

ระดับเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างการแสดงออกของระดับไซคลินดีวันในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดเซลล์  
ไม่เล็กที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราส



นายภาสกร วันชัยจิระบุญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Level of percent difference of cyclin D1 in non-  
small cell lung carcinoma with and without Kirsten rat sarcoma (*KRAS*) mutation

Mr. Passakorn Wanchaijiraboon



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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ระดับเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างการแสดงออกของระดับ  
ไซคลินดีวันไนซีนเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีและ  
ไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราส

โดย

นายภาสกร วันชัยจิระบุญ

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ธนินทร อัครวิเชียรจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ลลิตา วัฒนะจรรยา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง จารุวรรณ เอกวัลลภ)

ภาสกร วันชัยจิระบุญญ : ระดับเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างการแสดงออกของระดับไซคลินดีวันในชิ้นเนื้อ มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราส (Level of percent difference of cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma with and without Kirsten rat sarcoma (KRAS) mutation) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 94 หน้า.

ที่มา:

มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (NSCLC) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ออกส่วนใหญ่การกลายพันธุ์ที่พบเป็นการกลายพันธุ์ชนิดอีจีเอฟอาร์ (EGFR) สำหรับการกลายพันธุ์เคราส (KRAS) ซึ่งพบน้อยกว่าแต่เป็นความท้าทายในการวินิจฉัยและเป็นเป้าหมายในการรักษา การศึกษานี้รายงานความชุกของการกลายพันธุ์ KRAS ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ร่วมกับการหาความแตกต่างของความเข้มข้นที่ติดสีไซคลินดีวัน (CyclinD1) บริเวณนิวเคลียส ในมะเร็งปอดชนิดไม่เล็กที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาแบบขวางในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่เล็กที่ไม่มีการกลายพันธุ์ EGFR และเรียงตัวใหม่ของเอแอลเค (ALK) ในผู้ป่วยตั้งแต่ปี 1 มกราคม 2558 ถึง 31 กรกฎาคม 2560 ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และนำมาหาการกลายพันธุ์ KRAS ด้วยชุดตรวจสอบโคบาสและนำมาย้อมหาการติดสี CyclinD1 บริเวณนิวเคลียส งานวิจัยได้เก็บข้อมูลลักษณะทางคลินิก ประวัติการสูบบุหรี่ ระยะ การกลับเป็นซ้ำของโรค รวมทั้งการเสียชีวิตรวมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของ CyclinD1 ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS

ผลการศึกษา:

จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 95 รายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ EGFR และไม่มีการเรียงตัวใหม่ ALK เราได้นำชิ้นเนื้อมาตรวจการติดสีไซคลินดีวันจำนวน 25 จาก 95 ราย (26%) มีการกลายพันธุ์ KRAS และ 27 จาก 95 ราย (28%) ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS พบว่าสำหรับลักษณะทางคลินิกที่การกลายพันธุ์ KRAS แตกต่างกับไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือพบว่าเป็นชายมากกว่าหญิง ( $p = 0.001$ ) สูบบุหรี่มากกว่าไม่สูบบุหรี่ ( $p = 0.005$ ) มีแนวโน้มว่าการรอดชีวิตของที่มีการกลายพันธุ์ KRAS น้อยกว่าไม่มีการกลายพันธุ์แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.053$ ) และพบว่าการกลายพันธุ์ KRAS มีการติดสี cyclinD1 ที่นิวเคลียสมากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 64.5% และ 49.3% ( $p = 0.03$ ) ตามลำดับ

สรุปผล: เราพบความชุกของการกลายพันธุ์ KRAS น้อยกว่าชาวตะวันตก แต่ว่าลักษณะทางคลินิกคล้ายกัน โดยที่พบการติดสี CyclinD1 ที่นิวเคลียสมากกว่าในการกลายพันธุ์ KRAS ซึ่งอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการรักษามุ่งเป้าที่โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ นิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560

## 5974085830 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA / CYCLIN D1 / KRAS

PASSAKORN WANCHAIJIRABOON: Level of percent difference of cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma with and without Kirsten rat sarcoma (*KRAS*) mutation. ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE SRIURANPONG, Ph.D., 94 pp.

#### Background

East Asian lung cancer is dominated by *EGFR* driven non-small cell lung cancer (NSCLC). Though less common, *KRAS* mutation lung cancer in East Asian population remain a major challenge in both diagnosis and treatment. Here we report the prevalence of *KRAS* mutation and nuclear cyclinD1 intensity in correlation with the *KRAS* mutation status.

#### Methods

We first search for NSCLC without *EGFR* mutation and *ALK* rearrangement from patients treated during 1 January 2015 and 31 July 2017 at the King Chulalongkorn Memorial Hospital. Then we further analyzed for *KRAS* mutation with the FDA approved Cobas test and determined the expression of cyclinD1. Clinical and pathological characteristics including demographic data, smoking status, stage were analyzed in correlation with the status of *KRAS* mutation and the expression of cyclinD1.

#### Results

There were eligible 95 *EGFR* wild-type and *ALK*-negative lung cancer patients included in this study. Among these patients, we selected 25 from 95 (26%) had *KRAS* mutation and 27 from 95 (28%) has *KRAS* wild type in their tumor tissue to determine for cyclinD1 expression. Clinical characteristics of this *KRAS* mutation NSCLC included more male ( $p=0.001$ ), more smoker ( $p=0.005$ ). There was a trend of poorer overall survival in *KRAS* NSCLC than without *KRAS* mutation ( $p=0.053$ ). We found a significantly higher level expression of cyclinD1 measured by intensity of staining in *KRAS* mutant vs wild-type, 64.5% and 49.3%, respectively ( $P=0.03$ ).

#### Conclusion

We found a moderate prevalence of *KRAS* mutation in NSCLC in Thailand. Clinical characteristics of these patients are similar to those of Caucasian. Greater expression of cyclinD1 was detected and may serve as a useful biomarker for targeted therapy targeting cell cycle proteins.

Department: Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จ  
ลุล่วงไปด้วยดี

1. อาจารย์ รศ.ดร.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วย  
ชี้แนะแนวทางในการทำวิจัยและให้ข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยตลอดมา
2. อาจารย์ รศ.นพ.บุญชวิษฐุ์ จันทรานุกูฎมน อาจารย์แผนกพยาธิวิทยา  
ผู้เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยาเนื้องอกช่องอกที่ให้ความอนุเคราะห์แปลผลชิ้นเนื้อ และช่วยในการ  
ประสานงานเกี่ยวกับงานทางด้านพยาธิวิทยาทุกอย่าง
3. คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่าน อันประกอบด้วย อาจารย์ ผศ.ดร.นพ.ธนิ  
นทร์ อัครวิเชียรจินดา, ผศ.พญ.จารุวรรณ เอกวัลลภ, ผศ.(พิเศษ) พญ.ลลิตา วัฒนะจรรยา ที่  
ช่วยให้คำแนะนำในการปรับปรุงระเบียบวิธีวิจัย
4. อาจารย์ ดร.พญ.สุทิมา เหลืองดิถิกและนายแพทย์ศิวัช ศักดิ์เดชยนต์ ที่ช่วยให้  
คำปรึกษา
5. อาจารย์วสันต์ พันแสง ที่ช่วยให้คำปรึกษาเรื่องกรวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
6. อาจารย์แพทย์หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
7. เจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา
8. แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยา
9. อาสาสมัครและญาติของอาสาสมัครทุกท่าน ที่ให้ข้อมูลต่างๆสำหรับงานวิจัย

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญแผนภูมิรูป.....	1
สารบัญตาราง .....	1
สารบัญรูปภาพ .....	1
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale) .....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question) .....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	3
1.4 สมมุติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	4
1.5 กรอบความคิดในงานวิจัย (Conceptual framework) .....	4
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption) .....	4
1.7 คำสำคัญ (Key words).....	4
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition).....	5
1.9 รูปแบบการวิจัย .....	5
1.10 วิธีดำเนินวิจัยโดยย่อ .....	5
1.11 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations) .....	6
1.12 ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation).....	6

1.13 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefits and application) .....	6
1.14 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem) .....	6
บทที่ 2 .....	7
ปริทัศน์วรรณกรรม .....	7
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ( Review of related literatures) .....	7
บทนำ	
ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็งปอด .....	8
การกลายพันธุ์กับมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก .....	9
การตรวจคัดกรองมะเร็งปอด (Lung cancer screening) .....	10
อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งปอด .....	11
ชนิดของเซลล์มะเร็งปอด (Histology) .....	14
ระยะของมะเร็งปอด (Lung cancer staging) .....	18
การวินิจฉัยมะเร็งปอด .....	22
การรักษา มะเร็งปอด .....	26
1.การผ่าตัด .....	26
2.การรักษา มะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด .....	27
3.การรักษาด้วยวิธีรังสีรักษา (Radiotherapy) .....	28
การรักษาแยกตามระยะของโรค .....	29
การประเมินการตอบสนองต่อการรักษา (response) .....	34
การดูการกลับเป็นซ้ำของโรค (Recurrence rate) .....	34
การศึกษาเกี่ยวกับ KRAS gene .....	35



1.การค้นพบหน้าที่ของยีน KRAS .....	35
2.การค้นพบกลไกการทำงานของยีน KRAS .....	36
3.การค้นพบกลไกการทำงานที่ผิดปกติเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน KRAS.....	37
4. การศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์เฉพาะตัวของการกลายพันธุ์ KRAS (Mutual exclusivity).....	39
5. การศึกษาเกี่ยวกับการรักษามะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ยีน KRAS .....	39
บทบาทของเอนไซม์ Cyclin Dependent Kinase (CDK) ในการแบ่งตัวของเซลล์.....	41
1.บทบาท CDK กับการควบคุมการแบ่งเซลล์.....	42
2.ชนิดของโปรตีน cyclin .....	43
ชนิดของ CyclinD .....	44
CyclinD ประกอบด้วย 3 ชนิดคือ CyclinD1 D2 และ D3 จริงๆ แล้ว CyclinD ทั้ง 3 ชนิดมี ความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างกับ โดย CyclinD2 มีความคล้ายคลึงกับ CyclinD1 62% CyclinD3 มีความคล้ายคลึงกับ CyclinD1 51% .....	44
CyclinD1 มีลักษณะ isoform คือ cyclinD1b เพราะว่ามีกรดอะมิโนของ cyclinD1 บริเวณ กรดอะมิโน 240 ตำแหน่งแรกของโปรตีน .....	44
บทบาทของโปรตีน CyclinD1 .....	44
การศึกษา cyclinD1 ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก.....	50
1.การศึกษาว่าถ้ามีการกลายพันธุ์ EGFR จะพบการเพิ่ม cyclinD1 มากขึ้นหรือไม่ .....	50
2.การศึกษาว่ามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีปริมาณการติดสี CyclinD1 เพิ่มขึ้นด้วย วิธี IHC สัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกใดบ้าง .....	51
บทบาทของการกลายพันธุ์ KRAS กับ CyclinD1 .....	52
<u>การศึกษาในมนุษย์ (Clinical study)เกี่ยวกับมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ KRAS กับ การตอบสนองต่อยาชนิดยับยั้งเอนไซม์ CDK4/6.....</u>	53
บทที่ 3.....	55

วิธีการดำเนินการวิจัย .....	55
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	55
3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology) .....	55
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	55
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน .....	56
3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	62
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) .....	62
บทที่ 4.....	63
ผลการศึกษา.....	63
<u>ผลของวัตถุประสงค์หลัก: ความเข้มข้นการติดสีของ Cyclin D1 กับ การกลายพันธุ์ KRAS</u> ....	63
<u>ผลของวัตถุประสงค์รอง : ข้อมูลพื้นฐาน</u> .....	63
<u>ผลของวัตถุประสงค์รอง : การรอดชีวิตกับการกลายพันธุ์ KRAS</u> .....	64
บทที่ 5.....	71
อภิปรายผลการศึกษา.....	71
บทที่ 6.....	74
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ .....	74
6.1 ข้อสรุปการศึกษาและการประยุกต์ผลการวิจัย.....	74
6.2 ข้อจำกัดในการศึกษา .....	75
6.3 จุดแข็งในการศึกษา .....	75
6.4 ข้อเสนอแนะในการทำการศึกษาต่อไปในอนาคต .....	76
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก (Appendix) .....	91

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 94



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญแผนภูมิรูป

แผนภูมิรูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
แผนภูมิรูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	61
แผนภูมิรูปที่ 3 แสดงแผนผังแสดงการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (consort diagram).....	65
แผนภูมิรูปที่ 4 แสดงแผนภาพแบบกล่อง (Box Plot) เปรียบเทียบแนวโน้มความเข้มข้นของ CylinD1 ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์เคราส.....	69
แผนภูมิรูปที่ 5 กราฟการรอดชีวิตแยกตามระยะยะเปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS วิเคราะห์โดย log-rank test.....	70

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงความอุบัติการณ์ของความผิดปกติของยีนในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ในชาวตะวันตกและชาวเอเชีย (ดัดแปลงจาก Dearden และคณะ <sup>6</sup> ) .....	10
ตารางที่ 2 แสดงชนิดของมะเร็งปอด .....	14
ตารางที่ 3 แสดงการย้อมเพื่อแยกชนิดของมะเร็งปอด .....	17
ตารางที่ 4 แสดงการย้อมเพื่อแยกชนิดของมะเร็งปอดปฐมภูมิที่ลุกลามมาที่ปอด .....	18
ตารางที่ 5 ระยะ TNM ตาม AJCC ฉบับที่ 8 .....	19
ตารางที่ 6 ความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน .....	33
ตารางที่ 7 แสดงการกลายพันธุ์ที่พบร่วมกันกับการกลายพันธุ์ KRAS ในมะเร็งปอดชนิด Adenocarcinoma (ดัดแปลงจาก Dearden และคณะ <sup>6</sup> ) .....	39
ตารางที่ 8 แสดงออกประกอบของสารทำปฏิกิริยาเพื่อหาการกลายพันธุ์ KRAS .....	58
ตารางที่ 9 การแปลผลการทดสอบการกลายพันธุ์ KRAS โดยวิธี Cobas .....	58
ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลพื้นฐาน .....	67
ตารางที่ 11 แสดงความเข้มข้นของการติดเชื้อคลินดีวัน .....	68

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 แสดงลำดับเวลาการค้นพบยีนโคราส กับมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก .....	36
รูปภาพที่ 2 ลำดับการส่งทอดสัญญาณของ RAS pathway.....	38
รูปภาพที่ 3 วัฏจักรเซลล์ซึ่งถูกควบคุมโดย cyclin-dependent kinases (CDKs) และ cyclin ...	42
รูปภาพที่ 4 แสดงหน้าที่และตำแหน่งที่อยู่ของ cyclinD1 (ดัดแปลงจาก Oliver และคณะ <sup>13</sup> )....	45
รูปภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นการทำงานและหน้าที่ของ CDK-Cyclin complex (ดัดแปลงจาก Musgrove และคณะ <sup>102</sup> ) .....	45
รูปภาพที่ 6 แสดงกระบวนการที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีนไซคลินดีวันในมะเร็ง .....	48
รูปภาพที่ 7 แสดงบทบาทหน้าที่ของ cyclinD1 ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยทำงานเป็นอิสระไม่ได้เกี่ยวกับการทำงานร่วมกับ CDK.....	49
รูปภาพที่ 8 : ภาพผลลัพธ์ของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ รูปภาพ 8A (บน) ภาพขยาย 200 เท่าของรอยละการย้อมติตไซคลินดีวัน รูปภาพ 8B ภาพขยาย 600 เท่า แสดงความเข้มในการติดสีเป็นสี่ระดับ (3+ strong, 2+: intermediate, 1+: weak, 0: none).....	66

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

มะเร็งเกิดจากความผิดปกติของการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (normal growth regulation) การเปลี่ยนสภาพให้มีลักษณะจำเพาะต่อเซลล์ (differentiation) รวมถึงการควบคุมการแบ่งตัวเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) การเข้าสู่วัยชรา (senescence) หรือการตายของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งปอดเกิดจากการเปลี่ยนแปลง ระดับเซลล์ที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ซึ่งจะต้องเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่ทำให้เกิดการกระตุ้น (activate) ยีนมะเร็ง (oncogene) และเกี่ยวกับการยับยั้ง (inactivate) ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) แล้วส่งผลให้มีการเจริญเติบโตผิดปกติจนกลายเป็นมะเร็ง<sup>1</sup>

มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตายมากที่สุดของโลกและเป็นอันดับสองในประเทศไทย รองจากมะเร็งตับ<sup>2</sup> ซึ่งมะเร็งปอด สามารถแบ่งออกเป็นหลายชนิดตามลักษณะของเซลล์ โดยประมาณ 80% เป็นแบบไม่ใช้เซลล์เล็ก (non-small cell lung carcinoma) และส่วนใหญ่ของผู้ป่วยชนิดนี้เป็นระยะที่สี่ หรือระยะแพร่กระจายตั้งแต่การวินิจฉัย<sup>2</sup>

#### การกลายพันธุ์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

ลักษณะของมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ (mutation) ของพันธุกรรม (oncogene) ที่พบบ่อยคือ อีพีเดอร์มอลรีเซปเตอร์ (epidermal growth factor receptor :EGFR) และ เคราส (Kirsten rat sarcoma oncogene : KRAS) ซึ่งในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาการรักษามะเร็งปอดระยะแพร่กระจาย นอกเหนือจากการรักษาอื่นที่ไม่ใช่ยาเคมีบำบัดก็คือการรักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) ด้วย ยาต่อต้านเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase inhibitor : TKI) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง EGFR ส่งผลให้มีประสิทธิภาพดีกว่ายาเคมีบำบัด คือ ทำให้ผู้ป่วยที่มีค่าเฉลี่ยของการดำเนินของโรคเป็นระยะเวลา 2 ปี<sup>3</sup> แต่ยาสำหรับการกลายพันธุ์ของ KRAS กำลังอยู่ระหว่างการศึกษานำมาใช้จริง

สำหรับการกลายพันธุ์ KRAS ในมีความชุกในผู้ป่วยเนื้อเยื่อมะเร็งปอดแบบเซลล์ไม่เล็ก ประมาณ 25-35%ในชาวตะวันตก และ11.2% ในผู้ป่วยชาวเอเชีย<sup>4</sup> แต่สำหรับประเทศไทยพบ

22%<sup>5</sup> และพบมากในมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) พบในคนสูบบุหรี่มากกว่าไม่สูบบุหรี่ และพบในคนตะวันตก (25-35%) มากกว่าคนไทย (10%)<sup>6</sup>

ความสำคัญของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* คือ มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่าชนิด *EGFR* คือ 43 และ 55 เดือนตามลำดับ<sup>7</sup> และอาจมีความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งชนิดที่ 2 ที่มากขึ้น 2.76 เท่า<sup>7,8</sup> อีกทั้งยังเป็นปัจจัยการดำเนินโรค (prognostic factor) และปัจจัยที่ทำนายผลการรักษา (predictive factor) เป็นลบ เมื่อรักษาด้วยยา TKI คือ ยา gefitinib และ erlotinib<sup>9-11</sup>

ความผิดปกติของ *KRAS* เป็นการกลายพันธุ์แบบจุดเดี่ยว (point mutation) คือ มีการกลายพันธุ์บริเวณกรดอะมิโนที่ G12C (40%) G12V (21%) G12D (17%) G12A (7%) และ G13 (12%)<sup>4</sup> การกลายพันธุ์นี้จะทำให้เกิดการบกพร่องของการทำงานของเอนไซม์ GTPase ซึ่งจะนำไปสู่การถ่ายทอดสัญญาณทำให้ก้อนมะเร็งต่อไป

สำหรับการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษามะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ที่มีผลการศึกษาระยะที่ 1 ที่น่าพอใจ คือ ยาอะเบมาซิคลิบ (abemaciclib) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (disease control rate : DCR) ได้ถึง 55% เทียบกับไม่กลายพันธุ์ *KRAS* 31% มีระยะปลอดโรค 6 เดือน (progression free survival : PFS) สูงถึง 26%<sup>12</sup>

ยา abemaciclib เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีดีเคสี่ (Cyclin-dependent kinase 4 : CDK4) และซีดีเคหก (Cyclin-dependent kinase 6: CDK6) ซึ่งโดยปกติแล้ว CDK4/6 จะมีปฏิกริยากับ ไซคลินดีหนึ่ง (cyclin D1) เกิดเป็นคู่ CDK4-CyclinD1 และ CDK6-CyclinD1 และจะทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีนเรตินอบลาสโตมาจีน (retinoblastoma gene) ซึ่งออกฤทธิ์เป็นยีนที่ยับยั้งการก่อมะเร็ง (tumor suppressor gene) และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จากระยะจีหนึ่ง (G1 phase) เป็นเอส (S phase) ถ้ามีการทำงาน (activity) ของ CDK4/6 มากผิดปกติ จะทำให้เกิดการห้ามกระบวนการแก่ (senescence) ของเซลล์ทำให้เปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นมะเร็งได้

อีกทั้งการทดลองในหลอดทดลองทำให้เห็นว่าถ้าปริมาณของ CyclinD1 ลดลง จะทำให้เซลล์มะเร็งลดการแบ่งตัวลงเช่นกัน ดังนั้นยา abemaciclib ที่ยับยั้งการทำงานของ CDK4/6 จึงสามารถควบคุมโรคมะเร็งได้

จากการศึกษาเกี่ยวกับเนื้อเยื่อมะเร็งปอดแบบเซลล์ไม่เล็ก พบว่าจะมีการแสดงออกของ CyclinD1 เพิ่มมากขึ้น (overexpression) 17-76%<sup>13-15</sup> และยีนที่ควบคุมการสร้าง cyclinD1 คือ *CCND1* gene เพิ่มมากขึ้น (amplification) 5-30%<sup>13, 14</sup> และที่อุบัติการณ์ของ *CCND1*



amplification พบน้อยกว่า cyclinD1 overexpression เพราะว่าปริมาณของ cyclinD1 สามารถที่จะเพิ่มขึ้นได้จากหลายกลไกนอกเหนือจาก *CCND1* amplification อาทิเช่น การกลายพันธุ์ *KRAS* ได้อีกด้วย

จากการศึกษา<sup>16</sup> ก่อนหน้ามีการศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ว่าใน *KRAS* mutation จะพบว่ามีปริมาณของ *CCND1* overexpression มากกว่า wild type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังไม่มีการศึกษาว่า ในมะเร็งปอดที่มี *KRAS* mutation กับ wild type ว่ามีการแสดงออกของ cyclinD1 เป็นอย่างไร ซึ่งถ้าเกิดว่าเราทราบถึงปริมาณของระดับ cyclin D1 ว่ามีความแตกต่างกัน อาจจะทำให้ในอนาคตแพทย์สามารถเลือกตรวจ cyclinD1 ที่มีราคาถูกลงกว่า *CCND1* gene เพื่อใช้เลือกในการรักษาด้วยยา CDK4/6 inhibitor ในอนาคตต่อไป

## 1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question)

### คำถามหลัก (Primary research question)

ระดับเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของระดับ cyclin D1 ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์และไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราส มีความแตกต่างกันเกิน 20% หรือไม่

### คำถามรอง (Secondary research question)

ลักษณะทางคลินิกที่พบในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์และไม่มีการกลายพันธุ์ของเคราสมีความแตกต่างกันเกิน 20% หรือไม่

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

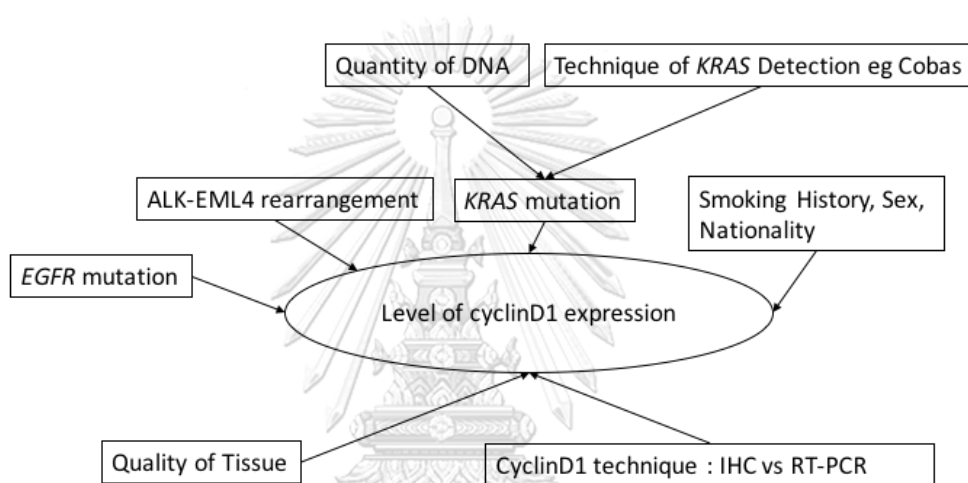
1.3.1 วัตถุประสงค์หลัก เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับ cyclin D1 ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ของ *KRAS* และไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS*

1.3.2 วัตถุประสงค์รอง เพื่อศึกษาลักษณะทางคลินิก อัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยที่ป่วยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ของ *KRAS* และไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS*

#### 1.4 สมมุติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

- H0 - ระดับของcyclin D1ของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ไม่มีความแตกต่างเกิน 20% เมื่อเปรียบเทียบกับไม่มีการกลายพันธุ์
- H1 - ระดับของ cyclin D1 ของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มีความแตกต่างเกิน 20% เมื่อเปรียบเทียบกับไม่มีการกลายพันธุ์

#### 1.5 กรอบความคิดในงานวิจัย (Conceptual framework)



แผนภูมิรูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย

#### 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ระดับของ cyclin D1 ในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่เล็กไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา หากไม่มีการให้ยาต้านมะเร็ง

#### 1.7 คำสำคัญ (Key words)

- cyclin D1
- non small cell lung cancer
- Kirsten rat sarcoma mutation

### 1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition)

1. เนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก คือ เนื้อเยื่อพยาธิวิทยาเป็นชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก
2. ระดับ cyclin D1 overexpression คือ มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีย้อม cyclinD1 ต่อ 100 เซลล์ โดยที่มีการให้คะแนนการติดสีออกเป็น 3,2,1,0 ตามลำดับ
3. การกลายพันธุ์ *KRAS* คือ ยีนที่มีการกลายพันธุ์ทำให้เป็นยีนก่อมะเร็ง
4. จากหัวข้อวิจัยที่ว่า “ความแตกต่างของการแสดงออกของระดับไซคลินดีวันในชิ้นเนื้อ มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ของ *KRAS*” หมายถึง ความแตกต่างของ ร้อยละของการติดสี เพราะว่าการนับการติดสีออกเป็นร้อยละของแต่ละชิ้นเนื้อเกิดจากสูตร  $((1 \times (\% \text{ cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ cells } 3+))/300) \times 100$  ดังนั้น ความแตกต่างคือ ค่าเฉลี่ยร้อยละของชิ้นเนื้อที่มีการกลายพันธุ์คราสที่ติด cyclin D1 (คาดว่าติดสีมากกว่า) หักลบ กับ ค่าเฉลี่ยร้อยละของชิ้นเนื้อที่ไม่มี การกลายพันธุ์คราสที่ติด cyclin D1 (คาดว่าติดสีน้อยกว่า)

### 1.9 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบขวาง (Cross sectional study)

### 1.10 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1. ค้นหาชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดไม่เซลล์ไม่เล็กที่เคยส่งตรวจที่ศูนย์จุฬายีนโปรว่ามีจำนวน เท่าไหร่ และที่มีไม่พบ การกลายพันธุ์ *EGFR* และ *EML4-ALK rearrangement*
2. ส่งตรวจชิ้นเนื้อด้วยเพื่อหา *KRAS* ด้วยวิธี Cobas ว่ามีหรือไม่
3. นำชิ้นเนื้อที่ตรวจพบว่า มีหรือไม่ *KRAS* mutation ส่งตรวจ Immunohistochemistry ด้วย monoclonal Ab ต่อ nuclear cyclin D1
4. นับ % การติดของนิวเคลียส ของ protein cyclin D1 โดยพยาธิแพทย์ไม่ทราบผลตรวจ *KRAS* ค้นหาและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกของผู้ป่วยจากเวชระเบียน
5. วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกและวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของชิ้นเนื้อที่มีและไม่มี *KRAS* mutation

### 1.11 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations)

ครอบคลุมหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 4 ข้อ ได้แก่

1. หลักการเคารพในบุคคล (respect of person) คือ ไม่มีการเปิดเผยชื่อหรือเลขที่โรงพยาบาล (HN ; hospital number) ของผู้ป่วย รวมถึงรักษาความลับของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาไม่สามารถย้อนกลับไปสู่การระบุตัวผู้ป่วยได้
2. มีการขอคำยินยอมจากผู้ป่วยก่อนการเก็บชิ้นเนื้อตรวจเพิ่มเติม
3. หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาในชิ้นเนื้อเนื้องอกที่มีอยู่แล้วจึงไม่มีความเสี่ยงต่อผู้ป่วย
4. หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยในโครงการชัดเจน
5. มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน

### 1.12 ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

1. การวิจัยเป็นแบบการศึกษาแบบขวางจากชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ก่อนเดิม ดังนั้นอาจจะมีชิ้นเนื้อที่ไม่ได้เก็บไว้หรือชิ้นเนื้อเสียคุณภาพ
2. ชิ้นเนื้ออาจจะมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการย้อมระดับการติดสีความเข้มข้น cyclin D1
3. ข้อมูลจากเวทระเบียนอาจไม่ครบถ้วนและไม่สามารถควบคุมปัจจัยกวนได้ เช่น ผู้ป่วยไม่ได้ตรวจโดยแพทย์คนเดียว การนัดตรวจติดตามเป็นระยะเวลาต่างกัน อาจทำให้การประเมินการกลับเป็นซ้ำของโรคแตกต่างกัน

### 1.13 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefits and application)

ทำให้เกิดความรู้ถึงระดับความเข้มข้นของการติดสีที่ cyclinD1 ที่นิวเคลียสที่มีความแตกต่างกันใน มะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์และไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS ซึ่งถ้าระดับแตกต่างกันมากอาจจะสามารถนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจในการรักษาในอนาคตได้

### 1.14 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem)

ถ้าปริมาณประชากรที่ศึกษาไม่เพียงพอ อาจจะต้องขยายเวลาการศึกษา

## บทที่ 2

### ปริทัศน์วรรณกรรม

#### บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ( Review of related literatures)

##### บทนำ

มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นๆ และมักจะพบในระยะที่ 4 โดยที่ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงสาเหตุการเกิดโรค ที่รวมถึงการเปลี่ยนแปลงระดับยีน และโปรตีนที่มีความผิดปกติ และส่งเสริมทำให้เกิดเป็นมะเร็งปอด การกลายพันธุ์ *KRAS* เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งปอดชนิดไม่เล็ก แต่ความพยายามในการหายรักษาโดยใช้หลักการยับยั้งตรงตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จเหมือนกับการค้นพบยายับยั้ง Tyrosine kinase ของการกลายพันธุ์ *EGFR* เป็นต้น การค้นพบว่าการกลายพันธุ์ *KRAS* จะทำให้เกิดการสร้างของโปรตีน CyclinD1 ที่มีความสำคัญในการแบ่งเซลล์เมื่อมีการทำงานร่วมกับ CDK4 และ CDK6 ร่วมกับ CyclinD1 ยังสามารถที่จะกระตุ้นหลายกระบวนการที่ทำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัว และมีคุณสมบัติไม่เกิด apoptosis ได้ ทำให้เกิดสมมติฐานว่าการยับยั้งการทำงานของสารประกอบเชิงซ้อน CyclinD1 และ CD4/6 จะสามารถมะเร็งปอดได้ แต่หลักฐานการเชิงเปรียบเทียบระหว่างการพบ CyclinD1 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ยังไม่ได้มีหลักฐานชัดเจน จึงเป็นที่มาของงานวิจัยฉบับนี้

เนื่องจากการศึกษาที่ใช้ชิ้นเนื้อที่นำมาจากผู้ป่วยตั้งแต่วะยะที่ 1 ถึง 4 รวมทั้งมีการเก็บข้อมูลพื้นฐาน การดำเนินของโรค การรักษาทั้งการผ่าตัด ฉายแสง การให้ยาเคมีบำบัด และการดำเนินของโรคจนเสียชีวิต ทางผู้นิพนธ์จึงได้ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องตั้งแต่ ปัจจัยเสี่ยงสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปอด อาการและอาการแสดง แนวทางการคัดกรอง วิธีการวินิจฉัยมะเร็งปอด การแบ่งประเภทของมะเร็งปอดตามประเภทของชิ้นเนื้อ นิยามของระยะต่างๆ ของโรคตาม TNM staging และแนวทางการรักษาตามระยะของโรคที่เป็นมาตรฐานเพราะว่าเป็นข้อมูลที่ใช้ประกอบการจัดทำแบบเก็บข้อมูลผู้ป่วย (case record form) อีกทั้งยังทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยฉบับนี้ โดยได้ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับ

- 1.การกลายพันธุ์คราสในมะเร็งทั่วไปๆ
- 2.การกลายพันธุ์คราสในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
- 3.การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง หน้าที่ของโปรตีนไซคลินดีวัน

4. การศึกษาที่เกี่ยวข้องระหว่างการกลายพันธุ์โครมาตและโปรตีนไซคลินดีวันมีความเกี่ยวข้องกันอย่างไร

จนทำให้เกิดคำถามของงานวิจัยฉบับนี้เพื่อพิสูจน์ว่าความเข้มข้นการติดสีของโปรตีนไซคลินดีวันในเซลล์มะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์โครมาตกับไม่มีการกลายพันธุ์โครมาตมีความแตกต่างกันเกิน 20% หรือไม่

### ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็งปอด

1. การสูบบุหรี่ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดมะเร็งปอดที่สำคัญที่สุด ไม่ว่าจะเป็นการสูดด้วยตัวเอง (active smoker) หรือเป็นการสูดดมควันบุหรี่ของผู้อื่นเข้าไป (passive smoker)<sup>17</sup> มีรายงานว่าปริมาณของการสูบบุหรี่ที่มากกว่า 20 ซองปี สามารถเพิ่มโอกาสการเป็นมะเร็งปอด ดังนั้นถ้าลดการสูบบุหรี่ลงร้อยละ 50 หรือหยุดสูบบุหรี่ ก็จะทำให้ลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งปอดได้ร้อยละ 27-28<sup>18, 19</sup>

2. แร่ใยหิน (asbestos) ซึ่งสามารถพบได้ตามโรงงานอุตสาหกรรมที่ทำนวนกันความร้อนเหมือนแร่ใยหิน ซึ่งความเสี่ยงจะเพิ่มมากขึ้นแม้จะหยุดสัมผัสแร่ใยหินไปแล้วเป็นเวลา 10-15 ปีก็ตาม<sup>20, 21</sup>

3. ก๊าซเรดอน (Radon gas) เป็นก๊าซที่เกิดจากการสลายของสาร Uranium-238 และ Radium-226 โดยก๊าซที่ทำให้เกิดการทำลายเยื่อทางเดินหายใจ ทำให้ผู้ที่ต้องสูดดมก๊าซนี้เป็นเวลานานจะทำให้เกิดความเสี่ยงเป็นมะเร็งปอด เช่น ผู้ที่ทำงานในเมืองแร่ยูเรเนียม<sup>21, 22</sup>

4. ควันจากการประกอบอาหาร หรือความร้อน (smoke from cooking and heating) เช่น ควันที่เกิดจากการเผาถ่านหรือไม้เพื่อประกอบอาหาร หรือเพื่อให้เกิดความอบอุ่น เมื่อได้รับเป็นเวลานานสามารถทำให้เป็นมะเร็งปอดได้<sup>23, 24</sup>

5. ฝุ่นละอองขนาดเล็กกว่า 2.5 ไมครอน (PM 2.5) หากได้รับมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง ปอด 1.3 เท่า<sup>25, 26</sup>

6. ก๊าซชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานว่าอาจจะทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปอดได้ เช่น ไนโตรเจนไดออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์<sup>27</sup>

## การกลายพันธุ์กับมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

นอกเหนือจากปัจจัยเสี่ยงข้างต้นที่ทำให้เกิดมะเร็งปอดได้แล้ว แต่ก็มีผู้ป่วยอีกจำนวนหนึ่งซึ่งตรวจพบความผิดปกติทางพันธุกรรม ดังนี้ พบมากที่สุดคือ

- 1) การกลายพันธุ์ *p53* (*p53* mutation) พบความชุก 50-70%
- 2) ความกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* 10-40%
- 3) การกลายพันธุ์ *KRAS* 10-30%
- 4) การกลายพันธุ์แอลเคบีวัน (*LKB1* mutation) 34%
- 5) การกลายพันธุ์ของยีนเมท (*MET* Mutation) พบ 14% และการเพิ่มขึ้นของยีนเมท (*MET* amplification) พบ 20%
- 6) ความผิดปกติของการเรียงลำดับยีนเอแอลเค (*ALK* fusion) 7%
- 7) การกลายพันธุ์ยีนบีราฟ (*BRAF* mutation) 2%

ซึ่งการกลายพันธุ์ความชุกของการกลายพันธุ์ในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน คือ ในปี พ.ศ. 2546 มีรายงานของ Petmitr S และคณะ<sup>5</sup> พบการกลายพันธุ์ของยีน *HRAS* *KRAS* และ *NRAS* รวมกัน 13 รายจาก 58 ราย (22%) โดยเป็น *KRAS* 12 ราย 10 รายพบการกลายพันธุ์ที่ codon 12 และ 1 รายที่ codon 13 และอีก 1 case ที่ codon 63 และอีก 1 รายเป็นการกลายพันธุ์ยีน *NRAS* จากข้อมูล metanalysis จาก 94 การศึกษา ที่รวบรวมโดย Dearden และคณะ<sup>6</sup> พบว่าการกลายพันธุ์ในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกันในแง่ความชุก ดังตารางที่ 1

Gene abnormalities	Incidence of mutation, n/N (%) ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Adenocarcinoma)	
	ชาวตะวันตก	ชาวเอเชีย
<i>TP53</i>	164/532 (30.8)	325/978 (33.2)
<i>EGFR</i>	940/4890 (19.2)	1492/3117 (47.9)
<i>KRAS</i>	613/2352 (26.1)	236/2114 (11.2)
<i>LKB1</i>	99/610 (16.2)	22/550 (4.0)
<i>EML4-ALK</i>	55/856 (6.4)	71/1326 (5.4)
<i>PTEN</i>	25/419 (6.0)	4/248 (1.6)
<i>BRAF</i>	66/2028 (3.3)	5/321 (1.6)
<i>PIK3CA</i>	6/475 (1.3)	4/235 (1.7)
<i>Erb2</i>	7/505 (1.4)	20/712 (2.8)

ตารางที่ 1 แสดงความอุบัติการณ์ของความผิดปกติของยีนในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ในชาวตะวันตกและชาวเอเชีย (ดัดแปลงจาก Dearden และคณะ<sup>6</sup>)

การกลายพันธุ์ที่เป็นลักษณะเฉพาะพิเศษ (Mutual exclusivity) คือเมื่อมีการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งแล้วจะไม่มีมีการกลายพันธุ์อีกชนิดเข้ามาร่วมด้วย คือ การกลายพันธุ์ *EGFR* การกลายพันธุ์ *KRAS* *EML4-ALK* fusion และการกลายพันธุ์ *BRAF* และมีลักษณะของการเฉพาะแบบของ โคยีน (oncogene addiction)

