งหมดในคนจีน พบมากในชาวจีนตอนใต้แถบเมืองกวางตุ้งจนมีสมญานามว่า Cantonese cancer เมื่อคนจีนเหล่านี้อพยพมาตั้งถิ่นฐานที่ประเทศอื่น ๆ เช่น ใต้หวัน ไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม ฮองกง ก็ทำให้อุบัติการณ์ของโรคนี้นี้สูงขึ้นด้วย คนจีนในประเทศใต้หวันมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็ง NPC สูงมากในผู้ชายเป็นอันดับหนึ่งและผู้หญิงเป็นอันดับสามของมะเร็งทั้งหมด<sup>74</sup> นอกจากนี้ยังสามารถพบอุบัติการณ์ของโรคนี้อีกได้ปานกลางในประเทศแถบเหนือและตะวันออกของทวีปแอฟริกาชาวเอสกีโมซึ่งเชื่อว่าเป็นคนจีนที่อพยพไปอยู่ที่อลาสก้า ในทางตรงกันข้าม พบว่า ชาวผิวขาวเป็นโรคมะเร็ง NPC น้อยมาก พบเพียง ร้อยละ 0.25 ของมะเร็งทั้งหมด<sup>64</sup>

การศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าการเกิดโรคมะเร็งชนิด NPC มี 3 สาเหตุดังนี้

##### 1. พันธุกรรม

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่ามะเร็งชนิด NPC พบบ่อยในคนจีนที่อาศัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีน และคนจีนโพ้นทะเลที่อพยพมาจากตอนใต้ของประเทศจีนไปตั้งรกรากในประเทศต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าภาวะทางกรรมพันธุ์มีส่วนส่งเสริมให้เกิดโรคมะเร็ง NPC การศึกษา major histocompatibility complex (MHC) ของผู้ป่วยมะเร็ง NPC พบความสัมพันธ์ของอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง NPC และ MHC บางชนิด กล่าวคือ ในประเทศสิงคโปร์พบว่าผู้ที่มี HLA BW46 มีโอกาสเป็นมะเร็ง NPC มากกว่าคนทั่วไป HLA-A2 และ HLA-BS-im-2 พบบ่อยใน

ผู้ป่วย NPC ในประเทศจีน นอกจากนี้ยังพบว่า HLA Aw19, Bw46 และ B17 เพิ่มอัตราเสี่ยงของการเกิดโรค NPC และ HLA-A II ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรค<sup>76</sup> HLA-A-2 มีอุบัติการณ์ของโรค NPC ลดลงในผู้ป่วยผิวขาว<sup>77</sup> แต่การศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกาส่วนใหญ่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง HLA และการเกิดโรคมะเร็ง NPC<sup>78</sup>

## 2. เชื้อไวรัส

หลักฐานทางระบาดวิทยาพบว่ามะเร็ง NPC ชนิด WHO 2 และ 3 พบบ่อยในผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อไวรัส Epstein-Barr และพบเชื้อไวรัสหรือ DNA ของไวรัสในเซลล์มะเร็งทำให้เชื่อว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง<sup>76</sup> NPC นักวิทยาศาสตร์ของประเทศจีนได้ทำการทดลองในหนู โดยใช้เชื้อไวรัส Epstein-Barr ร่วมกับการให้สารก่อมะเร็งประเภท nitrosamine พบว่าสามารถทำให้หนูเกิดมะเร็งที่โพรงหลังจมูก ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับมะเร็งชนิด NPC ในมนุษย์ได้

## 3. สิ่งแวดล้อม

การที่พบว่ามะเร็ง NPC พบได้บ่อยในคนที่อาศัยอยู่ทางประเทศจีนตอนใต้ แอฟริกาตอนเหนือและขั้วโลกเหนือ บ่งชี้ว่าสาเหตุหนึ่งของโรคนี้อาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกันคืออาหารอาหารที่คนเหล่านี้ชอบรับประทานจะคล้ายคลึงกันคือปลาและเนื้อเค็ม เวลาทำอาหารเหล่านี้จะก่อให้เกิดการระเหยของสารก่อมะเร็งจำพวก nitrosamines ที่ปนเปื้อนอยู่ในสารอาหารเหล่านี้<sup>75</sup> การประกอบอาหารดังกล่าวในบ้านที่มีการถ่ายเทอากาศไม่ดีจะทำให้สารระเหยเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงในอากาศที่หายใจ เมื่อสูดดมเข้าไปสัมผัสกับเยื่อโพรงหลังจมูก อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ของเซลล์เยื่อผิวดังกล่าวจนเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของเซลล์

อายุที่พบผู้ป่วย NPC มักพบสูงสุดระหว่างช่วงอายุ 40-50 ปี โดยพบผู้ชายต่อผู้หญิงเป็น 2.2:1 สถิติผู้ป่วยมะเร็ง NPC ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบอายุเฉลี่ย 45 ปี ผู้ชาย:ผู้หญิงเป็น 2:1 ใกล้เคียงกับรายงานของผู้ป่วย NPC จากต่างประเทศ<sup>79</sup>

## อาการและอาการแสดง

อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็ง NPC มีหลายลักษณะ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยได้ง่าย โดยเฉพาะถ้าไม่ได้นึกถึงอาการบางอย่างที่อาจเกิดขึ้นจากโรคนี้นี้ในระหว่างการซักประวัติและตรวจร่างกายผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ โดยสามารถแบ่งอาการและอาการแสดงของผู้ป่วยเป็น 3 ลักษณะดังนี้<sup>80,81,82</sup>

## 1. อาการเฉพาะที่ (local and regional manifestations)

### 1.1 อาการทางหู ได้แก่

การสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) มีเสียงดังในหู (tinnitus) ปวดหู หูอื้อ (plugged full sensation) หูชั้นกลางอักเสบ (serous otitis media)

### 1.2 อาการทางจมูก ได้แก่

เลือดกำเดาไหล (epistaxis) คัดจมูก (nasal stuffiness) อาการปวด การไม่ได้กลิ่น (loss of sense of smell)

### 1.3 อาการทางประสาท ได้แก่

เส้นประสาทสมองผิดปกติ (cranial neuropathy) และอาการปวดศีรษะ กลุ่มอาการ retroparotidian (ได้แก่ เส้นประสาทสมองคู่ที่ 9 10 11 และ 12) กลุ่มอาการ petro-sphenoidal (ได้แก่ เส้นประสาทสมองคู่ที่ 3 4 5 และ 6) กลุ่มอาการ Horner

### 1.4 อาการทางคอ ได้แก่

ก้อนที่คอ (neck mass) อาการปวดคอ (neck pain) เสียงแหบ (hoarseness) อาการสำลัก หายใจไม่ออก (choking spell) กลืนลำบาก (dysphagia)

### 1.5 อาการทางตา ได้แก่

อาการ ophthalmoplegia เห็นภาพซ้อน (diplopia) อาการ xerophthalmia

## 2. อาการจากการแพร่กระจาย (metastasis)

### 2.1 อาการทางกระดูก ได้แก่

อาการปวดกระดูก (bone pain) กระดูกหักผิดปกติ (pathological fracture)

### 2.2 อาการทางระบบหายใจ ได้แก่

หายใจหอบเหนื่อย (dyspnoea)

### 2.3 อาการทางตับ ได้แก่

ปวดท้อง แน่นท้อง ตัวเหลืองตาเหลือง (jaundice) ตับโต (hepatomegaly)

2.4 อาการแสดงของการแพร่กระจายของมะเร็งโดยไม่ทราบที่มาของมะเร็งปฐมภูมิ (metastasis of unknown origin)<sup>83</sup> ได้แก่ ต่อม้ำเหลืองที่คอโตจากมะเร็งแพร่กระจายมา ชนิด squamous cell (metastatic squamous cell carcinoma to cervical lymph node) โดยพบว่า มะเร็งของศีรษะและคอ 4 ตำแหน่งที่ให้อาการแสดงแบบนี้ได้ ได้แก่ โปรงหลังจมูก, base of tongue, tonsil, และ hypopharynx

### 3. กลุ่มอาการ paraneoplastic syndrome

ผู้ป่วยมะเร็ง NPC อาจมาด้วยอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด ผอมลง บางครั้งเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งสร้างสารบางชนิดทำให้เกิดกลุ่มอาการดังกล่าวขึ้นผู้ป่วยอาจมาด้วยอาการของ hypercalcemia ซึ่งมักพบในระยะหลัง ๆ ของโรคมะเร็ง NPC บางรายอาจมาด้วยอาการ hypertrophic osteoarthropathy syndrome (Pierre-Marie syndrome) กลุ่มอาการ digital hippocratism หรือไข้ไม่ทราบสาเหตุร่วมกับเม็ดเลือดขาวสูงผิดปกติ (leukemoid reaction)<sup>84,85</sup>

อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยไทยที่พบมากที่สุดคือมาพบแพทย์ด้วยเรื่องมีก้อนเนื้อที่คอพบได้ ร้อยละ 46 ของผู้ป่วย ที่พบรองลงไปคืออาการทางหู เช่น การสูญเสียการได้ยิน (hearing loss) มีเสียงดังในหู (tinnitus) หูอื้อ ซึ่งพบประมาณร้อยละ 20 ส่วนอาการทางจมูก เช่น แน่นคัดจมูก เลือดกำเดาออกน้ำมูกไหลมาก (rhinorrhea) พบร้อยละ 19 สำหรับอาการทางระบบประสาทที่พบบ่อยคือความผิดปกติของเส้นประสาทสมอง (cranial neuropathy) พบร้อยละ 10 เส้นประสาทสมองที่พบบ่อยมากที่สุดตามลำดับคือ เส้นประสาทคู่ที่ 6 5 และ 3 อาการปวดศีรษะพบได้ร้อยละ 5 โดยระยะเวลาตั้งแต่ผู้ป่วยมีอาการจนได้รับการวินิจฉัยโรคมิตั้งแต่ 10 อาทิตย์ ไปจนถึง 48 เดือน<sup>79</sup>

จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็ง NPC มีความหลากหลายของอาการและอาการแสดงและอาการหลายอย่างคล้ายกับโรคอื่น ๆ หลายชนิด ดังนั้นถ้าแพทย์ที่ตรวจผู้ป่วยไม่ได้ถึงมีโรคนี้ในการวินิจฉัยแยกโรค อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการให้การวินิจฉัยโรคได้

### การวินิจฉัยโรค

#### การตรวจมะเร็ง ระยะแรกเริ่มเป็น

ผู้ป่วยมะเร็ง NPC ระยะเริ่มแรกจะไม่มีอาการและอาการแสดงที่จะตรวจทางคลินิกได้ อาจตรวจหาระดับของ IgA anti-viral capsid antigen (VCA) ในรายที่สงสัยและโอกาสเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็ง NPC ได้แก่ ผู้ที่มีเชื้อสายจีนและอาศัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีน

จากการศึกษาหนึ่งในประเทศจีน โดยการตรวจเลือดของผู้ที่มีสุขภาพดี 42,048 คนในประเทศจีนตอนใต้ พบว่ามี 2823 คนที่มีระดับของ IgA anti-VCA สูงกว่าคนปกติ เมื่อติดตามคนเหล่านี้ต่อไปทุกปีด้วยการตรวจด้วย indirect mirror โพรงหลังจมูก พบว่า ผู้ป่วยเกิดเป็นมะเร็ง NPC ในระยะเริ่มแรกถึง 41 คนหลังจากการติดตามผู้ป่วยเป็นเวลานาน 2 ปี คิดเป็นการตรวจพบ ร้อยละ 3-5 ต่อปีในรายที่พบ seropositive ต่อเชื้อไวรัส Epstein-Barr

ดังนั้นการตรวจเช็คมะเร็ง NPC อาจพิจารณาทำในกลุ่มที่อัตราเสี่ยงสูงคือ ผู้ชายอายุ 40-59 ปี เชื้อสายจีน อาศัยอยู่ใน endemic area ของมะเร็ง NPC คือประเทศจีนตอนใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย โดยตรวจหาระดับของ IgA anti-VCA ต่อเชื้อไวรัส ถ้าพบว่าสูงควรตรวจ

โพรงหลังจมูกอย่างละเอียดเพื่อตรวจหามะเร็งในระยะเริ่มแรก สำหรับประโยชน์ที่ได้รับจากการตรวจข้างต้นในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง

#### การตรวจทางโสต คอ นาสิก

เมื่อสงสัยว่าผู้ป่วยอาจเป็นมะเร็ง NPC ควรตรวจบริเวณ โพรงหลังจมูก ด้วย indirect mirror หรือ fiberoptic<sup>86</sup> และตัดชิ้นส่วนที่สงสัยมาตรวจทางพยาธิวิทยา บางครั้งอาจใช้ส่องกล้อง (nasoendoscope) ซึ่งมีรายงานว่าได้ผลดี<sup>87</sup>

#### การตรวจทางรังสีวินิจฉัย

การตรวจทางรังสีวินิจฉัยจะช่วยในการบอกถึงตำแหน่งและระยะของโรคมะเร็ง NPC ที่เป็นโดยแบ่งตรวจเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการตรวจหารอยโรคที่เป็นเฉพาะที่ (loco-regional disease) ตำแหน่งที่ต้องตรวจที่บริเวณฐานกะโหลกศีรษะ บริเวณ โพรงหลังจมูก, regional lymph nodes โดยเฉพาะ para และ retropharyngeal nodes รวมไปถึง neck node และบริเวณข้างเคียงคือ กระบอกตา (orbit) และ โพรงหลังจมูก

เอ็กซเรย์กะโหลกศีรษะปกติ (Skull X-RAY) มีความไวน้อยกว่าเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์หรือ เอ็กซเรย์สนามแม่เหล็ก (magnetic resonance imaging) ในการตรวจ skull erosion<sup>89</sup> ส่วนการตรวจ regional node involvement อาจใช้เอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ หรือ magnetic resonance imaging ได้ แต่พบว่า magnetic resonance imaging จะแยกก้อนมะเร็งจากเนื้อเยื่อที่อักเสบได้ดีกว่าเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ และยังบอกถึงการลุกลามของโรคมะเร็งไปสู่กล้ามเนื้อ เส้นประสาท และการลุกลามเข้าไปในกะโหลกศีรษะได้ดีกว่า แต่ถ้าต้องการตรวจต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ การทำเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ จะดีกว่า magnetic resonance imaging<sup>90,91</sup>