สำหรับการกลายพันธุ์ที่อาจจะพบได้ร่วมกันตั้งแต่ 5% ขึ้นไปเช่น *TP53* mutation ร่วมกับการกลายพันธุ์ *KRAS* หรือ การกลายพันธุ์ *EGFR* ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาทั้งชาวตะวันตกและตะวันออก พบการกลายพันธุ์ *LKB1* ร่วมกับการกลายพันธุ์ *TP53* ร่วมกับการกลายพันธุ์ *LKB1* ในกลุ่มมะเร็งปอดชนิดสแควร์มีส (Squamous cell carcinoma)

### การตรวจคัดกรองมะเร็งปอด (Lung cancer screening)

แนวทางการดูแลรักษามะเร็งปอดของ The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline ปี 2558<sup>28</sup> ให้คำแนะนำในการตรวจคัดกรองด้วยเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ที่มีความเข้มข้นของปริมาณรังสีต่ำ (Low-dose CT scan) เพียง 2 มิลลิซีเวิร์ท (mSv; millisievert)



เมื่อเทียบกับ 7 mSv สำหรับการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์แบบปกติ ซึ่งการตรวจ low-dose CT scan ควรพิจารณาที่ทำในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งปอดคือ

1. ผู้ที่มีอายุระหว่าง 55-74 ปี ร่วมกับการประวัติการสูบบุหรี่อย่างน้อย 30 ซองปี และกรณีหยุดสูบบุหรี่แต่น้อยกว่า 15 ปี

2. ผู้ที่มีอายุอย่างน้อย 50 ปี ร่วมกับมีประวัติการสูบบุหรี่อย่างน้อย 20 ซองปี และมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปอดอย่างอื่น ๆ ร่วมด้วย นอกเหนือจากการได้รับควันบุหรี่มือสอง (second-hand smoker) อย่างน้อยหนึ่งอย่าง เช่น ประวัติการสัมผัสแอสเบสโตส แร่ใยหิน หรือว่าสารก่อมะเร็งอื่น ๆ หรือว่า มีประวัติเป็นโรคปอดเรื้อรัง เช่น โรคถุงลมโป่งพอง เป็นต้น

หมายเหตุ จำนวนซองปี (pack-year) คำนวณโดย จำนวนบุหรี่ (ซองต่อวัน) คูณด้วยจำนวนปีที่สูบ

### อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งปอด

อาการและอาการแสดงมีความสัมพันธ์กับระยะของโรค ซึ่งผู้ป่วยอาจจะไม่มีอาการแสดง แต่ตรวจพบได้โดยบังเอิญจากการตรวจร่างกายประจำปี หรือว่ามีอาการดังต่อไปนี้

1. อาการไอ (cough) เป็นอาการที่มาพบแพทย์เป็นส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 45-75<sup>29-31</sup> ซึ่งเป็นผลของก้อนมะเร็งเกิดขึ้นอยู่บริเวณทางเดินหายใจส่วนกลาง (central airway) ซึ่งมักจะเป็นชนิดสแควมัสเซลล์ (Squamous cell carcinoma) หรือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell carcinoma) ซึ่งจะทำให้เกิดการระคายเคืองเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนกลาง จึงมักจะมีอาการไอแห้งๆ แต่ถ้ามีลักษณะเป็นไอมีเสมหะเหนียว (mucoïd secretion) อาจเกิดจากมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) เพราะว่ามีเซลล์มะเร็งสามารถสร้างน้ำเมือกได้ และในบางครั้งการไออาจจะเกิดการที่มีปอดอักเสบเพราะว่าก้อนมะเร็งทำให้เกิดการอุดตันของทางเดินหายใจได้ (obstructive pneumonitis)

2. อาการไอมีเลือดปน (hemoptysis) พบได้ร้อยละ 20-50<sup>29-31</sup> ความรุนแรงอาจจะตั้งแต่ไอปนเลือดปริมาณเล็กน้อยซึ่งปนมากับเสมหะหรือว่าไอเป็นเลือดปริมาณจนอุดกั้นทางเดินหายใจจนทำให้เสียชีวิตจากการขาดอากาศหายใจได้ ซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดจากก้อนมะเร็งที่อยู่บริเวณทางเดินหายใจส่วนกลาง

3. อาการหายใจหอบเหนื่อยกว่าปกติ (dyspnea) พบได้ร้อยละ 20-40<sup>29-31</sup> อาจจะทำให้เกิดการก่อมะเร็งกดเบียดหรือลุกลามเข้าทางเดินหายใจ ทำให้ทางเดินหายใจมีขนาดเล็กลง จนเกิด

ภาวะอุดกั้นทางเดินหายใจหรือว่าอาจจะเกิดจากเซลล์มะเร็งสร้างน้ำในเยื่อหุ้มปอด (Pleural effusion) น้ำในเยื่อหุ้มหัวใจ (Pericardial Effusion) ทำให้เกิดการกดเบียดรบกวนการบีบตัวของหัวใจหรือว่าการรับเลือดดำกลับเข้าสู่หัวใจลดลง (pericardial tamponade) หรือมะเร็งเหนียวน้ำทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดกั้นของเส้นเลือดแดงที่เลี้ยงปอด (Pulmonary arterial embolism) หรือเกิดจากมะเร็งลุกลามเข้าท่อน้ำเหลือง (lymphangitis carcinomatosa) เป็นต้น

4.อาการเจ็บแน่นหน้าอก (chest pain) พบได้ร้อยละ 10-40<sup>29-31</sup> เพราะว่าก่อนมะเร็งติดกับบริเวณชายปอด (peripheral lesion) จนเกิดการระคายเคืองต่อเยื่อช่องปอดส่วนนอก (parietal pleura) เกิดเป็นอาการเจ็บแปลบๆ ที่หน้าอกและจะเจ็บมากที่สุดเมื่อมีการหายใจเข้าสุด (pleuritic chest pain) หรือว่าอาจจะเกิดจากภาวะอุดกั้นทางเดินหายใจ หรือว่าอาจจะเกิดจากเซลล์มะเร็งสร้างน้ำในเยื่อหุ้มปอด (Pleural effusion) หรือมะเร็งเหนียวน้ำทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดกั้นของเส้นเลือดแดงที่เลี้ยงปอด (Pulmonary embolism)

5.เสียงแหบ (hoarseness) เกิดเนื่องจากก้อนมะเร็งหรือต่อมน้ำเหลืองช่องอก (mediastinum lymph node) กดเบียดหรือเกิดลุกลามไปที่เส้นประสาทที่ควบคุมการทำงานของกล่องเสียง (recurrent laryngeal nerve)<sup>32-34</sup>

6.ภาวะการอุดตันเส้นเลือดดำใหญ่ (superior venacava syndrome)<sup>35, 36</sup> ซึ่งมักจะเกิดจากมะเร็งที่อยู่ติดกับเส้นเลือด เช่น มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กมากกว่าเซลล์ไม่เล็ก จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการหน้าบวมและมีสีแดงคล้ำเนื่องจากการมีการคั่งของเลือดดำบริเวณใบหน้า ถ้าอุดกั้นเรื้อรังจะเห็นการขยายขนาดของเส้นเลือดบริเวณหน้าอก

7.กลุ่มอาการแพนโคส (Pancoast syndrome) ซึ่งประกอบด้วยปวดบริเวณไหล่และอาจร้าวไปที่สะบักหลังร่วมกับมีกลุ่มอาการฮอร์เนอร์ (Horner Syndrome)<sup>37</sup> เนื่องจากการทำงานที่ผิดปกติของเส้นประสาทซิมพาเทติกบริเวณคอ (cervical sympathetic nerve) จากก้อนมะเร็งที่เกิดบริเวณยอดปอด (superior sulcus tumor) ลุกลามกดและอาจจะทำลายเส้นประสาท brachial plexus และ cervical sympathetic nerve ซึ่งถ้าปล่อยให้เกิดการกดอย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อฝ่อถาวร (Muscle atrophy) ได้

8.กลุ่มอาการพาราเนอพลาสติก (Paraneoplastic syndrome) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่ไม่ได้เกิดจากก้อนมะเร็งไปยังอวัยวะข้างเคียงโดยตรง แต่ว่าเกิดจากฮอร์โมนที่มะเร็งสร้างถูกหลั่งออกมามากกว่าปกติ ซึ่งมักจะพบในมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กมากกว่าเซลล์ไม่เล็ก เช่น

8.1 ภาวะแคลเซียมในเลือดคั่ง (hypercalcemia) เกิดจากการหลั่งฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (PTHrP; parathyroid hormone-related protein) ทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้

อาเจียน ท้องผูก ซึ่ง มีภาวะกระหายน้ำและขาดน้ำมากกว่าปกติ เพราะว่าภาวะคั่งแคลเซียมทำให้เกิดปัสสาวะมากกว่าปกติ ซึ่งถ้าไม่สามารถทดแทนน้ำได้อย่างเพียงพอก็อาจจะทำให้เกิดภาวะไตวายฉับพลันได้<sup>38</sup>

8.2 ภาวะเสียสมดุลการหลังฮอร์โมนต่อต้านการปัสสาวะ (SIADH; syndrome of inappropriate antidiuretic hormone) ทำให้ร่างกายเกิดภาวะโซเดียมต่ำในเลือด (hyponatremia)<sup>39</sup> ทำให้เกิดภาวะเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน รวมทั้งทำให้เกิดภาวะสมองบวมจนเกิดอาการชัก โคม่า หรือว่าภาวะหายใจล้มเหลวได้ ซึ่งอาการนี้สามารถพบได้ทั้งมะเร็งปอด ชนิดเซลล์เล็กและเซลล์ไม่เล็กได้

8.3 กลุ่มอาการทางระบบประสาทอ่อนแรงระบบประสาทการควบคุมพละกำลัง เช่น Lambert-Eaton Myasthenic syndromes (LEMS)<sup>40</sup> ภาวะการควบคุมการเดินผิดปกติ (Cerebellar ataxia)

8.4 ภาวะผิดปกติทางโลหิตวิทยา (Hematologic abnormalities) เช่น ภาวะเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ทั้ง เม็ดเลือดขาว (leukocytosis) เกร็ดเลือด (thrombocytosis) หรือทำให้เกิดภาวะการแข็งตัวของเลือดง่ายมากขึ้น (Hypercoagulable disorders) เช่น การอุดตันเส้นเลือดใหญ่ส่วนลึก เช่น ขา (Deep Vein thrombosis) ภาวะลิ่มเลือดอุดตันที่เส้นเลือดแดงของปอด (Pulmonary arterial embolism) ภาวะการอุดตันเส้นเลือดขนาดเล็ก (DIC; Disseminated intravascular coagulopathy) เกิดภาวะการอักเสบของเส้นเลือด (thrombophlebitis) เนื่องจากการอุดตันของเส้นเลือด (blood clot) ในตำแหน่งต่างๆ เรียกว่า กลุ่มอาการ Trousseau's syndrome

8.5 กลุ่มอาการขยายขนาดของเยื่อหุ้มกระดูก (Periosteal proliferation) ของกระดูกหน้าแข้ง (tubular bones) ร่วมกับมีอาการนิ้วป้อม (clubbing of finger) รวมเรียกว่า hypertrophic osteoarthropathy หรือ HPO<sup>41</sup>

8.6 ภาวะกล้ามเนื้ออ่อนแรงเนื่องจากมีอาการอักเสบ (Polymyositis) ซึ่งถ้ามีลักษณะความผิดปกติของผิวหนัง เช่น ผื่นแดงขึ้นที่บริเวณข้อนิ้วมือ รวมด้วยเรียกว่า dermatomyositis

8.7 กลุ่มอาการคุชชิง (Cushing's syndrome) เนื่องจากการหลั่งของฮอร์โมน Adrenal corticotropin (ACTH) ทำให้เกิดผู้ป่วยมีภาวะความดันโลหิตสูง ผมร่วง กระดูกบาง หน้ากลมเป็นดั่งพระจันทร์ (moon face appearance)

### ชนิดของเซลล์มะเร็งปอด (Histology)

ชนิดของเซลล์มะเร็งปอดสามารถแบ่งออกตามการแยกขององค์การอนามัยโลกประจำปี พ.ศ. 2558 ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของมะเร็งปอด

Histologic Type and Subtype		
	Type	Subtype
A. Epithelial tumor	Adenocarcinoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Lepidic adenocarcinoma</li> <li>-Papillary adenocarcinoma</li> <li>-Invasive mucinous adenocarcinoma</li> <li>-Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma</li> <li>-colloid adenocarcinoma</li> <li>-Acinar adenocarcinoma</li> <li>-Micropapillary adenocarcinoma</li> <li>-Solid adenocarcinoma</li> <li>-Fetal adenocarcinoma</li> <li>-Enteric adenocarcinoma</li> <li>-Minimally invasive adenocarcinoma</li> <li>-Preinvasive lesions แบ่งออกเป็น               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Atypical adenomatous hyperplasia</li> <li>2. Adenocarcinoma in situ ( non-mucinous/Mucinous)</li> </ol> </li> </ul>

Histologic Type and Subtype		
	Type	Subtype
	Squamous cell carcinoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Keratinizing Squamous cell carcinoma</li> <li>-Non-Keratinizing Squamous cell carcinoma</li> <li>-Basaloid Squamous cell carcinoma</li> <li>-Preinvasive lesion squamous cell carcinoma in situ</li> </ul>
A.Epithelial tumor (ต่อ)	Neuroendocrine tumor	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Small cell carcinoma</li> <li>-Large cell neuroendocrine carcinoma</li> <li>-Carcinoid tumor (Typical/atypical)</li> <li>-Preinvasive lesion</li> <li>-diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia</li> </ul>
	Large cell carcinoma	
	Adenosquamous carcinoma	
	Sarcomatoid carcinomas	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pleomorphic carcinoma</li> <li>-Giant cell carcinoma</li> <li>-Pulmonary blastoma</li> <li>-Spindle cell carcinoma</li> <li>-Carcinosarcoma</li> </ul>

Histologic Type and Subtype		
	Type	Subtype
	Other and unclassified carcinoma	-Lymphoepithelioma-like carcinoma -NUT carcinoma
	Salivary gland-type tumors	-Mucoepidermoid carcinoma -Epithelial-myoeepithelial carcinoma -Adenoid cystic carcinoma -Pleomorphic adenoma
B.Mesenchymal tumors	-PEComa -Malignant synovial sarcoma -Pulmonary artery intimal sarcoma -Myoepithelial carcinoma	
C.Lymphohistiocytic tumors C.Lymphohistiocytic tumors	-MALT lymphoma -Diffuse large cell lymphoma -Lymphomatoid agranulomatosis -Intravascular large B cell lymphoma -Pulmonary Langerhans cell histiocytosis -Erdheim-Chester disease	

Histologic Type and Subtype		
	Type	Subtype
D.Tumor of ectopic origin	-Immature teratoma -Intrapulmonary thymoma -Melanoma -Meningioma, NOS	
E.Metastatic tumors		

ดัดแปลงจาก Willian D. Travis et al. J Thorac Oncol. 2015; 10: 1243-1260<sup>42</sup>

ในกรณีที่มีลักษณะเซลล์เป็น poorly differentiated cell ซึ่งทำให้แยกยากระหว่าง adenocarcinoma หรือว่าเป็น squamous cell carcinoma จึงต้องใช้วิธีการย้อมติดสี (IHC; immunohistochemical stain) ได้แก่การย้อมด้วย TTF-1 (Thyroid transcription factor 1) NapsinA และ p63 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการย้อมเพื่อแยกชนิดของมะเร็งปอด  
ระหว่าง adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma

	TTF-1	Napsin A	p63
Adenocarcinoma	+	+	-
Squamous cell carcinoma	-	-	+

+ หมายถึง ย้อมติดสี (positive) - หมายถึง ย้อมไม่ติดสี (negative)

\* หมายถึง อาจพบว่าผลเป็นลบได้บ้างในบางราย

ปอดมักจะเป็นอวัยวะที่ได้มีการกระจายมะเร็ง (metastatic site) มาจากมะเร็งตั้งต้น (primary cancer) อื่นๆ มากกว่ามาจากปอดเอง (primary lung cancer) ดังนั้นในบางครั้งเมื่อผลชิ้นเนื้อบ่งชี้ว่าเป็นเนื้อมะเร็งที่กระจายมาจากที่อื่น เราอาจใช้วิธีการย้อม IHC เพื่อช่วยในการวินิจฉัยแยกโรค ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการย้อมเพื่อแยกชนิดของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ที่ดูกลายมาที่ปอด

อวัยวะหลัก	CK7	CK20	TTF-1	CDX2	GCDFP-15	CEA	Mucin
ปอด	+	-	±	-	-	-	MUC5AC -
เต้านม	+	-	-	-	+ หรือ ER +	-	-
ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง	-	±	-	+	-	+	MUC2+
กระเพาะ อาหาร	+	-	-	+			
รังไข่	+		-	-	-	-	MUC5AC+
ระบบท่อ น้ำดีและตับ อ่อน	+	-	-	-		+	MUC5AC+

CK = cytokeratin, TTF-1 = Thyroid transcription factor, GCDFP = Gross cystic disease fluid protein, CEA = carcinoembryonic antigen, ER = estrogen receptor

(ดัดแปลงจาก Park และคณะ<sup>43</sup>)

### ระยะของมะเร็งปอด (Lung cancer staging) มหาวิทยาลัย

หลักการแบ่งระยะของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (NSCLC) มีความแตกต่างกับเซลล์เล็ก (small cell lung carcinoma) ซึ่ง NSCLC มีการแบ่งเหมือนกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ คือการใช้ระบบ TNM staging system ปัจจุบันการนำระยะตาม TNM staging system สามารถนำมาใช้รักษาผู้ป่วยรวมทั้งในการศึกษาวิจัยอาศัยการแบ่งตาม 8<sup>th</sup> edition ของสมาคมที่มีชื่อว่า the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) ตามตารางที่



ตารางที่ 5 ระยะ TNM ตาม AJCC ฉบับที่ 8

Primary tumor (T)	
Tx	พบเซลล์มะเร็งจากการตรวจเสมหะหรือการทำ bronchial washing แต่ไม่พบ ก่อนจากภาพถ่ายรังสี หรือการส่องกล้องทางเดินหายใจ (bronchoscope)
T0	ไม่พบก้อนมะเร็งปอด
Tis	Carcinoma in situ
T1	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง < 3 ซม. ล้อมรอบด้วยเนื้อปอดหรือเยื่อหุ้มปอด ชนิดภายใน (visceral pleura) และก้อนไม่ลุกลามเข้ามาใน main bronchus
T 1a (mi)	พบก้อนมะเร็งหนึ่งก้อนที่มีขนาดไม่เกิน 3 ซม. ร่วมกับผลทางพยาธิวิทยาเป็น Adenocarcinoma with a predominately lepidic pattern และมีลักษณะของ invasion ที่บริเวณใดๆ ของก้อนมีขนาดไม่เกิน 5 มม. (Minimally invasive adenocarcinoma)
T1a	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $\leq 1$ ซม.
T1b	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 1 ซม. แต่ไม่เกิน 2 ซม.
T1c	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 2 ซม. แต่ไม่เกิน 3 ซม.
T2	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 3 ซม. แต่ไม่เกิน 5 ซม. หรือก้อนมีขนาดเท่าใดก็ได้ ได้แต่มีลักษณะดังต่อไปนี้ 1. มีการลุกลามไปที่ main bronchus โดยอยู่ห่างจากทางแยกขั้วปอด(carina) เท่าใดก็ได้แต่ไม่ลุกลามไปถึง carina หรือ 2. ก้อนลุกลามไปยัง visceral pleura หรือ 3. มีภาวะปอดแฟบ (Atelectasis) หรือ ปอดอักเสบเนื่องจากการอุดตัน (obstructive pneumonitis) ที่ลุกลามไปยังบริเวณขั้วปอด (hilum region) อาจ เกิดเฉพาะบางกลีบปอด (lobar lesion) หรือว่าทั้งปอดทั้งข้างก็ได้ (entire lung)
T2a	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 3 ซม. แต่ไม่เกิน 4 ซม.
T2b	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 4 ซม. แต่ไม่เกิน 5 ซม.
T3	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 5 ซม. แต่ไม่เกิน 7 ซม. หรือมีภาวะดังต่อไปนี้