สำหรับการตรวจหารอยโรคที่แพร่กระจาย (metastatic lesion) จะมุ่งเน้นที่ตำแหน่งโรคกระจายไปได้บ่อย ๆ คือ ปอด ตับ และกระดูก ควรทำ chest X-RAY หาระดับ alkaline phosphatase ในเลือด ultrasonography เอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ ของตับ และ bone scan หรือ bone survey ควรพิจารณาในผู้ป่วยมะเร็ง NPC ที่มีอัตราเสี่ยงของการแพร่กระจายของโรคสูง ได้แก่ WHO ชนิด 2 และ 3 มีการบ่งชี้ทางคลินิก เช่น ตับโต ปวดกระดูก ต่อมน้ำเหลืองที่คอโตมาก (locally advanced disease cervical lymphadenopathy)

### การตรวจทางพยาธิสภาพ

เนื่องจากการดำเนินโรคและการพยากรณ์โรคมะเร็งชนิด NPC แตกต่างกันตามชนิดของพยาธิสภาพคือ WHO ชนิด 1 หรือ 2 และ 3 ดังนั้นจึงควรทราบถึงชนิดพยาธิสภาพที่แน่นอน และต้องแยกโรคจากพยาธิสภาพอื่น ๆ เช่น มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งชนิด esthesioneuroblastoma เป็นต้น ปัจจุบันนี้พบผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immune deficiency syndrome) ได้มากขึ้นเรื่อย ๆ ผู้ป่วยเหล่านี้อาจตรวจพบ nasopharyngeal lymphoid hyperplasia และมีก้อนที่คล้ายคลึงกับอาการที่ตรวจพบของมะเร็ง NPC<sup>37</sup> ดังนั้นการตรวจทางพยาธิสภาพจึงมีความสำคัญในการช่วยแยกโรคได้

### การตรวจ tumor markers

Tumor markers ของโรคมะเร็ง NPC อาจแบ่งได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

1. anti-EBV antibody/protein ผู้ป่วยมะเร็ง NPC ชนิด WHO ชนิด 2 และ 3 จะตรวจพบ antibodies ต่อไวรัส Epstein-Barr หลายชนิด ได้แก่ anti-VCA, anti-early antigen (EA), anti-EBNA antibodies พบได้ทั้ง IgA และ IgG<sup>41</sup> และตรวจพบ anti ZEBRA antibody ซึ่ง ZEBRA เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของไวรัส Epstein-Barr (EBV replication activator protein) ทำหน้าที่เปลี่ยน latent form เป็น productive form<sup>93</sup> ดังนั้นการตรวจหาโปรตีนและ antibodies ต่อไวรัส Epstein-Barr อาจช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง NPC ที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวได้

2. Non-EBV associated proteins สามารถตรวจพบโปรตีนหลายชนิดในเลือดที่ได้จากผู้ป่วย มะเร็ง NPC ซึ่งอาจใช้เป็น tumor markers ได้ ได้แก่ soluble CD23<sup>94</sup> interleukin-2 receptors<sup>95</sup> circulating immune complexes<sup>96</sup> lactate dehydrogenase<sup>96</sup> urokinase-type plasminogen activator<sup>97</sup>  $\beta$ 2-microglobulin<sup>94</sup> สำหรับประโยชน์ของการตรวจหาโปรตีนเหล่านี้ทางคลินิกยังอยู่ในการศึกษาวิจัยและไม่แนะนำให้ใช้ทั่วไปจนกว่าจะมีข้อมูลที่แน่นอนจากการศึกษาว่ามีประโยชน์ทางคลินิกที่ชัดเจน

### ระยะของโรค

การแบ่งมะเร็ง NPC ตามระยะของโรคยังไม่มีการตกลงแน่นอนว่าควรใช้ระบบใดในการแบ่ง ระบบที่ใช้ยู่มีหลายชนิด ได้แก่ ระบบ TNM ของ American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting (AJCC)<sup>99</sup> ระบบ International Union Against Cancer (UICC)<sup>100</sup> ระบบ Ho<sup>101</sup> และระบบ Prognostic Scoring<sup>102</sup>

ทางหน่วย Medical Oncology โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ใช้ระบบ TNM สำหรับมะเร็ง NPC ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันแพร่หลายทั่วโลก (ตารางที่ 1.2) โดยแบ่งตามลักษณะและระยะของโรค ออกเป็นก้อนมะเร็งที่ โพรงหลังจมูก (T) ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง (N) การแพร่กระจายไปอวัยวะอื่น ๆ

(M) การแบ่งวิธีนี้เป็น 4 ระยะ พบว่าไม่สามารถแยกการพยากรณ์โรคได้ชัดเจนระหว่างระยะที่ 1 และระยะที่ 2 หรือระหว่างระยะที่ 3 และระยะที่ 4 แต่สามารถแยกโอกาสรอดชีวิตจากโรคได้ชัดเจนระหว่างสองกลุ่มคือ ผู้ป่วยระยะที่ 1 และ 2 จากระยะที่ 3 และ 4

สาเหตุที่ระบบ TNM ยังไม่ดีพอในการแบ่งระยะของโรคมะเร็ง NPC มีดังต่อไปนี้

1. Submucosal Spread เนื่องจากการแพร่ลุกลามของเซลล์มะเร็ง NPC ที่เยื่อหุ้มโพรงหลังจมูก อาจเกิดขึ้นได้เยื่อหุ้มปกติ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบรอยโรคได้ชัดเจนและบอกรายละเอียดของก้อนมะเร็งที่ nasopharynx ได้ลำบาก<sup>64</sup>

2. มะเร็งมักเกิดที่เยื่อหุ้มบริเวณ Rosenmuller's Fossa ซึ่งอยู่ที่รอยต่อระหว่างด้านหลังและด้านข้างของโพรงหลังจมูก การแยกระหว่าง T1 คือมะเร็งที่อยู่ด้านเดียวกัน หรือ T2 คือมะเร็งที่อยู่ทั้งสองด้านของโพรงหลังจมูก คือ ด้านหลังข้างบน (posterosuperior) และด้านข้างของผนังโพรงหลังจมูก จึงแยกกันทางคลินิกได้ลำบาก และในกรณีที่เป็นแบบ submucosal spread โดยที่เยื่อหุ้มเนื้อเยื่อมะเร็งยังปกติ ซึ่งตรวจพบเซลล์มะเร็งจากการตัดชิ้นเนื้อ ถือว่าเป็นระยะ T1 บางครั้งรอยโรคอาจเป็นที่ผนังทั้งสองด้านของโพรงหลังจมูก ซึ่งควรจะเป็น T2 แต่ไม่พบเพราะลุกลามไปอยู่ใต้เยื่อหุ้มของโพรงหลังจมูก<sup>64</sup>

3. การลุกลามของมะเร็งที่โพรงหลังจมูก อาจโตงอกไปสู่อวัยวะที่อยู่ติดกัน (contiguous regional extension) แต่การแบ่งระบบ TNM มีเพียง T3 เป็นมะเร็งที่ลามเข้าไปในช่องจมูกและปาก (oropharynx) และ T4 ลุกลามไปที่ฐานของกะโหลกศีรษะหรือทำให้เกิด cranial neuropathy ปรากฏว่ามะเร็งที่ลุกลามไปบริเวณที่ติดกันซึ่งจัดเป็นระยะ T3 หรือทำให้เกิด cranial neuropathy จัดเป็น T4 มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี แต่ถ้ามะเร็งลุกลามไปถึงฐานของกะโหลกศีรษะเพียงอย่างเดียวจัดเป็น T4 เหมือนกัน กลับมีการพยากรณ์โรคดีกว่าอีกสองกรณีของ T3 และ T4 ดังกล่าวข้างต้น<sup>103</sup>

4. การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองที่คอ ระบบ TNM จะเป็นระยะ N เป็น 3 ระยะ N1 ต่อมน้ำเหลืองโตด้านเดียวขนาดน้อยกว่า 3 เซนติเมตร N2 ต่อมน้ำเหลืองที่คอขนาด 3-6 เซนติเมตร หรือมีต่อมน้ำเหลืองที่คอโตมากกว่า 1 ต่อมน้ำ ขนาดเกินกว่า 6 เซนติเมตร หรือเป็นทั้งสองข้าง หรือด้านตรงข้ามของคอขนาดเล็กกว่า 6 เซนติเมตร N3 ต่อมน้ำเหลืองที่คอโตมากกว่า 6 เซนติเมตร ซึ่งระบบ N สำหรับต่อมน้ำเหลืองที่โตจากโรคมะเร็ง NPC ไม่สามารถบอกการพยากรณ์โรคได้ดีพอ เนื่องจากโพรงหลังจมูก อยู่ตรงกลางของร่างกาย ดังนั้นมะเร็ง NPC จึงแพร่กระจายไปได้ทั้งสองด้านของคอ ทำให้พบต่อมน้ำเหลืองที่คอทั้งสองข้างได้บ่อย บางรายงานพบได้ถึง 53% ของผู้ป่วย<sup>80</sup> นอกจากนี้การแบ่งระยะตามการลุกลามไปที่ต่อมน้ำเหลืองว่าเป็นด้านเดียวกัน หรือคนละด้านกับก้อนมะเร็ง NPC ที่โพรงหลังจมูก ก็มีประโยชน์น้อยทางคลินิก สิ่งที่สำคัญที่เป็นการพยากรณ์โรคมะเร็ง NPC ที่แพร่กระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอก็คือขนาดของต่อมน้ำเหลืองที่โตและระดับต่อมน้ำ



เหลือซึ่งเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไป กล่าวคือถ้าต่อมน้ำเหลืองยังโตหรือยังพบต่อมน้ำเหลืองที่มีเซลล์มะเร็งอยู่ ในตำแหน่งต่ำลงมาทำให้การพยากรณ์โรคร้ายก็ยังไม่ดีเท่า นั้น ระบบ Ho ได้แยกต่อมน้ำเหลืองที่คอซึ่งโตจากมะเร็ง NPC เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่อยู่เหนือและใต้ Ho's line (เส้นสมมุติที่ลากจาก laryngeal prominence หรือ thyroid notch ไปด้านข้างและด้านหลัง) กลุ่มที่มีต่อมน้ำเหลืองที่โตอยู่ต่ำกว่า Ho's line มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่อยู่เหนือต่อเส้นสมมุตินี้<sup>99,100,103</sup>

เนื่องจากระบบการแบ่งระยะของมะเร็ง NPC ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีจุดอ่อนหลายประการ Neel และ Taylor ได้ใช้ลักษณะทางคลินิก พยาธิสภาพ และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ แบ่งระยะของโรคตาม prognostic score (ตารางที่ 2.1) พบว่าสามารถแยกระยะของโรคตามการพยากรณ์โรคได้ดี เนื่องจากการตรวจพบทางห้องปฏิบัติการเพื่อหา antibody-dependent cellular cytotoxicity ไม่สามารถทำได้ทั่วไป จึงมีการแก้ไขให้ใช้ข้อมูลทางคลินิกเท่านั้นในการแบ่งระยะของโรคที่เป็น<sup>103</sup> (ตารางที่ 2.2)

ผู้ป่วยที่มาตรวจรับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มักมาพบแพทย์เมื่อเป็นมากแล้ว โดยเฉพาะระยะที่ IV ถึง ร้อยละ 72 ของผู้ป่วย NPC ทั้งหมด พบระยะที่ I และ II เพียงร้อยละ 6 เท่านั้น ส่วนระยะที่ III พบร้อยละ 15.8<sup>79</sup> จะเห็นได้ว่า การวินิจฉัยโรคตั้งแต่ระยะแรกยังเป็นปัญหาสำหรับมะเร็ง NPC ค่อนข้างล่าช้ามาก การให้ความรู้กับประชาชนและแพทย์เพื่อช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรคตั้งแต่ระยะแรก และให้การรักษาทันท่วงทีจึงมีความจำเป็นสำหรับโรคนี้

## การรักษา

### การฉายแสง

การฉายแสงรังสีเป็นวิธีการรักษาหลัก สำหรับมะเร็ง NPC ตำแหน่งที่ฉายแสงประกอบด้วยก้อนมะเร็งที่ โพรงหลังจมูก ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียงและที่คอฉาย 1.75-2 Gy ต่อวันจนครบ 65Gy ในกรณีที่ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่มีการลุกลามไปที่ cranial nerves หรือฐานกะโหลกศีรษะ จะฉายจนถึง 70 Gy บริเวณคอส่วนล่างและเหนือไปปลารัว ฉาย 50 Gy (direct anterior field) บางครั้งอาจใช้การฝังแร่ผ่านทางช่องจมูก (transnasal intracavitary brachytherapy) เพิ่มปริมาณรังสี (boost dose) ที่ nasopharynx หรือใช้กับรอยโรคที่เป็นซ้ำบริเวณ โพรงหลังจมูก หรือที่ยังคงเหลืออยู่หลังการฉายแสงครบแล้ว

เนื่องจากโรคมะเร็ง NPC ตอบสนองค่อนข้างดีต่อการฉายแสงรังสี ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดหรือระยะเวลาปลอดโรค (disease-free survival) ค่อนข้างยาวนาน จึงมีโอกาที่จะพบผลข้างเคียงระยะยาวของการฉายแสงรังสีได้บ่อยโดยเฉพาะถ้าใช้ในขนาดสูง ผลข้างเคียงระยะยาวประกอบด้วย xerostomia ฟันผุ eustachian tube dysfunction การทำลาย optic nerve ความผิดปกติของจอ

ประสาทตา(retinopathy) trismus entrapment neuropathy induration ของบริเวณคอ hypopituitarism hypothyroidism<sup>101,102</sup>

ผู้ป่วยมะเร็ง NPC ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 184 รายที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายแสงรังสี ประกอบด้วยระยะที่ I และ II ร้อยละ 12 ระยะ III ร้อยละ 15.8 และระยะที่ IV ร้อยละ 72.2 ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการฉายแสงด้วยเครื่อง cobalt 60 ระยะแรกให้แสงรังสี 40 Gy เป็น parallel opposed-lateral field ครอบคลุม โพรงหลังจมูกรวมถึงฐานกะโหลกศีรษะและลำคอ ระยะต่อมาใช้เทคนิค three-field สำหรับ โพรงหลังจมูก จนถึง radical dose ในกรณีที่ก้อนที่คอโตมากจะใช้ anterior whole-neck field หรือ opposed field โดยบังบริเวณส่วนกลางซึ่งเป็นตำแหน่งของกล่องเสียงและไขสันหลัง ถ้าไม่มีต่อมน้ำเหลืองที่คอโตจะฉายแสงที่คอประมาณ 50 Gy เป็นการป้องกันระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาประมาณ 6 ถึง 8 อาทิตย์

ผลของการรักษาด้วยการฉายแสงรังสีขึ้นอยู่กับระยะของโรค และการที่มีต่อมน้ำเหลืองโตหรือไม่ การแบ่งระยะของโรค TNM ไม่สามารถจะบอกอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยหลังการรักษาที่สามปีได้เพียงพอ โดยพบว่าระยะที่ I มีอัตราการรอดชีวิตหลังการรักษา ร้อยละ 62.7 ระยะที่ II ร้อยละ 100 ระยะที่ III ร้อยละ 50.8 และระยะที่ IV ร้อยละ 49.6 แต่ถ้าแบ่งระยะของผู้ป่วยตามการที่มีต่อมน้ำเหลืองโตจะบอกการพยากรณ์โรคได้ดีมากขึ้น ถ้าต่อมน้ำเหลืองไม่โต NO มีอัตราการรอดชีวิตหลังการรักษา ร้อยละ 79.4 ถ้าผู้ป่วยมีต่อมน้ำเหลือง N1-3 จะมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือเพียงร้อยละ 39.1 เท่านั้น ( $p < 0.001$ )

การกลับเป็นซ้ำของโรคหลังการรักษาด้วยแสงรังสีพบว่า ประมาณสามในสี่ของผู้ป่วยจะกลับเป็นซ้ำเฉพาะที่ บริเวณ โพรงหลังจมูก (local recurrence) หรือต่อมน้ำเหลือง (regional recurrence) อีกหนึ่งในสี่ของผู้ป่วยจะมีการแพร่กระจายของโรค คือ ผู้ป่วย 49 รายใน 184 ราย (ร้อยละ 26.6) และพบว่ากระจายไปที่กระดูกบ่อนที่สุด (25 ราย) รองลงไปคือ คับ (13 ราย) และปอด (11 ราย) โอกาสเสี่ยงที่โรคจะแพร่กระจายขึ้นอยู่กับการที่มีต่อมน้ำเหลืองโตหรือไม่ก่อนรักษา ผู้ป่วยส่วนมากจะเป็นซ้ำภายในสามปีแรกหลังการรักษา (ร้อยละ 88.4) โดยที่ ร้อยละ 41 จะกลับเป็นซ้ำภายใน 6 เดือนแรกหลังการฉายแสงรังสี<sup>79</sup>

### การผ่าตัด

การผ่าตัดไม่ใช่การรักษาโรคมะเร็ง NPC เนื่องจากตำแหน่งที่เกิดของมะเร็ง ทำให้การผ่าตัดทำได้ยาก อาจเกิดผลข้างเคียงและความทุพพลภาพได้ง่าย ข้อบ่งชี้ในการรักษาโรคมะเร็ง NPC ด้วยการผ่าตัดมีดังนี้<sup>64</sup>

1. ในกรณีการฉายแสงรังสีได้ผลที่ก้อนมะเร็งที่ โพรงหลังจมูก แต่ไม่ได้ผลที่ต่อมน้ำเหลืองที่คอ การตัดต่อมน้ำเหลืองที่มีโรครอก (radical neck dissection) เป็นวิธีการรักษาที่สามารถแก้ปัญหาเรื่องนี้ได้

2. การกลับเป็นซ้ำเฉพาะที่หลังการฉายแสงรังสีเต็มที่แล้ว การผ่าตัดเอาก่อนมะเร็งอาจเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยผู้ป่วยได้ เทคนิคใหม่ ๆ เช่น cryosurgery ใช้ในโตรเจนเหลวที่ก่อมะเร็งในโพรงหลังจมูก สามารถใช้รักษาการกลับเป็นซ้ำเฉพาะที่หลังการฉายแสงรังสีได้

3. การตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยโรค โดยตัดบริเวณโพรงหลังจมูก ไม่ใช่ตัดที่ต่อมน้ำเหลืองที่คอโดยตรง เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของโรค

## ยาเคมีบำบัด

การให้ยาเคมีบำบัดก่อนการฉายแสง

ถึงแม้ว่าการฉายแสงรังสีรักษาจะเป็นวิธีการรักษามาตรฐานสำหรับโรคมะเร็ง NPC พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการรักษา มีสองประการคือ

1. ลักษณะทางพยาธิสภาพ ถ้าเป็น well differentiated squamous cell carcinoma WHO ชนิด 1 ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับไวรัส Epstein-Barr มักพบในคนสูงอายุและเกิดจากการสูบบุหรี่จัด ปัญหาของการรักษาส่วนมากจะเป็นเรื่องของการควบคุมโรคเฉพาะที่ เนื่องจากโรคนี้อาจมีการแพร่กระจายน้อยกว่าปัญหาของการลุกลามเฉพาะที่ ส่วนพยาธิสภาพแบบ WHO ชนิด 2 และ 3 เกิดจากเชื้อไวรัส Epstein-Barr จะมีปัญหาการลุกลามเฉพาะที่และการแพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย ดังนั้นการให้ยาเคมีบำบัดจึงอาจมีบทบาทในพยาธิสภาพแบบนี้

2. ระยะของโรค ความล้มเหลวและการกลับเป็นซ้ำของโรคหลังการรักษาด้วยการฉายแสงรังสีขึ้นอยู่กับระยะของโรค ถ้าเป็นระยะ T3-4 จะมีโอกาสกลับเป็นซ้ำเฉพาะที่สูง ส่วนถ้าลามไปที่ต่อมน้ำเหลืองถ้าเป็นระยะ N2-3 จะมีโอกาสเกิดการแพร่กระจายของโรคได้สูง ระยะ N3 นอกจากจะมีโอกาสเกิดการแพร่กระจายโรคแล้ว ยังมีโอกาสเป็นซ้ำที่ต่อมน้ำเหลืองเดิมสูงขึ้นกว่าระยะอื่น ๆ ด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระยะของโรคที่อาจต้องพิจารณาให้ยาเคมีบำบัดร่วมด้วยคือระยะ T3-4 หรือ N2-3 ส่วนระยะ T1-2 หรือ NO-1 ให้การรักษาด้วยการฉายแสงรังสีรักษาที่เพียงพอแล้วสำหรับการรักษาโรค

มีการศึกษาย้อนหลังหลายรายงานที่พบว่า การให้ยาเคมีบำบัดก่อนการฉายแสง (neoadjuvant chemotherapy) จะลดการกลับเป็นซ้ำของโรค ลดการแพร่กระจายและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย เมื่อเทียบกับ historical control ที่ได้รับการฉายแสงเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้มีความน่าเชื่อถือน้อย เพราะเป็นการศึกษาย้อนหลัง ไม่ใช่ randomized trials และการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉายแสงอย่างเดียวซึ่งไม่ทราบว่าปัจจัยการพยากรณ์โรคเหมือนกับกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดหรือไม่ โดยเฉพาะในแต่ละกลุ่มที่เปรียบเทียบได้รับการรักษาในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ยาเคมีบำบัดที่ใช้ก็แตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละรายงาน<sup>104-107</sup> Tannock<sup>108</sup> ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม กลุ่มแรกให้ยาเคมีบำบัด cisplatin 2 ชุด ตามด้วยการฉายแสง และกลุ่มที่สองฉายแสงอย่าง