Primary tumor (T)	
	ก้อนลุกลามไปยัง ผนังหน้าอก (chest wall) เส้นประสาทพรีนิค(phrenic nerve) เยื่อปอดฝั่งติดกับช่องกลางอก (Mediastinal pleura) เยื่อหุ้มหัวใจ ด้านนอก (Parietal pericardium) หรือลุกลามยัง main bronchus และอยู่ห่างจาก carina น้อยกว่า 2 ซม. หรือ มีภาวะปอดแฟบ (atelectasis) หรือปอดอักเสบเนื่องจากการอุดตัน (Obstrcutive pneumonitis) ของปอดทั้งข้าง (entire lung) หรือ มีก้อนอื่นๆ อีกแต่อยู่ภายใน กลัปอดเดียวกันทั้งหมด
T4	ก้อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 7 ซม. หรือขนาดเท่าใดก็ได้แต่มีการลุกลามไปยัง อวัยวะส่วนกลางของช่องอก (mediastinum) กระบังลม (diaphragm) หัวใจ (heart) เส้นเลือดใหญ่ (great vessels) หลอดลมใหญ่ (trachea) เส้นประสาทควบคุมกล่องเสียง (recurrent laryngeal nerve) หลอดอาหาร (esophagus) กระดูกสันหลัง (vertebral body) carina หรือว่ามีก้อนอื่นๆ อีกแต่อยู่อีกกลัปอดในข้างเดียวกัน (different ipsittlateral lobe)

ต่อมน้ำเหลืองในบริเวณเดียวกัน (regional lympho node หรือ N )	
N0	ไม่มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง
N1	มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณ peribronchial และ/หรือ hilar หรือภายในปอด (intrapulmonary) ข้างเดียวกันกับก้อนมะเร็ง รวมถึงก้อนมะเร็งที่ลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณนั้นโดยตรง (direct extension)
N2	มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณ mediastinum และหรือ ใต้ทางแยกของขั้วปอด (subcarina) ข้างเดียวกับก้อนมะเร็ง
N3	มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณ mediastinal, hilar ข้างตรงข้ามกับก้อนมะเร็งหรือกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณสะกาดีน(scalene) หรือเหนือกระดูกไหปลาร้า (supraclavicular) ข้างเดียวกัน หรือข้างตรงข้ามกับก้อนมะเร็ง

การกระจายไปยังอวัยวะอื่น (Distant metastasis หรือ M)	
M0	ไม่มีการกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ
M1	มีการกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ
M1a	มีก้อนอื่นๆ เกิดขึ้นที่กลีบปอดด้านตรงข้ามหรือมีก้อนที่เยื่อหุ้มปอด หรือมีการสร้างน้ำเยื่อหุ้มปอดเนื่องจากมะเร็ง (malignant pleural effusion) หรือ มีน้ำเยื่อหุ้มหัวใจเนื่องจากมะเร็ง(malignant pericardial effusion)
M1b	มีการกระจายไปยังอวัยวะอื่นที่อยู่นอกทรวงอกเพียงก้อนเดียวและอวัยวะเดียว (single extrathoracic metastasis) รวมถึงมีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ห่างไกล (single of distant (nonregional) lymph node)
M1c	มีการกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ที่อยู่นอกทรวงอกหลายก้อน อาจกระจายไปเพียงอวัยวะเดียวหรือมากกว่า หนึ่งอวัยวะก็ได้ (Multiple extrathoracic metastases in one or more organs)

ระยะของโรค (stage) ตามตารางที่ 5

(ดัดแปลงจาก Goldstraw et al. J Thorac Oncol 2016<sup>44</sup>)

Stage	T	N	M
0	Tis	0	0
IA1	1a (mi)	0	0
	1a	0	0
IA2	T1b	0	0
IA3	T1c	0	0
IB	2a	0	0
IIA	2b	0	0
IIB	1a,1b,1c	1	0
	2a	1	0
	2b	1	0
	3	0	0

Stage	T	N	M
IIIA	1a, 1b,1c	2	0
	2a,2b	2	0
	3	1	0
	4	0	0
IIIB	1a, 1b,1c	3	0
	3	2	0
	4	2	0
IIIC	3	3	0
	4	3	0
IVA	AnyT	AnyT	1a
	AnyT	AnyN	1b
IVB	AnyT	AnyN	1c

### การวินิจฉัยมะเร็งปอด

การวินิจฉัยมะเร็งปอดต้องอาศัยทั้งการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ภาพถ่ายรังสี และการทำหัตถการเพื่อให้ได้ผลชิ้นเนื้อหรือเซลล์มะเร็ง

การซักประวัติ ตรวจร่างกาย และผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ<sup>45</sup>

อาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งปอดได้กล่าวไว้แล้วในตอนต้น สำหรับประวัติและการตรวจร่างกาย ส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่ความรุนแรงหรือการกระจายของโรค เช่น

ประวัติน้ำหนักลด มากกว่าร้อยละ 5 ภายในเวลา 1 เดือนหรือมากกว่าร้อยละ 7.5 ภายในเวลา 3 เดือนหรือมากกว่าร้อยละ 10 ภายในเวลา 6 เดือน<sup>46</sup>

ประวัติอาการปวด ตามบริเวณต่างๆ เช่น แขน ขา กระดูกสันหลัง เพราะว่าอาจจะมีการบ่งชี้ได้ถึงมีการกระจายไปยังกระดูกส่วนนั้น หรืออาการของการทำงานของสมองที่ผิดปกติ เช่น แขนขา อ่อนแรง หรือมีการสัมพันธ์กับการเพิ่มความดันในศีรษะ เช่น ปวดศีรษะเรื้อรัง ตาพร่ามัว

อาการเสียงแหบหรือเสียงเปลี่ยน ซึ่งอาจบ่งชี้ว่า มีการกระจายมายังต่อมน้ำเหลืองบริเวณ recurrent laryngeal nerve หรือก้อนมะเร็งลุกลามมาโดยตรง

ตรวจร่างกายพบลักษณะกดทับเส้นเลือดดำใหญ่ซุพีเรียร์เวนาคาวา (SVC obstruction syndrome )

ตรวจร่างกายพบต่อมน้ำเหลือง บริเวณลำคอ เนื้อเยื่อไพล่าร้างใหญ่มากกว่า 1 ซม. หรือ ตรวจพบตับโต (liver span มากกว่า 13 ซม.) หรือมีก้อนตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย

ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ เช่นผลเลือดอาจตรวจพบว่า มีภาวะซีด (ความเข้มข้นเลือด < 40% ในผู้ชาย หรือ < 35% ในผู้หญิง) มีการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP : alkaline phosphatase) และเอนไซม์แกมมาตามิลทรานเฟอเรส (GGT; Gamma-Glutamyl transferase) หรือเอนไซม์ตับ (SGOT; glutamicoxalonaacetic transaminase) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการกระจายของมะเร็งปอดมาตับ โดยที่ถ้าเป็นการกระจายไปที่กระดูกอาจจะทำให้ค่า ALP และแคลเซียมในเลือดสูงขึ้นได้

ผลการตรวจเลือดหาค่าบ่งชี้มะเร็งหรือ tumor marker มีการศึกษาว่าการตรวจ tumor marker บางชนิดอาจจะช่วยวินิจฉัยมะเร็งปอด เช่น Human epididymis protein (HE4)<sup>47, 48</sup> DR-70 Carcinoembryonic antigen (CEA)<sup>49</sup> neuron-specific-enolase (NSE serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1)<sup>50</sup> และ progastin releasing peptide (proGRP)<sup>50-52</sup> แต่ว่าในปัจจุบันยังไม่ได้นำมาใช้ในทางปฏิบัติ ในการวินิจฉัย

#### การตรวจภาพถ่ายทางรังสีวิทยาวินิจฉัย

เมื่อพบก้อนจากการตรวจรังสีวิทยาปอดทั่วไป (chest x-ray) แล้วเราต้องส่งการตรวจที่ละเอียดมากขึ้นเพื่อประเมินระยะและความรุนแรงของโรค คือการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ บริเวณทรวงอกและช่องท้องส่วนบน (CT scan of the chest and upper abdomen ) ร่วมกับการฉีดสารทึบรังสี (contrast) เพื่อประเมินลักษณะของก้อน ต่อมน้ำเหลืองบริเวณช่องอก (mediastinal lymph node) และปอดส่วนอื่นๆ รวมทั้งอวัยวะที่อาจพบการกระจายของก้อนได้ เช่น ตับ ต่อมนมวกไต ปวดกลีบส่วนอื่นๆ ทั้งข้างเดียวกันและด้านตรงข้าม นอกจากนี้ยังสามารถประเมินได้ว่ามีภาวะน้ำในเยื่อหุ้มปอดหรือว่าเยื่อหุ้มหัวใจหรือไม่ รวมทั้งลักษณะของกระดูกได้ละเอียดมากขึ้น ดังนั้นการทำ CT scan บริเวณดังกล่าวถือว่าเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำ

ในปัจจุบันยังมีการใช้การตรวจที่เรียกว่าการถ่ายภาพรังสีระนาบด้วยการปล่อยโพซิตรอน (PET; positive emission tomography) ร่วมกับ CT scan รวมเรียกว่า integrated PET-CT ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อประเมินระยะรวมทั้งความรุนแรงได้เช่นเดียวกัน<sup>53</sup> ซึ่งนอกเหนือจาก

ความสามารถในการประเมินบริเวณต่อมน้ำเหลืองและการกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เหมือนกับการตรวจ CT scan แล้ว ยังสามารถดูปริมาณการนำน้ำตาลฟลูออโรดีออกซีกลูโคส (FDG; fluorodeoxyglucose) ไปใช้ของก้อนได้อีกด้วย และมีการนำไปใช้ (uptake) มากกว่า 2.5 SUV จะมีค่าความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) ต่อการกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง คือ ร้อยละ 81.3 และ 79.4 ตามลำดับ<sup>54</sup> หรือที่บริเวณก้อนตั้งต้นมะเร็งได้ร้อยละ 96 และ 83 ตามลำดับ<sup>55</sup>

สำหรับการทำการตรวจด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ของสมองแนะนำให้ทำเมื่อผู้ป่วยถูกวินิจฉัยว่าเป็นระยะที่ 3 หรือ 4 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก เพราะว่าแม้ว่าจะไม่มีอาการแสดงใดๆ ก็ตาม แต่ถ้าเป็นระยะ 1 และ 2 จะตรวจเมื่อมีอาการหรือมีอาการแสดง แต่ถ้าในกรณีที่ไม่สามารถทำ MRI ได้ให้สามารถทำ CT สมองแทนได้<sup>56</sup>

### การตรวจพิสูจน์ชิ้นเนื้อ

ภายหลังจากที่มีการตรวจทางรังสีวิทยาแล้วพบก้อนที่สงสัยว่าจะเป็นมะเร็งปอดเรียบร้อยแล้ว ลำดับต่อไปคือการให้การวินิจฉัยในการตรวจชิ้นเนื้อยืนยันว่าเป็นมะเร็งปอดจริงหรือไม่ ซึ่งอาจจะได้มาจากชิ้นเนื้อจากปอด ต่อมน้ำเหลือง หรือว่าตำแหน่งอวัยวะที่มีการกระจายไปก็ได้ ซึ่งอาจจะมีวิธีการดังต่อไปนี้

### การตรวจเพื่อยืนยันระยะของโรค (tumor staging procedure)

#### 1. การตรวจก้อนมะเร็งปอดปฐมภูมิ

1.1 ก้อนอยู่บริเวณกลางปอด (central lesion) แนะนำให้ใช้วิธีการส่องกล้อง (bronchoscopy) และถ้าก้อนติดกับหลอดลมเราอาจจะใช้การใช้เข็มดูดผ่านทางหลอดลมเพื่อเอาเซลล์มะเร็ง (TBNA ; transbronchial needle aspiration) เพื่อตรวจหาเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งในบางกรณีถ้าเกิดว่ารอยโรคตื้นๆ (superficial lesion) บริเวณ central airway เช่น high grade dysplasia หรือ carcinoma in situ หรือ หย่อมเล็กๆ ของ invasive cancer มีการใช้ AFB หรือ Autofluorescence bronchoscopy ในการตรวจหารอยโรคงกล่าว ส่วนใหญ่ severe dysplasia หรือ carcinoma in situ มักตรวจพบจากการทำ sputum cytology ซึ่งถ้าจากการทำ CT scan ไม่พบความผิดปกติใดๆ ที่ปอด จำเป็นต้องตรวจด้วย white light bronchoscopy (WLB) หรืออาจใช้ AFB ร่วมด้วยได้ เพื่อดูว่ามี endobronchial lesion หรือไม่ แต่ถ้าตรวจพบ severe dysplasia หรือ carcinoma in situ จากการตรวจชิ้นเนื้อผ่านทาง bronchoscope สามารถใช้ WLB เพื่อดู margin หรือประเมิน

synchronous lesion ได้ และแนะนำให้ติดตามผู้ป่วยผู้ป่วยเป็นระยะๆ ท้าย WLB กรณีที่ผู้ป่วยมี superficial limited mucosal lung cancer ใน central airway แต่สภาพผู้ป่วยไม่เหมาะสมต่อการผ่าตัด (surgical resection) แนะนำให้ทำการรักษาด้วย photodynamic therapy หรือ brachytherapy หรือ cryotherapy หรือ electrocautery<sup>57</sup>

1.2 ก้อนอยู่บริเวณรอบนอกปอด (peripheral lesion) สามารถใช้การทำ bronchoscopy ได้ เช่นเดียวกัน แต่อาจจะต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษเช่น หัวอัลตราซาวนด์ขนาดเล็กสอดช่วยร่วมด้วย (radial EBUS) ซึ่งสามารถทำให้มองเห็นเนื้อเยื่อโดยรอบขณะทำการตรวจได้ (real time imaging) และเพิ่มความแม่นยำในการเก็บชิ้นเนื้อได้อีกด้วย<sup>57</sup> หรือมีการเก็บชิ้นเนื้อแบบใช้เครื่องฟลูออโรสโคป (Fluoroscopic guidance biopsy) กรณีที่ไม่มี radial probe ultrasound นอกจากการใช้ bronchoscope แล้ว ยังสามารถใช้เข็มเจาะผ่านผิวหนังบริเวณทรวงอกเพื่อเอาชิ้นเนื้อมาตรวจ (TTNA ; Transthoracic needle aspiration) ซึ่งอาจจะต้องอาศัย CT scan หรือ ultrasound เพื่อช่วยบอกตำแหน่งให้แม่นยำมากขึ้น อีกสิ่งหนึ่งที่ต้องทำให้เกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นการได้ชิ้นเนื้อมาด้วยวิธีการใดก็ตาม คือ การได้เนื้อเยื่อที่มีปริมาณเพียงพอเหมาะสมที่จะสามารถทำการตรวจลักษณะทางเซลล์ (cytology) หรือว่าทางเนื้อเยื่อ (histology) และในปัจจุบันต้องเพียงพอสำหรับการตรวจทางโมเลกุลเพิ่มเติมด้วย (molecular analysis) อีกด้วย เพราะว่าการรักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) หรือ การรักษาด้วยการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy)

2. การตรวจหาเซลล์มะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณกลางหน้าอก (Mediastinal staging procedure) โดยทั่วไปสามารถตรวจได้ 2 วิธี คือ

2.1 การใช้เข็ม (needle technique) ซึ่งอาจจะทำผ่านจากภายในหลอดลมโดยใช้อัลตราซาวนด์ (EBUS-NA; endobronchial ultrasound-needle aspiration) หรือผ่านจากหลอดอาหาร (EUS-NA; Endoscopic esophageal ultrasound-needle aspiration)

2.2 โดยการผ่าตัดโดยจะทำให้ได้ชิ้นเนื้อที่ใหญ่มากขึ้น ซึ่งอาจจะทำโดยการผ่านทางการใช้กล้องเพื่อส่องช่องกลางทรวงอก (mediastinoscope) การผ่าตัดทางศัลยศาสตร์ทรวงอก โดยใช้กล้องวีดีทัศน์ (VATS; Video-Assisted Thoracic Surgery)

ซึ่งขั้นตอนของการได้ชิ้นเนื้อนั้นให้ใช้ การใช้เข็มก่อน หากไม่สามารถตรวจหาชิ้นเนื้อได้ จึงพิจารณาใช้การผ่าตัด

## การรักษามะเร็งปอด

การรักษาขึ้นอยู่กับสภาพของผู้ป่วยและระยะของโรสดังแนวทางการรักษาในแต่ละระยะของโรค

### 1. การผ่าตัด

การผ่าตัดนับเป็นการรักษาหลักอย่างแรกในการรักษาผู้ป่วย NSCLC ในระยะเริ่มแรก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีสภาพร่างกายและปอดที่สามารถดมยาสลบและเข้าสู่ภาวะการหายใจแบบปอดข้างเดียวได้ (One-lung ventilation) และเป็นที่ยอมรับว่าการผ่าตัดแบบทั้งกลีบปอด (lobectomy) ร่วมกับการเลาะต่อมน้ำเหลืองบริเวณช่องอก (Mediastinal lymph node dissection) หรือ การสุ่มเลาะต่อมน้ำเหลือง (lymph node sampling) สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีพได้มากขึ้นและนับว่าเป็นการรักษาที่จำเป็นซึ่งมาตรฐานในปัจจุบัน (gold standard)

ก่อนผ่าตัดผู้ป่วยทุกรายจะต้องได้รับการประเมินความพร้อมของปอดด้วยการทำการตรวจสมรรถภาพปอด (PFT; Pulmonary function test) ซึ่งต้องมีค่าของ %predicted FEV1  $\geq$  80% หรือ FEV1  $\geq$  30% หรือ VO<sub>2</sub>max  $\geq$  10 mL/kg/min<sup>58, 59</sup> หรือมีโรคประจำตัวที่อาจจะไม่เหมาะกับการผ่าตัด เช่น โรคเส้นเลือดหัวใจขาดเลือดที่ยังไม่ได้รับการแก้ไข เป็นต้น ซึ่งจะต้องทำการผ่าตัดกลีบปอดบางส่วน (sublobar resection) โดยแนะนำให้ทำการผ่าตัดเป็นกลีบย่อย (segmentectomy) แทนการผ่าตัดออกแค่เพียงตัวก้อน (wedge resection)<sup>60</sup> ทั้งนี้ผู้ป่วยที่มีความเหมาะสมในการผ่าตัด sublobar resection เป็นคนไข้ที่มีลักษณะดังต่อไปนี้<sup>61</sup>

- รอยโรคขนาดไม่เกิน 2 ซม. และอยู่บริเวณชายปอด
- ผลชิ้นเนื้อเป็น AIS (adenocarcinoma insitu) อย่างเดียว
- CT scan พบลักษณะคล้ายกระจกฝ้า (Ground glass appearance) ที่ > ร้อยละ 50
- มีระยะเวลาที่เนื้องอกจะแบ่งตัวเป็น 2 เท่า (tumor doubling time)  $\geq$  400 วัน

โดยการผ่าตัด sublobar resection มีข้อควรระวังคือระยะห่างระหว่างขอบของเนื้อปอดที่ตัดออกมากับก้อนมะเร็ง (gross margin) แนะนำว่าถ้าก้อนมีขนาดไม่เกิน 2 ซม. ควรมีระยะห่างมากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนมะเร็ง แต่ถ้าขนาดเกิน 2 ซม. ระยะห่างควรมากกว่าหรือเท่ากับ 2 ซม. และถ้ากรณีหลังทำการผ่าตัด แบบ wedge resection แล้วไม่ได้ระยะดังกล่าวแนะนำให้ใช้การรักษาระยะใกล้ (brachytherapy) หรือการผ่าตัด sublobar resection เพื่อช่วยลดการกลับมาเป็นซ้ำบริเวณเดิม (local recurrence)