เดียว พบว่าถึงแม้ว่ากลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดจะทำให้ก้อนมะเร็งยุบได้มากกว่า แต่ไม่มีความแตกต่าง  
กันระหว่างการควบคุมโรคเฉพาะที่ อัตราการแพร่กระจายของโรค และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย  
สองกลุ่ม<sup>108</sup>

สำหรับ prospective randomized trials มีหลายรายงาน รายงานแรกโดย Rossi เปรียบเทียบ  
ระหว่างการให้ยาเคมีบำบัด ได้แก่ ยา cyclophosphamide ยา doxorubicin และยา vincristine เดือน  
ละครั้ง นาน 6 เดือน และฉายแสง หรือฉายแสงเพียงอย่างเดียวโดยไม่ให้ยาเคมีบำบัด ไม่พบการ  
แตกต่างระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม ที่รักษา ไม่ว่าจะเป็นระยะปลอดโรค (disease-free survival) และ การ  
แพร่กระจายโรค<sup>109</sup> เนื่องจากยาเคมีบำบัดที่ใช้ไม่ใช่ยาที่ดีที่สุดสำหรับโรคนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ไม่  
เห็นประโยชน์เพิ่มขึ้นของการให้ยาเคมีบำบัด และการฉายแสงร่วมกัน

### การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายแสง

ผู้ป่วย NPC ระยะ IV เป็นกลุ่มที่เมื่อให้การรักษาด้วยการฉายแสงเพียงอย่างเดียว จะมีอัตรา  
การควบคุมโรคได้ต่ำมาก ดังนั้นมีการพยายามนำยาเคมีบำบัดมาให้ร่วมกับการฉายแสงรังสี พบว่า  
เมื่อใช้ cisplatin 100 mg/m<sup>2</sup> ให้ทุก 3 อาทิตย์ 3 ครั้ง ระหว่างรักษาด้วยการฉายแสง พบว่าสามารถ  
เพิ่มระยะปลอดโรค (disease-free survival) เพิ่มอัตราการรอดชีวิต และลดอุบัติการณ์ของแพร่กระจาย  
โรคได้<sup>110</sup> จะเห็นได้ว่าการให้ยาเคมีบำบัดไม่ใช่วิธีการรักษามาตรฐานสำหรับผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง  
NPC เฉพาะที่ ซึ่งยังไม่มีผลการแพร่กระจายไปที่อื่น เนื่องจากข้อมูลจากการศึกษาวิจัยทางคลินิกยังไม่  
พบชัดเจนว่าสามารถเพิ่มการควบคุมโรค ลดการแพร่กระจายหรือเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย  
มะเร็ง NPC ได้ ดังนั้นการให้ยาเคมีบำบัดสำหรับผู้ป่วยมะเร็ง NPC ที่เป็นเฉพาะที่ ควรใช้ภายใต้การ  
ศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาโรคให้ดียิ่งขึ้น

### ยาเคมีบำบัดสำหรับโรคระยะแพร่กระจาย

มะเร็ง NPC เป็นโรคที่ไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด การให้ยาเคมีบำบัดชนิดเดียวจะให้  
การตอบสนองน้อยกว่าการใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน ยาเคมีบำบัดที่ได้ผลดีควรมี cisplatin เป็นส่วน  
ประกอบ (cisplatin-based chemotherapy) ผลการตอบสนองของการรักษาโรคในระยะแพร่กระจาย  
โดยการใช้ยาเคมี พบว่ามี complete response ตั้งแต่ร้อยละ 4-100 และ partial response ตั้งแต่ร้อยละ  
25-79<sup>111-121</sup>

## การพยากรณ์โรค

### 1. ระยะของโรค

ปัจจัยที่ชี้บ่งการพยากรณ์ที่ไม่ดีในมะเร็งชนิด NPC ประกอบด้วย T3 หรือ T4 cranial neuropathy intracranial extension N stage (cervical lymph node metastasis) ตำแหน่งของต่อมน้ำเหลืองที่คออยู่ต่ำ (lower cervical หรือ supraclavicular lymphadenopathy)<sup>122-124</sup>

### 2. อายุและเพศ

ผู้ป่วยอายุน้อยมีการพยากรณ์ของโรคที่ไม่ดีโดยเฉพาะถ้าอายุน้อยกว่า 20ปี<sup>125</sup> แต่บางรายกลับพบว่าผู้ป่วยอายุน้อยมีการพยากรณ์ของโรคที่ดีกว่า<sup>123-124</sup> ผู้ป่วยหญิงมีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่าผู้ป่วยชาย<sup>126</sup>

### 3. อาการและอาการแสดง

ถ้ามีอาการมากกว่า 7 อาการ หรือมีอาการมานานเกินสองเดือนจะเป็นการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี<sup>5 64</sup>

### 4. พยาธิสภาพ

ผู้ป่วย WHO ชนิด 1 มีการพยากรณ์โรคที่เลวกว่า WHO ชนิด 2 และ 3 ทั้งในด้านการควบคุมโรคเฉพาะที่หรืออัตราการรอดชีวิตภายหลังการรักษา<sup>126-127</sup> ผู้ป่วยที่ตรวจพบ vascularization มากในรอยโรคที่เป็นมะเร็ง โดยการย้อมขึ้นเนื้อด้วย anti-factor VIII-related antibody แล้วตรวจ tumor angiogenesis โดยการนับเส้นเลือดที่พบ (microvessel count) พบว่า microvessel count ที่เพิ่มขึ้นในเนื้อออกมะเร็ง NPC เป็นการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอัตราการรอดชีวิตลดลง (p=0.04)<sup>128</sup> การตรวจพบ immune cells เพิ่มขึ้นในมะเร็ง NPC โดยเฉพาะ dendritic cell และ monocytic-macrophage cell บ่งถึงการพยากรณ์โรคที่ดี<sup>129</sup>

### 5. การตรวจทางระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบของ antibodies ต่อเชื้อไวรัส Epstein-barr ไม่บอกถึงการพยากรณ์โรคแต่อาจบอกถึงการกลับเป็นซ้ำของโรคถ้าตรวจพบระดับของ anti-VCA, anti-EA IgG และ Ig A เพิ่มขึ้น<sup>130</sup> ระดับของ antibody-dependent cellular-cytotoxicity titer มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดี<sup>131</sup>

### 6. ยีนมะเร็ง

การตรวจพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนของยีนมะเร็งชนิด c-erb B2 เกี่ยวข้องกับกาตอบสนองต่อการรักษา<sup>128</sup>

ตารางที่ 2.1 แสดงการให้คะแนนเพื่อการพยากรณ์โรค(Prognostic Score)สำหรับผู้ป่วยมะเร็ง NPC

	คะแนน	
	ถ้ามี <sup>b</sup>	ถ้าไม่มี
ปัจจัยหรือตัวแปร		
อาการที่มากกว่า 7 อย่าง	+ 1.14	0
ต่อมน้ำเหลืองโตที่คอส่วนล่าง		
หรือบริเวณ supraclavicular <sup>c</sup>	+ 1.10	0
ชนิดตาม WHO ชนิดที่ 1	+ 1.04	0
ก้อนมะเร็งลุกลามมากในโพรงหลังจมูก	+ 0.53	0
ระยะเวลาของอาการ <2 เดือน	- 0.63	0
คะแนนรวมถึง antibody-dependent cellular cytotoxicity		
Antibody-dependent cellular cytotoxicity titer <1:690	+ 1.36	0
อาการที่มากกว่า 7 อย่าง	+ 1.28	0
ต่อมน้ำเหลืองโตที่คอส่วนล่าง		
หรือบริเวณ supraclavicular <sup>c</sup>	+ 1.19	0
ชนิดตาม WHO ชนิดที่ 1	+ 1.14	0
ก้อนมะเร็งลุกลามมากในโพรงหลังจมูก	+ 0.56	0
Antibody-dependent Cellular cytotoxicity titer > 1:15,360	+ 0.86	0
ระยะเวลาของอาการ <2 เดือน	+ 1.05	0

<sup>a</sup> คะแนนเพื่อการพยากรณ์โรคได้จากผลรวมของคะแนนทั้งหมด

<sup>b</sup> คะแนนที่เป็นลบและคะแนนที่ต่ำกว่าบ่งชี้พยากรณ์โรคที่ต่ำกว่า

<sup>c</sup> ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ต่ำกว่าเส้นที่ลากจาก lamgeal eminence ไปทางด้านข้างและด้านหลังที่มีชื่อเรียกว่า

Ho's line

ตารางที่ 2.2 คะแนนการพยากรณ์โรคในทางคลินิกสำหรับโรคมะเร็ง NPC

Working Formulation สำหรับการประเมินระยะโรคด้วยคะแนน\* ในปี 1988

ลักษณะทางคลินิก	คะแนน	
	ถ้ามี	ถ้าไม่มี
อาการที่มากกว่า 7 อย่าง	+ 1	0
ต่อมน้ำเหลืองโตที่คอส่วนล่าง		
หรือบริเวณ supraclavicular <sup>c</sup>	+ 1	0
ชนิดตาม WHO ชนิดที่ 1	+ 1	0
ก้อนมะเร็งลุกลามมากในโพรงหลังจมูก	+ 0.5	0
ระยะเวลาของอาการ <2 เดือน	+ 0.5	0

WHO, World Health Organization.

Titak score: ระยะ A <0; ระยะ B 0-0.99; ระยะ C 1.00-1.99 และระยะ D >2.00

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันพบความผิดปกติของยีน *p16* และการสูญเสียของการแสดงออกของโปรตีน P16 ในมะเร็งที่เกิดในมนุษย์หลายชนิด อุบัติการณ์ของความผิดปกติของยีน *p16* ที่พบในมะเร็งชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 1.1 ที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 และมีรายงานการศึกษาความผิดปกติของ *p16* หรือการไม่พบการแสดงออกของโปรตีน P16 ร่วมกับความสัมพันธ์ทางคลินิกหรือพยากรณ์โรคในมะเร็งหลายชนิดดังต่อไปนี้

1. Sparrow LE และคณะ<sup>16</sup> ตรวจสอบโปรตีน P16 ในมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาในระยะต่างๆ ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าตรวจไม่พบโปรตีน P16 ใน in situ melanoma 1 ใน 12 ราย (ร้อยละ 8), ใน invasive primary melanoma 19 ใน 38 ราย (ร้อยละ 50) และใน metastatic melanoma 9 ใน 25 ราย (ร้อยละ 36) สรุปได้ว่าการไม่พบโปรตีน P16 พบในมะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาในระยะที่มีการลุกลามมากกว่าระยะ in situ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.006$ )

2. Hui AM และคณะ<sup>17</sup> ทำการตรวจสอบโปรตีน P16 ในมะเร็งตับชนิดเฮปาโตเซลล์ที่ลุกลามมาโดยการศึกษาการตรวจก้อนมะเร็งจากตับจำนวน 32 ก้อนและจากเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งตับ (cell

lines) จำนวน 6 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าตรวจไม่พบโปรตีนP16 ในก้อนมะเร็งจากตับจำนวน 11 ก้อน (คิดเป็นร้อยละ 34) และไม่พบโปรตีนP16ในเซลล์ต้นกำเนิด 3 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 50)

3. Gazeri S และคณะ<sup>10</sup> ตรวจสอบความผิดปกติของยีน *p16* และ โปรตีนP16 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก (NSCLC) จำนวน 43 ราย การตรวจสอบความผิดปกติของยีน *p16* ใช้วิธี PCR พบว่ามีความผิดปกติของยีน *p16* แบบ mutation จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 14), methylation 7 ราย (ร้อยละ 33) และ homozygous deletion 10 ราย (ร้อยละ 48) ส่วนการตรวจโปรตีนP16 ใช้การย้อมด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าการย้อมโปรตีนP16 ให้ผลลบจำนวน 21 ราย ใน 43 ราย (ร้อยละ 49) ร้อยละ 95 ของผู้ป่วยให้ผลลบจากการย้อมโปรตีนP16 จะตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* อย่างใดอย่างหนึ่งในสามแบบข้างต้น จากการศึกษาี้แสดงถึงความสามารถในการใช้การตรวจโปรตีนP16 ด้วยวิธี immunohistochemistry ตรวจสอบความผิดปกติของยีน *p16* ได้รวดเร็ววิธีหนึ่ง

4. Satoshi T และคณะ<sup>11</sup> ทำการตรวจหาโปรตีนP16 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก (nonsmall cell lung cancer) โดยการย้อมโปรตีนP16 ด้วยเทคนิค immunohistochemical analysis จากชิ้นเนื้อมะเร็งที่ปอดที่เก็บรักษาไว้ในพาราฟินจำนวน 155 ตัวอย่างพบว่า ย้อมไม่พบโปรตีนP16 จำนวน 31 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 27 และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้มีลักษณะทางพยาธิเป็น squamous cell carcinoma มากกว่า adenocarcinoma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.026$ ) และผู้ป่วยที่ไม่พบโปรตีนP16 มักมีอัตราการรอดชีวิตสั้นกว่ากลุ่มที่พบโปรตีนP16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.043$ )

5. Volm M และคณะ<sup>12</sup> ศึกษาโปรตีนP16 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma จำนวน 58 ราย ตรวจไม่พบโปรตีนP16 จำนวน 20 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 34.5 และผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีการรอดชีวิตสั้นกว่ากลุ่มที่ตรวจพบโปรตีนP16 (47 สัปดาห์ กับ 79 สัปดาห์)

6. Minobe K และคณะ<sup>13</sup> ตรวจสอบมะเร็งที่เต้านมจำนวน 96 ราย พบว่ามี allelic loss บนโครโมโซมที่ 9 (ตำแหน่ง 9p21, 9p22.3 และ 9p33) จำนวน 37 รายหรือร้อยละ 39 การสูญเสียยีนในตำแหน่งที่ 9p22.3 และ 9p33 พบว่ามีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง

7. Takeuchi H และคณะ<sup>14</sup> ตรวจหาโปรตีนP16 และ โปรตีน cyclin D1 ในก้อนมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma จากหลอดอาหารจำนวน 111 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีโปรตีนP16 จำนวน 56 ราย (คิดเป็นร้อยละ 50) และผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีจำนวนของต่อมน้ำเหลืองที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งมากกว่า และระยะเวลาการมีชีวิตสั้นกว่ากลุ่มที่ตรวจพบโปรตีนP16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.04$ )