### การเลาะต่อมน้ำเหลือง (Lymph node dissection)

การผ่าตัดก้อนมะเร็งปอดรวมกับการเลาะต่อมน้ำเหลืองได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีพได้มากขึ้นและยังทำให้แพทย์ทราบว่ามะเร็งได้ลุกลามไปที่ต่อมน้ำเหลืองอย่างแท้จริง ทำให้สามารถบอกระยะของโรคได้แม่นยำมากขึ้น<sup>62-65</sup> ตามข้อแนะนำของสมาคมแพทย์ออร์เวจซ์แห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (ACCP ; American College of Chest Physician) ปี 2556<sup>48</sup> แนะนำไว้ว่า ควรทำการผ่าตัด systemic LN dissection หรือ sampling ทุกรายโดยเฉพาะอย่างยิ่งตั้งแต่ระยะที่ 2 เป็นต้นไป และแนะนำให้เลาะให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยยังไม่ได้กำหนดแน่นอนว่า จะต้องเลาะด้วยจำนวนเท่าใด โดยหลายการศึกษาแนะนำให้เลาะ mediastinal lymph node อย่างน้อย 4 ระดับ<sup>66</sup> จำนวน 6-15 ต่อม<sup>65-68</sup> แต่ที่ทางสมาคมมะเร็งปอดของญี่ปุ่น (The Japan Lung Cancer Society) ได้ให้คำแนะนำสำหรับการเลาะ systemic LN dissection ไว้ว่า

1. ควรเลาะต่อมน้ำเหลือง  $\geq 3$  ต่อม หรือว่า 3 ระดับในระดับที่ 10-14
  2. ควรเลาะต่อมน้ำเหลือง  $\geq 3$  ต่อม หรือว่า 3 ระดับในระดับที่ 2-9 (mediastinal LN)
- ทำให้สรุปได้ว่าควรเลาะต่อมน้ำเหลืองจำนวนอย่างน้อย 6 ต่อม หรือ 6 ระดับจากระดับ

ทั้งหมด

### 2.การรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด

ในทางคลินิกมีวิธีการใช้ยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษามะเร็งปอดด้วย 4 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

2.1.การให้เคมีบำบัดแบบนำก่อนการรักษาหลัก (Induction chemotherapy) คือ การใช้เคมีบำบัดเป็นวิธีการแรกในการรักษาโรคในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดระยะ IIIA ที่ยังสามารถผ่าตัดได้ โดยให้ยาเคมีบำบัดก่อนที่จะไปผ่าตัด

2.2.การให้เคมีบำบัดเสริม (Adjuvant chemotherapy) คือ การให้เคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริมหลังจากที่ได้รับการรักษาอื่นที่ทำให้รอยโรคหายไปหมดแล้ว เช่น การผ่าตัด จุดประสงค์เพื่อควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งที่ยังหลงเหลืออยู่ แต่ไม่สามารถตรวจพบเจอทางคลินิก หรือเรียกว่า micrometastasis ทำให้สามารถเพิ่มอัตราและระยะเวลาการมีชีวิตรอดโดยปลอดโรค (disease free survival) และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ลดอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรค (recurrence rate) เช่น อาจจะทำให้ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กหลังจากผ่าตัดแล้ว ระยะ II A-III A ที่ตรวจไม่พบเซลล์มะเร็งบริเวณการผ่าตัด (negative margin) โดยให้

สูตรยา cisplatin ร่วมกับ vinorelbine หรือ pemetrexed หรือ etoposide หรือ gemcitabine หรือการให้ carboplatin ร่วมกับ paclitaxel ในกรณีที่ไม่สามารถให้ยา cisplatin ได้

2.3.การให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสี (concurrent chemoradiation) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการฉายรังสี เช่น การรักษามะเร็งปอดระยะ IIIA ที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ หรือ IIIB

2.4.การให้ยาเคมีบำบัดเพื่อบรรเทาอาการ (Palliative chemotherapy) ให้เมื่อโรคอยู่ในระยะแพร่กระจายหรืออยู่ในระยะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้

### 3.การรักษาด้วยวิธีรังสีรักษา (Radiotherapy)

การรักษาด้วยวิธีรังสีรักษาในมะเร็งปอดเป็นการใช้ รังสีเข้าไปในบริเวณที่มีก้อนมะเร็งซึ่งแบ่งออกเป็น

3.1 การฉายรังสีรักษา ร่วมกับการผ่าตัด การใช้ 2 วิธีนี้ร่วมกัน เพื่อให้การรักษามะเร็งได้ดียิ่งขึ้นโดยช่วยแก้ไขข้อด้อยของแต่ละวิธีการรักษาคือการฉายรังสีสามารถควบคุมและทำลายเซลล์มะเร็งบริเวณริมๆ ได้ดีเพราะเซลล์มะเร็งอยู่กันไม่หนาแน่น และได้รับเลือดรวมทั้งออกซิเจนไปเลี้ยงได้ดี ในขณะที่ การควบคุมมะเร็งตรงกลางก้อนเนื้อทำได้ยากเพราะเซลล์อยู่กันอย่างหนาแน่นและมีเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ สำหรับการผ่าตัดจะสามารถก้อนเนื้อออกบริเวณตรงกลางออกได้ดี แต่ถ้าก้อนใหญ่มากอาจจะทำให้การผ่าตัดตรงขอบทำได้ยากเพราะว่าต้องระวังอวัยวะข้างเคียง ดังนั้นการใช้การรักษา 2 วิธีร่วมกันก็อาจจะทำให้การรักษาได้ผลดียิ่งขึ้นซึ่งมีวิธีการให้ร่วมกันที่สำคัญ 2 แบบ

3.1.1 การให้การรักษาด้วยการฉายรังสีก่อนการผ่าตัด (preoperative radiotherapy)

3.1.2 การให้รังสีรักษาหลังการผ่าตัด (postoperative radiotherapy)

3.2 การฉายรังสีรักษา ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด (Concurrent chemoradiation) เพราะนอกจากนั้นเคมีบำบัดเองยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเซลล์มะเร็งแล้ว เมื่อให้เคมีบำบัดร่วมกับการฉายแสงจะทำให้ผลของรังสีรักษาดีขึ้นทำให้สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น เรียกคุณสมบัตินี้ว่า Radiosensitizer

## การรักษาแยกตามระยะของโรค

เนื้อหาข้างต้นได้กล่าวถึงหลักการของการรักษาด้วยการผ่าตัด เคมีบำบัดและการฉายแสง ซึ่งมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กแต่ละระยะมีความเหมาะสมของการเลือกใช้การรักษาแตกต่างกัน แยกตามระยะของโรค ตามแนวทางการรักษาของ NCCN (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline ฉบับที่3 ปีพ.ศ.2560<sup>61</sup> ดังนี้

### 1.ระยะที่ 1A (peripheral T1ab, N0)

1.1 ไม่พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับสภาพผู้ป่วย

ถ้าร่างกายแข็งแรงพอพร้อมที่จะผ่าตัดได้ให้ใช้วิธีการผ่าตัดกลีบปอดออก (Lobectomy) ร่วมกับการเลาะต่อมน้ำเหลืองช่องอกออก (mediastinal LN dissection) หรือการสุ่มเลาะต่อมน้ำเหลืองบริเวณหลอดลมออกมากกว่า 3 ต่อมน (systemic LN sampling)

กรณีที่มีสภาพปอดหรือร่างกายไม่พร้อมต่อการทำ lobectomy ให้พิจารณาการผ่าตัดที่เล็กลง คือ Sublobar resection ร่วมกับการทำ systemic LN sampling

กรณีที่มีสภาพปอดหรือร่างกายไม่พร้อมต่อการผ่าตัดหรือดมยาสลบ ให้พิจารณาการทำการรักษาด้วยรังสีรักษาปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นๆ (SABR : stereotactic ablative radiotherapy)<sup>69</sup>

70

1.2 พบว่ามีกระจายไปยัง mediastinal LN (N2) ให้รักษาตามแนวทางในระยะ IIIA หรือ IIIB

### 2.ระยะที่ 1B (peripheral T2a, N0) หรือ Stage I (central T1ab-T2a,N0) หรือ Stage II (T1ab-2ab,N1; T2b,N0) Stage IIB (T3,N0) Stage IIIA (T3,N1)

2.1 ไม่พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับสภาพผู้ป่วย

ถ้าผู้ป่วยมีสภาพร่างกายที่ดีสามารถผ่าตัดได้ ให้ใช้วิธีผ่าตัดทำ lobectomy ร่วมกับ mediastinal LN dissection หรือ systemic LN sampling และถ้าเป็น T3 หรือ N1 ให้เคมีบำบัดหลังการผ่าตัด (Adjuvant chemotherapy) ร่วมด้วย

ถ้าผู้ป่วยไม่เหมาะสมสำหรับการผ่าตัดหรือดมยาสลบ ในผู้ป่วย N0 ให้พิจารณาการทำการรักษาด้วยรังสีรักษาปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นๆ (SABR : stereotactic ablative radiotherapy)<sup>69</sup>

<sup>70</sup>และพิจารณาให้ยาเคมีบำบัดในผู้ป่วย N0 ที่ลักษณะเสี่ยงสูงต่อการกลับเป็นซ้ำของโรค (high risk) ดังนี้

- Poorly differentiated tumor

- มีการลุกลามไปเส้นเลือด (Vascular invasion)<sup>29</sup>
- ผ่าตัดบางส่วน Wedge resection
- ขนาดก้อนมะเร็ง > 4 ซม.
- มีการลุกลามของก้อนมะเร็งไปที่เยื่อหุ้มปอดส่วนใน (Visceral pleural involvement)<sup>29, 71</sup>
- ไม่ทราบสถานะของต่อมน้ำเหลือง (Unknown LN status)

ถ้าสภาพผู้ป่วยและไม่เหมาะต่อการผ่าตัดหรือดมยาสลบและมีการกระจายมายังต่อมน้ำเหลืองภายในปอด (N1) ให้รักษาด้วยเคมีบำบัดร่วมกับการฉายแสง (definitive chemoradiation)

2.2 พบว่ามีการกระจายไปยัง mediastinal LN (N2) ให้รักษาตามแนวทางในระยะ IIIA หรือ IIIB

### 3.ระยะที่ IIB (T3 invasion N0) หรือ IIIA (T4 extension ร่วมกับ N0-1)

3.1 ไม่พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับ

มะเร็ง superior sulcus tumor (T3 invasion, N0-1) พิจารณาให้เคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษาก่อนการผ่าตัด (preoperative concurrent chemoradiation) ตามด้วยการผ่าตัด (en bloc resection) รวมถึง lobectomy และ mediastinal LN dissection และให้เคมีบำบัดหลังการผ่าตัดร่วมด้วย

มะเร็ง superior sulcus tumor (T4 extension, N0-1) พิจารณาให้ เคมีบำบัดร่วมกับรังสีรักษาก่อนการผ่าตัด (preoperative concurrent chemoradiation) จากนั้นประเมินอีกครั้งว่ายังสามารถจะผ่าตัดได้หรือไม่ ด้วย CT หรือว่า PET/CT

ถ้าสามารถผ่าตัดได้ ให้ผ่าตัด

ถ้าไม่สามารถผ่าตัดได้ ให้เป็นการรักษาแบบเคมีบำบัดร่วมฉายแสงเบ็ดเสร็จ

(definitive concurrent chemoradiation)

กรณีก้อนลุกลามไปถึงผนังช่องอก (chest wall invasion) หลอดลมส่วนต้น (proximal airway) หรือว่าอวัยวะช่องกลางอก (mediastinum) ให้ประเมินแล้วว่า ผ่าตัดได้ ให้ผ่าตัดก่อน แล้วถ้าผลชิ้นเนื้อ ไม่ติดขอบ (R0) ให้ adjuvant chemotherapy ติดขอบโดยมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (R1; microscopic residual tumor) ให้พิจารณาตัดเพิ่ม หรือ ให้รังสีรักษาร่วมด้วย ติดขอบโดยมองเห็นด้วยตาเปล่า (R2; macroscopic residual tumor) ให้พิจารณาตัดเพิ่ม หรือ ให้

concurrent chemoradiation ในกรณีที่ยังไม่ได้ทำก่อนผ่าตัด ผ่าตัดไม่ได้ พิจารณาให้การรักษาแบบเคมีบำบัดร่วมฉายแสงเบ็ดเสร็จ (definitive concurrent chemoradiation)

#### 4.ระยะที่ IIIA (T1-3, N2)

4.1 ไม่พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับ

ถ้าผู้ป่วยมีสภาพร่างกายที่ดี สามารถผ่าตัดได้ให้วิธีการรักษาโดยการผ่าตัดทำ lobectomy ร่วมกับ mediastinal LN dissection หรือ systemic LN sampling และให้ adjuvant chemotherapy กรณีเป็น T3 หรือ N1

4.2 พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN (N2) ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับ

ถ้าเป็น T1-2 หรือ T3 ที่ไม่ใช่ T3 invasion ให้ definitive concurrent chemoradiation หรือ ให้เคมีบำบัดแบบ Induction chemotherapy แล้วประเมินซ้ำถ้าไม่โตขึ้น ให้พิจารณาผ่าตัด แต่ถ้าก้อนโตขึ้น พิจารณาฉายแสงหรือว่าเปลี่ยนยาเคมีบำบัด

ถ้าเป็น T3 invasion ให้เป็นการรักษา definitive concurrent chemoradiation

#### 5.ระยะ IIIAหรือ IIIB หรือ IV ที่มีก้อนที่ปอดนอกเหนือจากก้อนมะเร็งหลัก (separate pulmonary nodule)

5.1 ไม่พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN ให้แยกการพิจารณาขึ้นกับ

ก้อนอยู่ที่กลีบปอดข้างเดียวกัน (T3, N0-1) หรือคนละกลีบปอดแต่อยู่ข้างเดียวกัน (T4, N0-1) พิจารณาผ่าตัด ตามด้วย adjuvant chemotherapy (N0-1) หรือ sequential chemotherapy ในกรณีที่ เป็น N2 แต่ถ้าหลังผ่าตัดพบว่าขอบของการผ่าตัดยังพบว่ามีเซลล์มะเร็งหลงเหลืออยู่ (positive margin) อาจพิจารณาฉายแสง

กรณีที่ก้อนอยู่ด้านตรงข้ามและมีก้อนเดียว ให้รักษาเป็นมะเร็ง 2 ชนิด

5.2 พบการกระจายไปยัง Mediastinal LN (N2-3) ให้รักษาเหมือนกับระยะแพร่กระจาย (metastatic disease)

#### 6.ระยะ IIIB (T1-3, N3)

ให้การรักษาด้วย definitive concurrent chemoradiation

### 7.ระยะ III B (T4, N2-3)

7.1 ไม่พบการกระจายไปยัง LN ข้างตรงข้ามและไม่มีการกระจายไปที่ N2

ให้การรักษาเหมือนระยะ III A (T4, N0-1)

7.2 ไม่พบการกระจายไปยัง LN ข้างตรงข้ามแต่ มีการกระจายไปที่ N2 ให้รักษาด้วย definitive concurrent chemoradiation

7.3 พบการกระจายไป LN ด้านตรงข้าม (N3) ให้ definitive concurrent chemoradiation

### 8.ระยะ IV, M1a: Pleural หรือ pericardial effusion

ให้ทำการเจาะเยื่อหุ้มปอดหรือน้ำในเยื่อหุ้มหัวใจเพื่อทำการตรวจว่าพบเซลล์มะเร็งหรือไม่ และถ้าพบให้ทำหัตถการเชื่อมปอด (pleurodesis) ถ้าสามารถทำได้ หรือว่าใส่เป็นสายระบายขนาดเล็ก หรือทำการเจาะรูระบายน้ำระหว่างเยื่อหุ้มหัวใจกับเยื่อหุ้มปอด (pericardial window) และพิจารณาการให้ยาสำหรับการรักษาแบบระยะแพร่กระจาย (metastatic disease)

### 9.ระยะ IV, M1b: limited site

ถ้ามีการแพร่กระจายไปยังสมอง (brain metastasis) เพียงตำแหน่งเดียวพิจารณาให้การรักษาด้วยการฉายแสงแบบรังสีศัลยกรรมร่วมผ่าตัด (SRS ; stereotactic radiosurgery) หรือ ผ่าตัดเอาก้อนออก ตามด้วยการฉายรังสีครอบคลุมเนื้อสมองทั้งหมด (WBRT; whole brain radiation)

ถ้ามีการแพร่กระจายไปยังต่อมหมวกไตเท่านั้น (isolated adrenal metastasis) ซึ่งพิจารณาแล้วว่าสามารถรักษามะเร็งที่ปอดแบบหายขาดด้วยการผ่าตัดได้ ให้ทำการประเมินผู้ป่วยด้วย invasive mediastinal staging และทำการหาว่ามีตำแหน่งที่มะเร็งแพร่กระจายหรือไม่แบบทั้งตัว เช่นการทำ whole body PET หรือ abdominal CT ร่วมกับการถ่ายภาพสแกนกระดูกทั่วตัว (Bone scan) ถ้าพบว่าเป็น N0 หรือ 1 และไม่มีการกระจายไปที่อวัยวะอื่นๆ แนะนำให้ตัดตรงแพร่กระจายไปยังต่อมหมวกไตร่วมด้วยและหลังผ่าตัดให้การรักษาด้วยเคมีบำบัดต่อ

ถ้ามีการประเมินผู้ป่วยด้วยความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน (Performance status) ด้วย ECOG\* (Eastern Cooperative Oncology Group) ได้คะแนน 0-1 และมีการแพร่กระจายหลายตำแหน่ง (multiple metastasis) ให้พิจารณาการรักษาแบบ metastasis

ถ้ามีการประเมิน ECOG ได้คะแนน 2-4 ให้การรักษาแบบ metastasis

\*หมายเหตุ: ECOG\* (Eastern Cooperative Oncology Group) คือการประเมินผู้ป่วยด้วยความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน (Performance status) แบ่งออกเป็น 5 ระดับ ตามตาราง 6

ตารางที่ 6 ความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน

ระดับ	ความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน
0	ผู้ป่วยมีความสามารถปกติ ออกแรง ทำงานได้เหมือนก่อนป่วย ไม่มีข้อจำกัด
1	ผู้ป่วยไม่สามารถทำกิจกรรมที่ออกแรงมากได้ แต่ สามารถทำกิจวัตรประจำวัน และงานเบาๆ เช่น งานบ้าน สำนักงาน
2	ผู้ป่วยสามารถเคลื่อนไหว ช่วยเหลือตัวเองได้ แต่ ไม่สามารถทำงานได้ต่อเนื่อง ต้องพักบนเตียงหรือนั่ง น้อยกว่า 50 % ของเวลาตื่น
3	ผู้ป่วยช่วยเหลือตัวเองได้บางส่วน ไม่สามารถทำงานต้องพักบนเตียงหรือนั่ง มากกว่า 50 % ของเวลาตื่น
4	ผู้ป่วยไร้สมรรถภาพ ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้เลย ต้องนั่งหรือนอนบนเตียงตลอดเวลา
5	ผู้ป่วยเสียชีวิต

#### 10.ระยะแพร่กระจาย (Metastatic disease)

ให้ทำการตรวจทางโมเลกุลเพื่อหาการกลายพันธุ์อีจีเอฟอาร์ (EGFR mutation) ความผิดปกติของการเรียงตัวของยีน ALK (ALK rearrangement) ความผิดปกติการเรียงตัวของยีน ROS-1 (ROS-1 rearrangement) และการตรวจการแสดงออกของ PD-L1 การกลายพันธุ์ยีน RET และการกลายพันธุ์ BRAF เพื่อพิจารณาทางเลือกในการรักษาว่ามียารักษามุ่งเป้า (targeted therapy) หรือ การรักษาแบบกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) หรือไม่ ถ้าไม่มีลักษณะดังกล่าว ให้พิจารณาให้เคมีบำบัด

ในปัจจุบันพบว่าการรักษาด้วย targeted therapy และ immunotherapy มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดี ตัวอย่างของการรักษาด้วย targeted therapy เช่น การใช้ยากกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (TKI; tyrosine kinase inhibitor) เช่น Erlotinib<sup>72</sup> หรือ Gefinitib<sup>73</sup> หรือ Afatinib<sup>73</sup> ได้เมื่อตรวจพบว่ามี การกลายพันธุ์ของ EGFR แบบหายไปของ Exon ตำแหน่งที่ 19 (exon 19 deletion)<sup>74</sup> หรือมีการแทนที่กรดอะมิโนลิวซีน (Leucine) ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine)ที่

ตำแหน่ง 858 หรือเรียกว่า L858R substitution หรือสามารถใช้ยา Crizotinib<sup>75</sup> ได้เมื่อมีการตรวจพบ ALK rearrangement หรือความผิดปกติของ ROS-1 rearrangement

### การประเมินการตอบสนองต่อการรักษา (response)

การประเมินการตอบสนองต่อการรักษาคือรอยโรคต่างๆ สามารถที่จะมีขนาดเล็กหรือยุบลงไปได้หลังจากได้รับการรักษา โดยทั่วไปจะประเมินหลังจากได้รับยาเคมีบำบัดประมาณ 2-3 ครั้ง ตามเกณฑ์ RECIST (The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) ฉบับ 1.1 ปี 2559<sup>76</sup> ซึ่งต้องมีการประเมินขนาดของมะเร็งและต่อมน้ำเหลืองที่เป็นตำแหน่งเป้าหมาย (Target lesions) รวม 2 อวัยวะ ไม่เกิน 5 ตำแหน่ง โดยที่นิยามของขนาดก้อนมะเร็งที่สามารถวัดได้จากเอกเรย์คอมพิวเตอร์หรือการตรวจร่างกายคือวัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้างมากที่สุดของก้อนแล้วมากกว่า 1 เซนติเมตร สำหรับต่อมน้ำเหลืองใช้การวัดแกนที่สั้นที่สุด โดยสำหรับต่อมน้ำเหลืองที่นำมาวัดต้องมีความยาวตั้งแต่ 1.5 เซนติเมตรขึ้นไป

สำหรับการประเมินผลของการรักษาสามารถที่จะแบ่งออกเป็นตามกลุ่มใหญ่ๆ 4 กลุ่มได้ ดังนี้ คือ

1. รอยโรคตอบสนองแบบหายหมด (CR; Complete remission) คือรอยโรคมีการตอบสนองต่อยาดีมากจนรอยโรคเก่ายุบหายไปหมดทั้งมะเร็งและต่อมน้ำเหลืองและไม่มีรอยใหม่เกิดขึ้น
2. รอยโรคตอบสนองแบบบางส่วน (PR; Partial remission) คือตอบสนองบางส่วน ซึ่งถือว่าการตอบสนองจนรอยโรครวมกันตั้งแต่ 30%
3. รอยโรคเป็นมากขึ้น (PD; progressive disease) คือเมื่อมีการเพิ่มขึ้น 20% จากการรวมแนวแกนที่มีค่าน้อยที่สุดโดยอาจจะเป็นการตั้งแต่มะเร็งก่อนการรักษาก็ได้ หรือว่ามีการเพิ่มตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร หรือมีรอยโรคมะเร็งใหม่
4. รอยโรคคงที่ (SD; Stable disease) คือไม่เข้ากับนิยามของ CR และ PR

### การดูการกลับเป็นซ้ำของโรค (Recurrence rate)

การดูการกลับเป็นซ้ำของโรคเป็นจุดประสงค์สำคัญในการรักษาแบบหายขาด คือ ระยะของการที่ผู้ป่วยมีชีวิตรอดอยู่ได้โดยปราศจากรอยโรค (DFS; disease free survival) อัตราการมีชีวิตรอดอยู่โดยปราศจากรอยโรคที่ 3 หรือ 5 ปี (3 or 5 years survival rate) และอัตราการรอดชีวิตโดยรวม



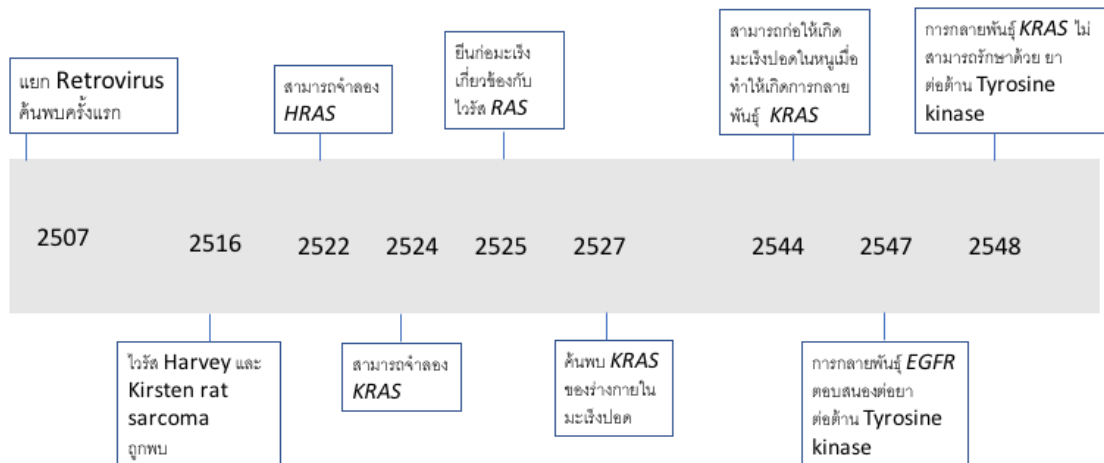
(overall survival rate) ซึ่งถ้าเป็นการรักษาที่ได้ผลงานวิจัยต้องแสดงได้ว่าการรักษาใหม่ ต้องมีค่าของระยะปลอดการกลับเป็นซ้ำของโรคดีกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาแบบเดิม (conventional therapy) หรือว่าไม่ได้รับการรักษา (Placebos)

จากทั้งหมดทำให้เห็นว่า ปัญหาในปัจจุบันคือยังไม่มีการรักษาที่มีความจำเพาะกับมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ทั้งๆ ที่การกลายพันธุ์ *KRAS* พบมากในมะเร็งปอด โดยตลอดระยะเวลาหลาย 10 ปีที่ผ่านมามีความพยายามศึกษากันมาแต่ว่ายังไม่มีการรักษาใดที่ได้ประสิทธิภาพ

## การศึกษาเกี่ยวกับ *KRAS* gene

### 1. การค้นพบหน้าที่ของยีน *KRAS*

ยีน *KRAS* มีเส้นทางการค้นพบมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 โดยพบว่ามียูโรไวรัส (retrovirus) ที่สามารถทำให้เกิดมะเร็งซาร์โคมาในหนูได้เมื่อมีการปลูกถ่ายสู่หนูปกติเมื่อได้ในราวปี พ.ศ. 2503<sup>77</sup> และในปี พ.ศ. 2510<sup>78</sup> และได้ตั้งชื่อ retrovirus ที่ค้นพบตามชื่อผู้ค้นพบคือฮาร์เวย์ (Harvey) และเคิร์สตีเทน (Kirsten) จึงเป็นชื่อว่า *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma virus) ในปี พ.ศ. 2525 หลายๆ กลุ่มได้ทำการศึกษาว่าสามารถโคลนนิ่งยีนจากเซลล์มะเร็งของมนุษย์ได้<sup>79-81</sup> จากการศึกษากว่า 50 ปี ที่ผ่านมาทำให้เราทราบว่ายีน *RAS* ประกอบด้วยโปรตีนกัวโนซีนไตรฟอสเฟต (Guanosine triphosphate : GTP) ขนาด 21 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับควบคุมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง และการตายของเซลล์ โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณหลายกลไก รวมถึงแมบเค (MAPK ; mitogen activated protein kinase :) สะแตท (STAT : Signal transducer and activator) และ ฟอสโฟอินซิติด 3 คินาส (PI3K : Phosphoinositide 3 kinase)<sup>82-84</sup>



รูปภาพที่ 1 แสดงลำดับเวลาการค้นพบยีนแคราส กับมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (ดัดแปลงจาก Riely และคณะ)<sup>85</sup>

## 2. การค้นพบกลไกการทำงานของยีน KRAS

จากการศึกษาการทำงานของ *KRAS* gene พบว่า ยีน *RAS* จะเข้ารหัสการสร้างทำให้เกิดโปรตีน *RAS* ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดัลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 188-189 ตัว ซึ่งโปรตีน *RAS* จะประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยอัลฟาของ G-protein ซึ่งมีหน้าที่ในการเปิด-ปิดของโมเลกุล ส่งผลต่อการถ่ายทอดสัญญาณ ปัจจุบันเราพบโปรตีน *RAS* 3 ชนิด คือ *HRAS*, *NRAS* และ *KRAS*<sup>86-88</sup> ซึ่งชนิดที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งปอดคือ *KRAS* โดยจะพบที่ตำแหน่ง 12p12.1 ของโครโมโซม ขนาดของคู่เบส 45,674 โปรตีน *RAS* ทำหน้าที่ควบคุมการส่งสัญญาณจากตัวรับสัญญาณ *EGFR* จากผิวเซลล์ไปยังบริเวณเป้าหมายภายในเซลล์โดยผ่านทางเส้นทางหลักคือ *RAS/RAF/MAPK* และ *PI3K/Akt* เมื่อโปรตีน *RAS* ถูกกระตุ้นจะทำให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับเป้าหมายที่เกี่ยวข้องในการถ่ายทอดสัญญาณ การถ่ายทอดสัญญาณจะถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่นิวเคลียส โปรตีนไคเนส (kinase) ตัวสุดท้าย จะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ทำให้มีการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออก ควบคุมการเพิ่มจำนวน การเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์รวมทั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis<sup>89, 90</sup>

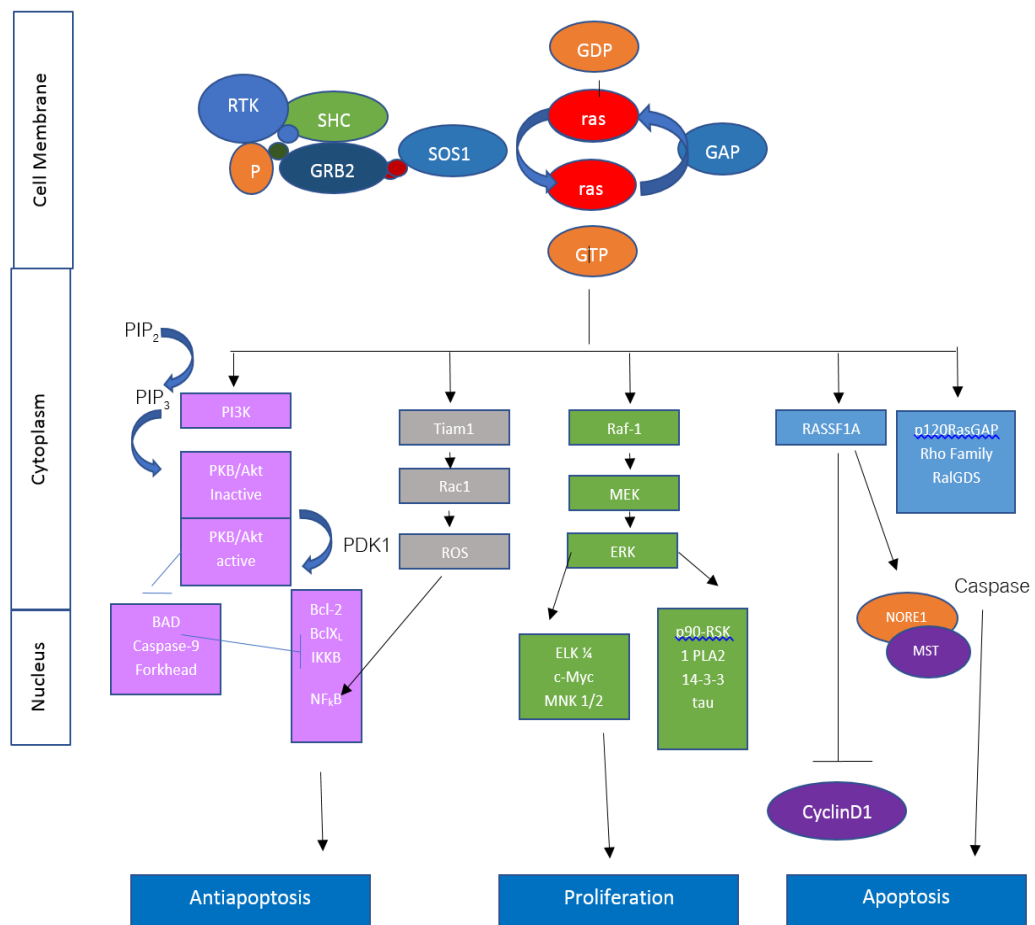
ในวงจรชีวิตปกติของเซลล์โปรตีน *RAS* มี 2 รูปแบบคือ *RAS* ที่สามารถทำงานได้ (active form) คือสามารถถ่ายทอดสัญญาณแล้วเกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายโดยโปรตีน *RAS* จะจับกับ GTP (*RAS-GTP*) และอีกรูปแบบหนึ่งคือ *RAS* ที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) โดยจะจับกับ GDP (*RAS-GDP*) *RAS-GTP* และ *RAS-GDP* จะเปลี่ยน

รูปกลับไปมาระหว่าง active และ inactive form โดยที่โปรตีน RAS จะถูกกระตุ้นให้เป็น active form (RAS-GTP) ด้วย guanine nucleotide exchange factors (GEFs) และ RAS-GTP (active form) จะเปลี่ยนรูปเป็น RAS-GDP (inactive form) โดย GTPase-activating protein (GAPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในโปรตีนหน่วยย่อยอัลฟา

### 3. การค้นพบกลไกการทำงานที่ผิดปกติเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน KRAS

ในเซลล์ปกติ (wild type) active form ของโปรตีน RAS จะถูก GAPs เปลี่ยนรูปไปเป็น inactive ได้ในระยะเวลาอันสั้น ทำให้สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ในกรณีที่เกิดการผ่าเหล่าของยีน RAS (hyperactive mutant form) RAS อยู่ในรูป RAS-GTP (active form) ตลอดเวลาทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้เพราะทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นด้วย growth factor ใดๆ ทำให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเจริญเติบโต (growth) การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ (differentiation) การเจริญเติบโต) และการแบ่งตัวที่ผิดปกติจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง<sup>91</sup> จากรูปภาพที่ 2 ทำให้เห็นได้ว่า นอกเหนือจากการกระตุ้นทำให้เกิดการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผ่านทาง RAF-MEK-ERK และเส้นทางที่มีบทบาทเกี่ยวกับการยับยั้งไม่ให้เซลล์เสียชีวิต คือ PI3K/Akt

โดยสรุปเมื่อเกิดการผ่าเหล่าของยีน RAS จะทำให้เกิดการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ ตลอดเวลาทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน การเจริญเติบโต ลดการตายของเซลล์ รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แบบควบคุมไม่ได้ทำให้เกิดเป็นมะเร็งในที่สุด



รูปภาพที่ 2 ลำดับการส่งทอดสัญญาณของ RAS pathway

(ดัดแปลง Mustachio และคณะ<sup>92</sup>)

คำย่อ : 1.BAD คือ Bcl-2-antagonist of cell death 2.ELK คือ ephrin receptor EphB1 precursor 3. GDP คือ guanosine diphosphate 4.IKKB คือ inhibitor of NF-kappaB kinase Beta subunit 5. MNK คือ MAP kinase interacting S/T kinase 6. MST1 คือ mammalian sterile 20-like 1 7. NORE1 คือ novel Ras effector 1 8.PDK1 คือ phosphoinositide-dependent kinase-1 9. PKB คือ protein kinase B 10.PLA2 คือ phospholipase A2 11 ROS reactive oxygen species

#### 4. การศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์เฉพาะตัวของการกลายพันธุ์ KRAS (Mutual exclusivity)

Dearden และคณะ<sup>6</sup>ได้ทำการศึกษาแบบ Metanalysis จาก 94 การศึกษา ที่มีการตีพิมพ์ก่อนปี 2555 เพื่อหาว่ามีลักษณะการกลายพันธุ์ชนิดใดบ้างที่อาจจะพบร่วมกันในมะเร็งปอดแบบชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยได้แยกออกเป็นชาวตะวันตกและชาวตะวันออก โดยการกลายพันธุ์ที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 9 ชนิด คือ KRAS EGFR EML4-ALK ErbB2 PIK3CA BRAF PTEN LKB1 TP53 พบว่าในมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma อาจจะมีการกลายพันธุ์ KRAS ร่วมกับการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 7 ซึ่งจะแสดงให้เห็นได้ว่าส่วนใหญ่แล้ว KRAS มีภาวะ mutual exclusivity กับการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในมะเร็งปอด ยกเว้นการกลายพันธุ์ TP53 และ LKB1

ตารางที่ 7 แสดงการกลายพันธุ์ที่พบร่วมกันกับการกลายพันธุ์ KRAS ในมะเร็งปอดชนิด Adenocarcinoma (ดัดแปลงจาก Dearden และคณะ<sup>6</sup>)

การกลายพันธุ์ KRAS ร่วมกับการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ	ชาวตะวันตก	ชาวตะวันออก
การกลายพันธุ์ TP53	7.8%	5.6%
การกลายพันธุ์ LKB1	5.1%	0.3%
การกลายพันธุ์ EML4-ALK	0.1%	0%
การกลายพันธุ์ PTEN	0%	0%
การกลายพันธุ์ BRAF	0%	0.3%
การกลายพันธุ์ PIK3CA	0.7%	0.4%
การกลายพันธุ์ ErbB2	0.6%	0%

#### 5. การศึกษาเกี่ยวกับการรักษามะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ยีน KRAS

แม้นักวิจัยทราบมานานแล้วว่าการกลายพันธุ์ของยีน RAS เป็น oncogene ที่พบว่ามี การกลายพันธุ์มากที่สุดเมื่อรวมมะเร็งทุกชนิดและเมื่อมีการกลายพันธุ์แล้วจะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน RAS ได้เพิ่มขึ้น (gain-of-function mutation)<sup>93</sup> ดังนั้นการกลายพันธุ์ RAS จึงถือได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นตัวขับเคลื่อนให้เกิดมะเร็ง (driver mutation) ที่มี

ฤทธิ์สูงสุดเป็นอันดับต้น ๆ ในมะเร็งเกือบทุกชนิด ดังนั้นถ้าเราสามารถที่จะยับยั้งการทำงานของ ยีน RAS ได้ก็น่าจะทำให้มะเร็งหายขาดได้ แต่ปัญหาสำคัญของ RAS ซึ่งดำเนินมานานไม่ต่ำกว่า 30 ปีคือความพยายามในการหายาหรือวิธียับยั้ง mutant RAS ยังไม่ประสบความสำเร็จ ปัจจัยที่ทำให้ RAS ไม่สามารถทำให้เป็นเป้าหมายของยาได้โดยตรงเนื่องจาก