8. Lydiatt WM และคณะ<sup>15</sup> พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งของศีรษะและคอชนิด squamous cell carcinoma ที่มีการกลับเป็นซ้ำใหม่ทั้งแบบเฉพาะที่และแพร่กระจายพบว่ามีความผิดปกติของยีน *p16* เชื่อว่ายีนนี้มีบทบาทสำคัญในการกำหนดความรุนแรงของมะเร็งชนิดนี้



9.Hu YX และคณะ<sup>18</sup> ศึกษาโปรตีนP16 จากการตรวจชิ้นเนื้อตับอ่อนของผู้ป่วยที่เก็บรักษาในพาราฟินด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ monoclonal antibody ต่อโปรตีนP16 ปรากฏว่าตรวจพบโปรตีนP16 ในโรคของตับอ่อนดังต่อไปนี้ ตับอ่อนปกติ 0 ใน 6 ราย (ร้อยละ 0.0) ตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง 19 ใน 20 ราย (ร้อยละ 95.0) เนื้องอกของตับอ่อนชนิด cystadenoma 3 ใน 8 ราย (ร้อยละ 37.5) และ มะเร็งของตับอ่อน 26 ใน 62 ราย (ร้อยละ 41.9) และพบว่าผู้ป่วยมะเร็งของตับอ่อนที่ตรวจไม่พบโปรตีนP16 มักมีการแพร่กระจายของมะเร็งมากกว่าและระยะเวลาการมีชีวิตอยู่สั้นกว่ากลุ่มที่ตรวจพบโปรตีนP16

10.Naka T และคณะ<sup>19</sup> ศึกษาโปรตีนP16 และโปรตีนพี 53 ในมะเร็งตับอ่อนด้วยวิธี immunohistochemistry ผลการศึกษาไม่พบโปรตีนP16 ในผู้ป่วย 13 ใน 32 ราย (ร้อยละ 41) และผู้ป่วยเหล่านี้ โรคมักอยู่ในระยะลุกลามและมีพยากรณ์โรคไม่ดีเมื่อเทียบกับกลุ่มที่พบโปรตีนP16 ( $p < 0.05$ ) ตรวจพบโปรตีนพี 53 จำนวนร้อยละ 59 แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิตอย่างชัดเจน สมมุติฐานได้ว่าโปรตีนพี 53 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งของตับอ่อนในระยะแรก และโปรตีนP16 เกี่ยวข้องกับการลุกลามของมะเร็งตับอ่อน

ส่วนการศึกษาค่าความผิดปกติของยีน *p16* และการสูญเสียของการแสดงออกของโปรตีนP16 เฉพาะในมะเร็งหลังโพรงจมูกมีรายงานการศึกษา อยู่ไม่มากนัก ได้แก่

Huang DP และคณะ<sup>5</sup> ตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* ชนิด homozygous deletion ในชิ้นเนื้อมะเร็งโพรงหลังจมูก คิดเป็นร้อยละ 61 Lo KW และคณะ<sup>21</sup> ได้รายงานการตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* ชนิด homozygous deletion ในชิ้นเนื้อมะเร็งโพรงหลังจมูกคิดเป็นร้อยละ 67 Mutirangkula และคณะ<sup>7</sup> ศึกษาถึงความผิดปกติของยีน *p16* ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูก 27 ราย โดยตรวจพบความผิดปกติของยีนนี้บนโครโมโซม 9p21 (LOH of chromosome 9p21) มากถึงร้อยละ 87 ส่วนการตรวจหาโปรตีนP16 โดย immunohistochemistry ใน NPC พบเพียง 1 รายงานว่ามี การสูญเสียของโปรตีนP16 เป็นร้อยละ 64<sup>22</sup> สำหรับความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation ในมะเร็งของศีรษะและลำคอและในมะเร็งหลังโพรงจมูกมีการศึกษาแต่เพียงเรื่องความชุกเป็นตั้งแต้อ้อยละ 20 ถึง 47<sup>23,24,132,133,134,135</sup> และตรวจพบทั้งในมะเร็งระยะเริ่มแรกและระยะลุกลาม

ความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation กำลังได้รับความสนใจศึกษาอย่างกว้างขวางและเป็นเป้าหมายสำคัญของการเกิดมะเร็งหลายชนิดในมนุษย์ ความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation พบมากในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งต่อมไทรอยด์ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็ง multiple myeloma มะเร็งของศีรษะและลำคอ มะเร็งโพรงหลังจมูก มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งหลอดอาหาร และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

มีการศึกษาหลายรายงาน พบว่า ความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation เป็นปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งหลายชนิด ได้แก่

1. ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด non-Hodgkin's ที่มีความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation จะมีความเสี่ยงในการกลับเป็นซ้ำของโรคสูงกว่าในรายที่ไม่มี ความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation<sup>136</sup>

2. ในมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด mycosis fungoides พบว่าความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี<sup>137</sup>

3. ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด adult T-cell leukemia พบว่าความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation สัมพันธ์กับโรคระยะลุกลามอย่างมาก<sup>138</sup>

4. ในมะเร็งหลอดอาหารพบว่าความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation สัมพันธ์กับโรคระยะลุกลามมากเช่นกัน<sup>139</sup>

ส่วนความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation ในมะเร็งของศีรษะและลำคอและมะเร็งโพรงหลังจมูกนั้นมีเพียงการศึกษาในเรื่องความชุกดังกล่าวมาแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางคลินิกกับความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation นี้อย่างชัดเจน

การตรวจพบการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน P16 ด้วยวิธี immunohistochemistry มีความสอดคล้องกันอย่างมากกับการตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation<sup>25</sup> ความสอดคล้องกันของการตรวจทั้งสองวิธี คือ การตรวจพบการสูญเสียการแสดงออกของโปรตีน P16 ด้วยวิธี immunohistochemistry กับการตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation ยังพบจากการศึกษาในมะเร็งอื่นๆ ได้แก่ มะเร็งกระเพาะอาหาร<sup>140</sup> มะเร็งเม็ดเลือดขาว<sup>138</sup> มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Hodgkin's<sup>141</sup> มะเร็งปากมดลูก<sup>142</sup> และมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก<sup>143</sup>

จากรายงานการศึกษาหลายรายงานที่กล่าวมาข้างต้น จึงบ่งชี้ว่า การตรวจพบความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation หรือการไม่พบการแสดงออกของโปรตีน P16 มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกหรือพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งหลายๆชนิด ได้แก่ ระยะเวลาการมีชีวิตอยู่สั้นกว่า ความเสี่ยงในการกลับเป็นซ้ำของโรคสูงกว่า และ การตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดีมากกว่ากลุ่มที่ยีน *p16* ไม่มี hypermethylation หรือมีโปรตีน P16 ปกติ ทำให้น่าเชื่อว่าความผิดปกติของยีน *p16* ที่เกิดจาก hypermethylation ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดมะเร็งของศีรษะและลำคอและมะเร็งโพรงหลังจมูก น่าจะเป็นปัจจัยการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี มีระยะเวลาการมีชีวิตอยู่สั้นกว่า ซึ่งอาจเกิดจากการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี คือ เป็นปัจจัยทำนายการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ด้วยรวมทั้งมีความเสี่ยงในการกลับเป็นซ้ำสูงขึ้น