1. โปรตีน RAS อยู่ในกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signaling protein) ที่เป็นโปรตีนชนิดจี (GTPase protein) ซึ่งเป็นโปรตีนตัวกลางระหว่างตัวรับสัญญาณ (receptor) และ เอนไซม์ชื่ออะดีนิลไซเคส (adenyl cyclase) เพื่อที่จะสร้างตัวส่งสัญญาณตัวที่สอง ซึ่งได้แก่ไซคลิกอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (cyclic adenosine monophosphate : cAMP) โดย RAS สามารถปรับสถานะของตัวเองระหว่างพร้อมทำงาน (active หรือ on) และไม่พร้อมทำงาน (inactive หรือ off) โดยการจับกับกัวโนซีนไตรฟอสเฟต (GTP ; guanosine triphosphate) เมื่อจับกับ GTP แล้ว จะส่งผลให้ RAS เปลี่ยนสถานะเป็น on และตัว RAS เองมีฤทธิ์เป็น GTPase ด้วยจึงย่อยสลาย GTP เป็น GDP และส่งผลให้ RAS ลดการทำงานลงเป็น off จากนั้น RAS จะกลับเป็น on ได้อีกเมื่อมีการแลกเปลี่ยน GDP กับ GTP โมเลกุลใหม่ด้วยโปรตีนกัวโนซีนนิวคลีโอไทด์เอ็กซ์เชนแฟคเตอร์ (GEF ; guanine nucleotide exchange factors) นอกจาก GTPase ของโปรตีน RAS เองแล้ว เซลล์ยังสามารถช่วยเร่งการยับยั้งฤทธิ์ของ RAS ได้ด้วยการช่วยเปลี่ยน GTP เป็น GDP โดยโปรตีนกลุ่ม GTPase activating proteins (GAP) การกลายพันธุ์ของ RAS เกือบทั้งหมดในมะเร็ง ไม่ได้เกิดในส่วนที่กระตุ้น signaling cascade ที่อยู่ถัดไปแบบที่พบใน tyrosine kinase domain ของโปรตีนอื่น แต่เกิดกับส่วน GTPase groove/pocket ซึ่งทำให้ GTPase เสียไปและ RAS ยังจับกับ GTP และคงอยู่ในสถานะ on ตลอดเวลา<sup>94</sup>

2. จากการศึกษาของ Ostrem และคณะ<sup>95</sup> ทำให้ทราบว่าโมเลกุล GTP มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ (affinity) กับ ร่องการยึดเกาะของ RAS (RAS groove/pocket) ในระดับสูงมาก ในปัจจุบันยังไม่พบโมเลกุลที่จำเพาะต่อ RAS pocket และมี affinity สูงกว่าและสามารถจับ GTP ออกได้

3. โปรตีน RAS มีขนาดเล็กและมีผิวภายนอกค่อนข้างเรียบ โครงสร้างแบบนี้หาตำแหน่งที่มียามาจับเพื่อยับยั้งการทำงานยาก นอกจากนี้ RAS ยังเป็นโปรตีนในเซลล์ทำให้สร้าง antibody มาจับไม่ได้ เพราะ antibody ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้<sup>96</sup>

ดังนั้นการพัฒนาหายาเพื่อมุ่งเป้ากับโปรตีน RAS แต่เพียงอย่างเดียว ตำแหน่งเดียวจึงไม่สามารถทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องหากกลไกใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ RAS เป็นต้น

## บทบาทของเอนไซม์ Cyclin Dependent Kinase (CDK) ในการแบ่งตัวของเซลล์

เนื้อหาที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้จะกล่าวถึงหน้าที่ของ CDK และ CyclinD1 กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ และหน้าที่อื่นๆ ของ CyclinD1 ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ รวมทั้งความสำคัญของตำแหน่งที่มีการตรวจพบ CyclinD1 คือ 1.ในไซโตพลาสซึม 2.นิวเคลียส ว่ามีหน้าที่ในการทำงานที่เหมือนและแตกต่างกัน รวมทั้งกลไกในการทำลายของ CyclinD1 ที่อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งอีกด้วย สำหรับวัฏจักรการแบ่งเซลล์ทั่วไป ขออธิบายพอสังเขปดังนี้

วัฏจักรของเซลล์ หมายถึง กลไกที่เซลล์เพิ่มขนาดและสามารถแบ่งเซลล์ออกได้เป็น 2 เซลล์ ซึ่งประกอบด้วย 5 ตามรูปภาพที่ 3 คือ

1.ระยะ  $G_0$  คือ ระยะพัก จะไม่มีการเตรียมการเพื่อการแบ่งเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในระยะนี้ถ้าถูกกระตุ้นโดยวิธีการใดๆ ก็ตามก็จะสามารถเข้าสู่ระยะ  $G_1$  phase ต่อไป

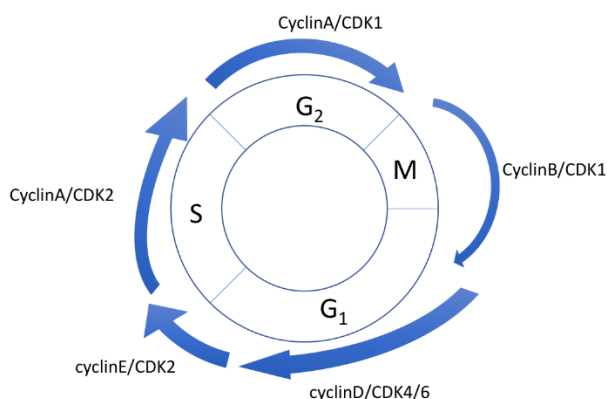
2.ระยะ  $G_1$  (gap phase) เซลล์เตรียมสภาพของเซลล์ให้พร้อมสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) ในระยะนี้จะมีการเตรียมสารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ที่มีความจำเป็นในการสังเคราะห์ DNA

3.ระยะ S (synthesis phase) เป็นระยะที่จะมีการสังเคราะห์สารโปรตีนต่างๆ ที่สำคัญที่จะใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่และมีการจำลอง DNA (DNA replication) ขึ้นมาอีกชุดหนึ่งโดยมีการจำลองตัวแบบกึ่งอนุรักษ์ (Semiconservative)

4.ระยะ  $G_2$  (gap phase) เป็นระยะที่มีหน้าที่ในการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้นใหม่และทำการซ่อมแซม (repair) ดีเอ็นเอส่วนที่มีความบกพร่องให้สมบูรณ์

5.ระยะ M (mitotic phase) เป็นระยะที่เซลล์จะแบ่งนิวเคลียส และมีการแบ่งไซโตพลาสซึมทำให้มีการแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ที่ชัดเจน

จากระยะที่ 1-5 ทำให้เห็นได้ว่าสามารถแบ่งออกเป็นช่วงระยะใหญ่ๆ คือ ระยะเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว หรือ cycling phase และระยะที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัว หรือ non-cycling phase ซึ่งในเซลล์ปกติ และเซลล์มะเร็งก็จะประกอบไปด้วย 2 ระยะนี้ สัดส่วนเซลล์อยู่ในระยะ cycling และ non-cycling เรียกว่า สัดส่วนการเจริญเติบโต (Growth fraction) ซึ่งในมะเร็งจะมีสัดส่วนของการเจริญเติบโตมากกว่าปกติ หมายความว่าเวลาที่เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการเจริญเติบโตจนกลายเป็นก้อนขึ้นมาให้เราได้นั้นเกิดเนื่องจากมะเร็งมี growth fraction ที่มากกว่าปกติ ไม่ใช่เป็นเพราะว่าเซลล์มะเร็งแบ่งตัวเร็วกว่าปกติ



รูปภาพที่ 3 วัฏจักรเซลล์ซึ่งถูกควบคุมโดย cyclin-dependent kinases (CDKs) และ cyclin ชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก Centre Francois)

### 1.บทบาท CDK กับการควบคุมการแบ่งเซลล์

การเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นกระบวนการที่มีความเกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ซึ่งมีการทำงานเป็นขั้นตอน ถ้ากระบวนการแบ่งเซลล์มีการหยุดชะงักที่ระยะใดระยะหนึ่งจะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นไม่ได้ ปัจจัยสำคัญที่มีหน้าที่ควบคุมการวัฏจักรเซลล์ คือ เอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟต ซึ่งทำหน้าที่โดยกลุ่มของเอนไซม์มีชื่อว่า ไสคลินดีเพนเดนทีไคนเอส (CDK; cyclin-dependent kinase) ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยโปรตีนที่ชื่อว่า Cyclin และถูกยับยั้งการทำงานด้วยโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า CDK inhibitors (CDKIs)

#### 1.1 ชนิดของ CDK

ในปัจจุบันเราพบว่ามี CDKs อยู่ 12 ชนิด คือ CDK1 จนถึง CDK12<sup>97</sup> แต่ CDKs ที่บทบาทสำคัญในวัฏจักรของเซลล์คือ CDK1 CDK2 CDK54 CDK5 CDK6 CDK7 และ CDK8<sup>98</sup>

#### 1.2 การกระตุ้นการทำงานของ CDK

CDKs เป็นเอนไซม์ที่จะไม่อยู่ในสถานะที่สามารถทำงานได้ตลอดเวลา (inactive) แต่สามารถทำให้อยู่ในสถานะทำงานได้ ต้องผ่าน 2 กระบวนการ คือ

1.2.1.การจับกับโปรตีนที่ชื่อว่า cyclin ได้เป็นสารเชิงซ้อน CDKs/cyclins (CDKs/cyclin complex) ซึ่ง cyclin ตอนนี้มีอย่างน้อย 15 ชนิด ได้แก่ cyclinA ถึง cyclinT แต่ cyclin ชนิดที่มีบทบาทในวัฏจักรเซลล์ คือ cyclinA cyclinB cyclinC cyclinD cyclinE และ cyclinH<sup>98</sup>



1.2.2. สารเชิงซ้อน CDKs/cyclins complex ต้องถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ CDK-activating kinase (CAK) ให้เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation)<sup>99</sup> องค์ประกอบของ CAK คือ สารเชิงซ้อนที่เกิดจากการจับกันระหว่าง CDK7 CyclinH และ MAT1

### 1.3 การยับยั้งการทำงานของ CDK

หลังจากทำงานเสร็จสิ้นแล้ว CDKs/cyclins จะถูกโปรตีนกลุ่มที่เรียกว่า CDK inhibitor (CKIs) ขัดขวางไม่ให้เกิดการทำงานต่อไปได้อีก ซึ่ง CKIs มีอยู่ 2 ประเภท คือ

1.3.1. INK4 เช่น p16<sup>INK4</sup> p15<sup>INK4b</sup> p18<sup>INK4c</sup> p19<sup>INK4d</sup>

1.3.2. Cip/Kip (CDK interacting Protein/Kinase inhibitory protein family) เช่น p21<sup>Cip1</sup> p27<sup>Kip1</sup> และ p57<sup>Kip2</sup><sup>8</sup>

โดยสรุป การผ่านเข้าสู่ระยะต่างๆ ต้องอาศัยความจำเพาะของ CDKs กับ cyclin ต่อวัฏจักรเซลล์นั้นๆ เมื่อเซลล์อยู่ในระยะ G<sub>0</sub> ได้รับสัญญาณกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์ สัญญาณดังกล่าวจะกระตุ้นให้เซลล์สร้าง cyclinD ผ่านทางวิถี Ras/Raf/MAPK<sup>100</sup> และ cyclinD ที่สร้างขึ้นจะจับกับ CDK2 CDK4 และ CDK6 ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง CDK2/CyclinD CDK4/CyclinD และ CDK6/CyclinD ร่วมกันทำหน้าที่ทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะ G<sub>0</sub> สามารถเข้าถึงครั้งแรกของระยะ G<sub>1</sub> (รูปภาพที่ 3) หลังจากนั้น CDK2/cyclinE จะช่วยทำให้เซลล์ในครึ่งหลังของระยะ G<sub>1</sub> ผ่านได้และยังผลักดันให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ต่อมา CDK2/cyclinA และ CDK1/cyclinA จะขับเคลื่อนให้เซลล์ผ่านระยะ S และ G<sub>2</sub> ตามลำดับและท้ายที่สุด CDK1/cyclinB จะช่วยทำให้เซลล์สามารถแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 เซลล์ในระยะ M ได้ในที่สุด<sup>101</sup>

2. ชนิดของโปรตีน cyclin แบ่งตามหน้าที่ตามระยะของการแบ่งเซลล์ คือ

- i. ระยะ G<sub>1</sub> ใช้ CyclinD/CDK 4/6
- ii. ระยะ G<sub>1</sub>/S transition ใช้ CyclinE/CDK2
- iii. ระยะ S ใช้ cyclinA/CDK2
- iv. ระยะ G<sub>2</sub> ใช้ CyclinA/CDK1
- v. ระยะ M ใช้ CyclinB/CDK1

## ชนิดของ CyclinD

CyclinD ประกอบด้วย 3 ชนิดคือ CyclinD1 D2 และ D3 จริงๆ แล้ว CyclinD ทั้ง 3 ชนิดมีความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างกับ โดย CyclinD2 มีความคล้ายคลึงกับ CyclinD1 62% CyclinD3 มีความคล้ายคลึงกับ CyclinD1 51%

CyclinD1 มีลักษณะ isoform คือ cyclinD1b เพราะว่ามีกรดอะมิโนของ cyclinD1 บริเวณกรดอะมิโน 240 ตำแหน่งแรกของโปรตีน

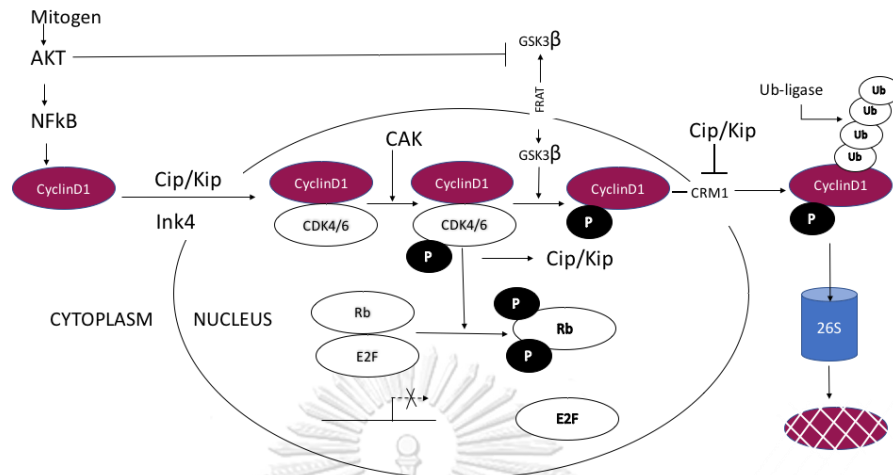
## บทบาทของโปรตีน CyclinD1

### 2.1 หน้าที่ของ cyclinD1 เมื่อทำงานร่วมกับ CDK4/6

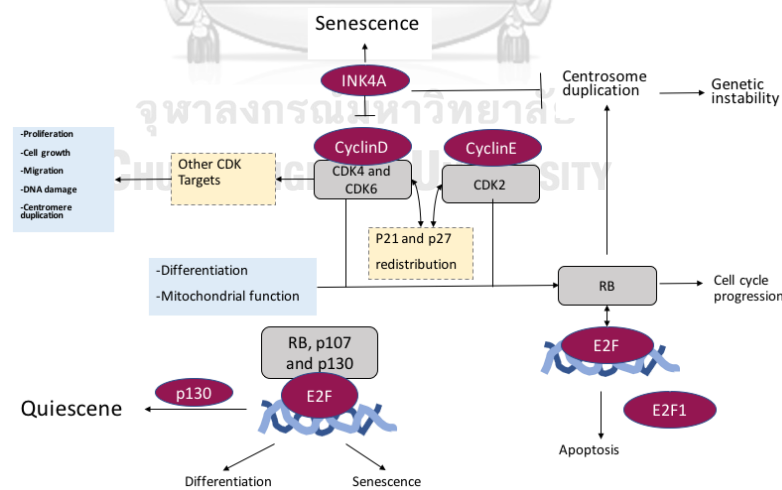
จากรูปภาพที่ 4 แสดง cyclinD1 มีทั้งที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสซึ่งระหว่างระยะ G1 โปรตีน cyclinD1 จะร่วมกับ CDK4 และโปรตีน CIP/KIP จะเข้าสู่ นิวเคลียสและจะไปส่งต่อฟอสเฟตให้กับ Rb ซึ่งจะทำให้เกิดการปล่อยปัจจัยการถอดรหัสพันธุกรรม E2F ทำให้ยื่นที่ตอบสนองต่อ E2F ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ รวมถึงไซคลินอีและไซคลินเอ จะทำหน้าที่กระตุ้นการ phosphorylation ให้กับ RB ด้วยการกระตุ้น CDK2 และเมื่อเกิดองค์ประกอบที่ซับซ้อนของ CyclinD-CDK4/CDK6 เรียบร้อยแล้วจะกระตุ้นทางอ้อมให้กับ cyclinE-CDK2 อีกโดยการทำให้เกิดการแยกตัวของ p21 และ p27 (รูปภาพที่ 5) ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CDK สำหรับ INK4A และ RB เกี่ยวข้องกับทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซนโทรเมียร์ (centromere replication) ดังนั้นถ้าเกิดการสูญเสียของ RB และ INK4A จะไม่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมและทำให้เกิดการไม่เสถียรทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับเมื่อเกิดความผิดปกติของ cyclinD-CDK4/CDK6

### 2.2 การกำจัดโปรตีน cyclinD1

จากรูปภาพที่ 4 ยังแสดงการกำจัดโปรตีน cyclinD1 เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ ระยะ G1 เป็น S โดย GSK-3 จะเข้าสู่ นิวเคลียสและเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ cyclinD1 ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 286 ทำให้ cyclinD1 ถูกขับออกจากนิวเคลียสโดย Crm1 และถูกย่อยสลายโดย 26S-proteasome GSK-3 ถูกควบคุมโดย FRAT/GBP จะทำให้เห็นว่า CyclinD1 ในนิวเคลียสจะมีการสะสมเพิ่มขึ้นได้ ถ้ามีความบกพร่องต่อการขับออกจากนิวเคลียสหรือกระบวนการย่อยสลาย cyclinD1



รูปภาพที่ 4 แสดงหน้าที่และตำแหน่งที่อยู่ของ cyclinD1 (ดัดแปลงจาก Oliver และคณะ<sup>13</sup>)  
 คำย่อ : 1.GSK-3 คือ glycogen synthase kinase3 2. Thr คือ threonine 3.CIP/KIP คือ CDK interacting Protein/Kinase inhibitory protein family 4.Ub คือ Ubiquinone 5.AKT คือ alpha serine/threonine-protein kinase



รูปภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นการทำงานและหน้าที่ของ CDK-Cyclin complex (ดัดแปลงจาก Musgrove และคณะ<sup>102</sup>)

### 2.3 หน้าที่ของ cyclinD1 ที่นอกเหนือจากการทำงานร่วมกับ CyclinD1/CDK4/6 complex

นอกจากหน้าที่ของ cyclinD1 ที่เกี่ยวข้องกับ การเร่งปฏิกิริยาด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว ในรูปขององค์ประกอบเชิงซ้อน CyclinD1/CDK4/6 CyclinD1 ยังมีหน้าที่หนึ่งทำให้มีส่วนสำคัญอย่างมากโดยไม่ได้ใช้การเป็น การเร่งปฏิกิริยา (รูปภาพที่ 6) คือ

2.3.1 การควบคุมการถอดรหัส (transcription regulation) ซึ่ง cyclinD1 จะติดกับ ตำแหน่งที่เรียกว่า ยีนส่งเสริม (promotor gene) ของหลายๆ ยีนระหว่าง การเจริญเติบโตแบบปกติ ของเซลล์ บางครั้ง CyclinD1 ก็ไปทำปฏิกิริยากับปัจจัยการถอดรหัส<sup>103</sup> นอกจากนี้ cyclinD1 ยังจับ ทำให้เกิดกระบวนการเติมหมู่อะเซทิล (acetylation) และหมู่เมทิล (methylation) ให้กับโปรตีน ฮิสโตน (histone)<sup>104-106</sup> ตามรูปภาพที่ 6 ดังนั้น cyclinD1 จึงทำหน้าที่เสมือนกับเป็น “สะพาน เชื่อม” ระหว่าง ปัจจัยการถอดรหัสที่ติดดีเอ็นเอ (DNA-bound transcription factors) กับเอนไซม์ ที่ปรับโครมาตินให้เหมาะสม (chromatin modifying enzymes) และกระบวนการทั้งหมดที่ทำให้ เกิดการขับเคลื่อนการถอดรหัส ที่จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการ เปลี่ยนแปลงของเซลล์ให้ไปทำหน้าที่ต่างๆ ที่เหมาะสม (differentiation)<sup>103, 107, 108</sup>

2.3.2 การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และ การบุกรุก (invasion) เมื่อมากกว่า นั้นคือ เมื่อยีนที่มีการตอบสนองต่อการเกาะของ cyclinD1 (cyclinD1 responsive gene) ยังทำ ให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และ การบุกรุก (invasion) เช่น โปรตีนทรอมโบสปอนดิน (thrombospondin) ซึ่งเป็นโปรตีนเชื่อมต่อ (adhesion protein) และเอนไซม์โรเอฟเพคเตอร์ร็อคทู (Rho effector ROCK2)<sup>109</sup> ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านการ ควบคุมโครงร่างที่ค้ำจุนเซลล์ (cytoskeleton)

2.3.3 นอกเหนือจากหน้าที่ข้างต้น cyclinD1 ยังมีอันตักิริยา (interaction) กับ ตัวรับฮอร์โมนสเตียรอยด์หลายชนิด (Steroid hormone receptors) และ (ตัวควบคุมร่วม (co-regulators)<sup>107, 108</sup> ซึ่ง cyclinD1 จะเร่งการทำงานของตัวรับฮอร์โมนอีสโตรเจนแอลฟา (estrogen receptor alpha) ให้ทำงานดีมากขึ้นผ่านทางตัวควบคุม เอสอาร์ซีวัน (SRC1) และ เอไอบีวัน (AIB1)<sup>110, 111</sup>

2.3.4 หน้าที่ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การเร่งปฏิกิริยาด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตของ CyclinD1-CDK4/CDK6 ยังมีอีกคือ ทำให้เกิดการแยกออก (sequestration) ของ p21 และ p27 (ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้มีหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ตามที่ได้กล่าวข้างต้น) จึงทำให้เกิดการ กระตุ้นการทำงานทางอ้อมของ CDK2<sup>112</sup>

2.3.5 CyclinD1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายแบบของดีเอ็นเอ (DNA replication) และจุดตรวจจุดความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage checkpoint) และเกี่ยวข้องกับโปรตีนหลายชนิดที่จะมีการตอบสนองเมื่อเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (DNA damage response)<sup>113, 114</sup> เช่น cyclinD1 เกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อยีนบีอาร์ซีเอทู (*BRCA2*) และเอนไซม์รีคอมบิเนส RAD51 (recombinase RAD51) โดย cyclinD1 จะช่วยทำให้เกิดการสะสมของ RAD51 ให้ไปสู่ตำแหน่งที่เกิดการเสียหายของดีเอ็นเอและกระตุ้นทำให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination mediated DNA repair)<sup>113, 114</sup>

#### 2.4 กระบวนการที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีน CyclinD1 ในมะเร็ง

*CCND1* เป็นยีนก่อมะเร็งในมนุษย์และการเกิด *CCND1* amplification และ overexpression ในมะเร็งปอดและมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น มะเร็งเต้านมเป็นต้น โดยทั่วไปโปรตีน CyclinD1 สร้างจากการถอดรหัสของ *CCND1* แต่ก็มีหลักฐานอีกของ Musgrove และคณะที่รวบรวมหลักฐานในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กโดยไม่ได้แยกประเภทการกลายพันธุ์ พบการ *CCND1* amplification นั้นน้อยกว่าการตรวจพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ cyclinD1 คือ 5-30% และ 18-76% แสดงว่าต้องมีเส้นทางอื่นอีกที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ cyclinD1 ที่เป็นผลลัพธ์สุดท้ายอีกด้วย สาเหตุอื่นได้หลายเส้นทางที่สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนไซคลินดีวันได้ ดังแสดงในรูปภาพที่ 6 คือ มีการกระตุ้นผ่านทาง

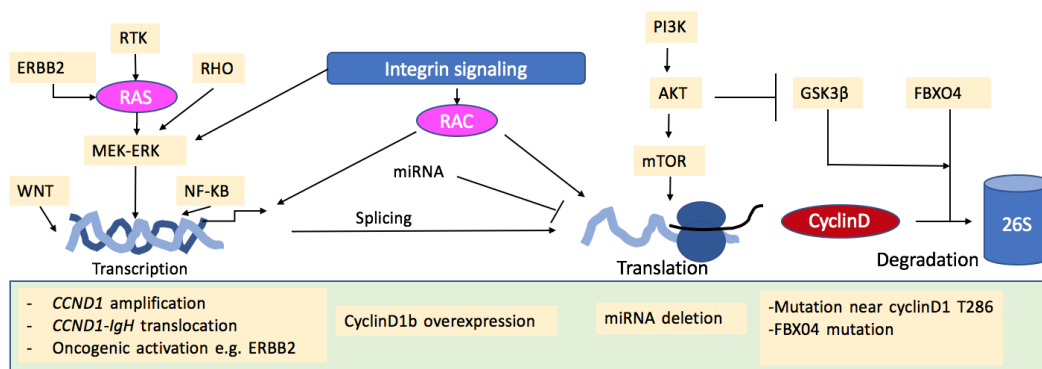
- 1) RTK (receptor tyrosine kinase)
- 2) RAS-MEK-ERK pathway
- 3) Wnt signalling pathway
- 4) NK-KB pathway

ซึ่งทั้ง 4 เส้นทางนี้ จะทำให้เกิดการถอดรหัสของยีน *CCND1* เพิ่มขึ้น หรือการแปลรหัสสร้างโปรตีน cyclinD1 เพิ่มขึ้น เช่นถ้ามี

- 1) การกระตุ้นผ่านทาง PI3K-AKT-mTOR pathway
- 2) การตรวจพบการหายไปของ miRNA (microRNAs) ที่มีเป้าหมายที่ยีน *CCND1* เช่น miR-15a และ miR-16

โดยอาจจะร่วมกับการที่มีการหมุนเวียนกลับมาใช้โปรตีนไซคลินดีเพิ่มขึ้นผ่านการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง T286 โดยใช้เอนไซม์ GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )

โดยสรุปจะเห็นได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของ cyclinD1 สามารถทำให้เกิดการแสดงออกได้หลายกระบวนการ ดังนั้นการตรวจวัดที่กระบวนการย่อยๆ จึงอาจจะเป็นสาเหตุว่าตรวจพบเจอการแสดงออกของไซคลินดีวันในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมากกว่าการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้นของยีน *CCND1* แต่เพียงอย่างเดียว คือ 18-76% และ 26% ตามลำดับ



รูปภาพที่ 6 แสดงกระบวนการที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีนไซคลินดีวันในมะเร็ง (ดัดแปลงจาก Musgrove และคณะ<sup>102</sup>)

## 2.5 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีความผิดปกติในการควบคุมของ cyclinD1 (cyclinD1 deregulation)

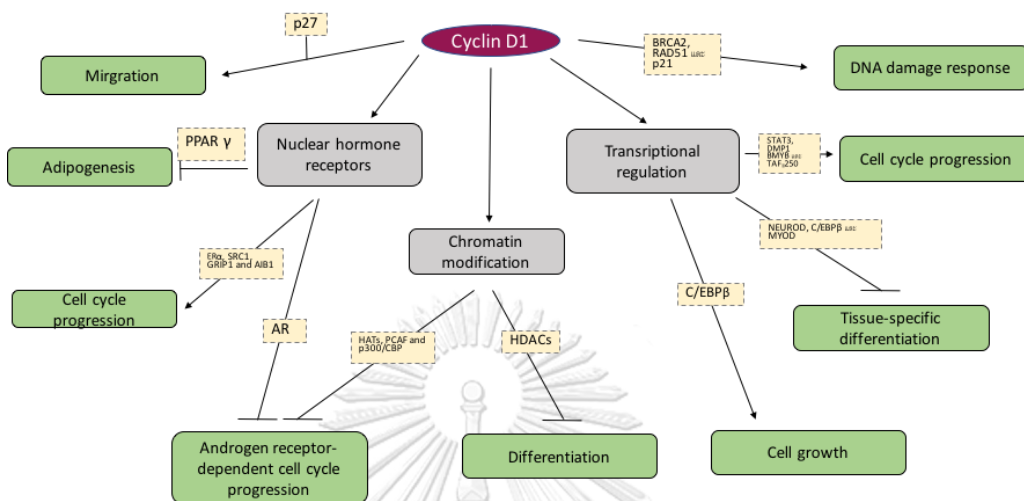
เมื่อเกิดความผิดปกติของการควบคุมของ CyclinD1 จึงทำให้เกิดความผิดปกติได้หลายประเภท เพราะcyclinD1 มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนเป็นร้อยชนิด<sup>113</sup> ผลลัพธ์เมื่อเกิดความผิดปกติในการควบคุมของ cyclinD1 จะทำให้เกิดมะเร็งได้ด้วยเหตุผลดังนี้

2.4.1. การกระตุ้นการแบ่งตัวอย่างเป็นอิสระ (mitogen-independent proliferation) โดยที่มีการแบ่งตัวของเซนโทโซม (centrosome duplication) และการตอบสนองของการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ผิดปกติไป

2.4.2. การกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดเลี้ยงมะเร็งเพิ่มมากขึ้น (angiogenesis) ผ่านทางการแสดงออกปัจจัยการสร้างเส้นเลือด (VEGF; vascular endothelial growth factor) ที่เพิ่มสูงขึ้น

โดยสรุปแล้วการกลายพันธุ์หลายชนิดรวมทั้งการกลายพันธุ์ *KRAS* ที่สามารถทำให้เกิดมะเร็งน่าจะทำให้ตรวจพบว่ามีสารสะสม cyclinD1 ในนิวเคลียสเพิ่มขึ้นหรือทำให้เกิดการสลาย cyclinD1 ที่ลดลง อีกทั้งยังทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ให้เร็วขึ้น<sup>115</sup> ดังนั้นจึงทำให้เห็นได้ว่าบทบาทหลักในการทำให้เกิดมะเร็งของ cyclinD1 น่าจะเกิดในนิวเคลียสมากกว่าในไซโตพลาสซึม

หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง เพราะว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ ดังเช่นตรวจพบ cyclinD1 ในไซโตพลาสซึมเพิ่มในมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งรังไข่ด้วย <sup>13, 116, 117</sup>



รูปภาพที่ 7 แสดงบทบาทหน้าที่ของ cyclinD1 ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยทำงานเป็นอิสระไม่ได้เกี่ยวกับการทำงานร่วมกับ CDK (ดัดแปลงจาก Peyressatre และคณะ<sup>102</sup>)

คำย่อ : 1.PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) 2.ERalpha (oestrogen receptor- $\alpha$ ) 3.GRIP1 4.SRC1 (steroid receptor coactivator) 5.AR( androgen receptor) 6.HATs (histone acetyl transferases) 7.PCAF (P300/CBP-associated factor) 8.HDACs (Histone deacetylase) 9.C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta) 10.NEUROD (Neurogenic differentiation) 11.MYOD1(Myoblast determination protein) 12.STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) 13.DMP1 (Dentin matrix protein 1) 14.BMYB (B-Myb, a repressed trans-activating protein) 15.BRCA2 (Breast cancer susceptibility gene 2)

## การศึกษา cyclinD1 ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

1. การศึกษาว่าถ้ามีการกลายพันธุ์ EGFR จะพบการเพิ่ม cyclinD1 มากขึ้นหรือไม่

ในปี พ.ศ.2542 Reissmann และคณะ<sup>118</sup> ทำการศึกษาแบบ cohort ถึงโครงสร้างและการแสดงออก ของ cyclinD1 และ epidermal growth factor จำนวน 298 คนที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ประกอบด้วยชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ที่สามารถผ่าตัดได้และยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยวิธีใดมาก่อน โดยนำชิ้นเนื้อไปเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งหลังการผ่าตัดทันทีด้วยไนโตรเจนเหลว -70 องศาเซลเซียส พบว่ามีชนิด adenocarcinoma 116 ชิ้นเนื้อ large cell carcinoma 33 ชิ้นเนื้อ squamous cell carcinoma 119 ชิ้นเนื้อ mixed histology 9 ชิ้นเนื้อ และไม่ทราบชนิดของมะเร็งปอด 17 ชิ้นเนื้อ แยกระยะด้วยการแบ่งของ Mountain (1986) ออกเป็นระยะที่ 1 61% ระยะที่ 2 14% ระยะที่ 3 24% และเมื่อนำชิ้นเนื้อมาสกัด DNA และ RNA แล้วนำไปวัดปริมาณด้วยวิธี Fluorometry เพื่อศึกษาโครงสร้างของ gene (gene structure) ด้วยวิธี Southern blot analysis โดยระบุตำแหน่ง DNA ด้วย <sup>32</sup>PdCTP และการแสดงออกของยีนระดับ RNA (gene expression) ด้วยวิธี Northern analysis โดยระบุตำแหน่ง RNA ด้วย <sup>32</sup>PdCTP ได้ผลลัพธ์คือ

1. พบ amplification ของ cyclinD1 locus 14 คนจาก 298 คน คิดเป็น 5%
2. พบ overexpression ของ cyclinD1 11 จาก 12 คนที่มี amplification ของยีน cyclinD1
3. พบ amplification ของ EGFR 17 คนจาก 286 คน คิดเป็น 13%
4. พบ overexpression ของ EGFR 22 จาก 169 คน คิดเป็น 13%
5. ตรวจพบ amplification ของยีนที่สร้าง cyclinD1 พร้อมกับการเกิด amplification ของยีน EGFR

จากการศึกษาทำให้ Reissmann และคณะสรุปว่าพบ amplification และ overexpression ยีนที่ควบคุมการสร้าง cyclinD1 และ EGFR ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก และพบการ amplification ของ ยีนควบคุมการสร้าง cyclinD1 ได้บ่อยร่วมกับการ amplification ของยีน EGFR



## 2. การศึกษาว่ามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีปริมาณการติดสี CyclinD1 เพิ่มขึ้นด้วยวิธี IHC สัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกใดบ้าง

จากการศึกษาของ Betticher และคณะ<sup>119</sup> ในปีพ.ศ. 2539 เป็นการศึกษาแบบ Cohort ถึงความสำคัญของ *CCND1* (cyclinD1) overexpression ในการเป็นปัจจัยที่พยากรณ์ของโรค (prognostic factor) ของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ผ่าตัดชิ้นเนื้อแล้ว

จากชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่ผ่าตัดได้ 53 ราย ประกอบด้วยระยะที่ 1 29 ราย ระยะที่ 2 5 ราย ระยะที่ 3 19 ราย แบ่งออกเป็นชนิด squamous cell carcinoma 35 ราย adenocarcinoma 11 ราย large cell carcinoma 2 ราย Carcinoid 1 ราย และ NSCLC ไม่ได้ระบุชนิด 4 ราย โดยใช้วิธีการตรวจจากชิ้นเนื้อ fresh frozen tissue และนำมาตรวจ amplification ของ *CCND1* ด้วยวิธี Southern Blotting และ multiplex PCR สำหรับการย้อมโปรตีน cyclin D1 ใช้การย้อมติดสี immunohistochemistry

จากการศึกษาพบ amplification ของ ยีน *CCND1* 8 จาก 53 ราย คิดเป็น 15% โดยที่พบว่า 17 ชิ้นเนื้อที่มีปริมาณที่ copy number ปกติของ ยีน *CCND1* ก็ยังสามารถตรวจพบ cyclinD1 overexpression ได้ 25 จาก 53 ราย คิดเป็น 47% โดยที่ส่วนใหญ่เป็นการติดสีที่ไซโตพลาสซึมคือ 22 ราย จาก 25 ราย คิดเป็น 88% และมีการติดสีของ cyclinD1 เพิ่มขึ้น ที่นิวเคลียส ร่วมกับการติดสีที่ไซโตพลาสซึม 7 ราย จาก 25 ราย คิดเป็น 28% อีกทั้งยังพบว่า cyclin D1 overexpression มีความเกี่ยวข้องกับ เซลล์ชนิด poorly differentiated ( $p = 0.04$ ) มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์บริเวณรอบๆก้อนมะเร็ง (lymphocytic infiltration of the tumor) น้อยกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ ( $p = 0.01$ ) ค่า relative risk โอกาสเกิดเป็นซ้ำ คือ 9.1 ( $p = 0.01$ ) Betticher จึงสรุปว่า ความผิดปกติโดยการเพิ่มขึ้นของยีนที่ควบคุมการสร้าง cyclinD1 เป็นความผิดปกติหลักของการเกิดมะเร็งปอดและอาจจะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ได้รับการผ่าตัด

## บทบาทของการกลายพันธุ์ KRAS กับ CyclinD1

การศึกษาในหลอดทดลองถึงบทบาทของโปรตีน RAS ในการแบ่งตัวของเซลล์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน CyclinD1

จากการศึกษาของ Huseyin และคณะ<sup>120</sup> ในปี พ.ศ.2540 ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) ชื่อว่า NIH3T3 และ NIH M17 ที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีน RAS โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน RAS มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์หรือไม่ และถ้ามีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์เป็นระยะใดในการแบ่งเซลล์ จากการศึกษาพบว่าโปรตีน RAS มีความจำเป็นต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ระยะ G1/S และผ่านการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน CDK2 และ CDK4 ร่วมกับการกระตุ้นการผลิตโปรตีน CyclinD1 ที่เพิ่มขึ้นทำให้ สรุปได้ได้ว่า โปรตีน RAS มีความเกี่ยวข้องอย่างสำคัญกับกระบวนการแบ่งเซลล์โดยผ่านการเพิ่มขึ้นของโปรตีน CyclinD1

นอกเหนือจากการศึกษาที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีน CyclinD1 ผ่านทาง RAS-MEK-ERK pathway แล้วยังมีการศึกษาที่แสดงถึงการทำลายของ CyclinD1 ที่ลดลงในการกลายพันธุ์ KRAS อีกด้วยในมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ KRAS จากการศึกษาของ Shivakumar และคณะ<sup>121</sup> พบว่าเส้นทางการทำงานของโปรตีน RASSF-1A (Ras association domain family protein-1) ซึ่งโดยปกติจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และทำให้เกิดเซลล์หยุดการแบ่งตัว (Cell cycle arrest) โดยผ่านกระบวนการยับยั้งการสะสมของโปรตีน CyclinD1<sup>121</sup> ดังนั้นจึงถือได้ว่า โปรตีน RASSF-1A เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Tumor suppressor protein)<sup>122</sup> แต่พบว่าในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ KRAS จะทำให้โปรตีน RASSF-1A ไม่ทำงาน ทำให้เกิดการสะสมโปรตีน CyclinD1 เพิ่มขึ้น

การศึกษาในหนูทดลอง (Preclinical study) ถึงความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ KRAS ต่อ CyclinD1-CDK4 ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (NSCLC)

ในปี พ.ศ.2553 Puyol และคณะ<sup>123</sup> ได้ทำการศึกษาในหนูที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมให้เป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและมะเร็งชนิดอื่นๆ โดยทำให้เกิดจากการกลายพันธุ์ KRAS พบว่า หลังจากทำให้มีการทำลาย CDK4 ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของหนูที่มีการกลายพันธุ์ KRAS จะทำให้เกิด การแก่ชราและป้องกันการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยปรากฏการณ์นี้จะไม่พบใน 1) มะเร็งของอวัยวะอื่นที่มีการกลายพันธุ์ KRAS 2) มีการทำลาย CDK2 หรือ CDK6 ในหนูที่มีการกลายพันธุ์ KRAS 3) การตอบสนองแบบนี้จะไม่พบถ้าเกิดในเซลล์ปกติถึงแม้จะมีการแสดงออกของ CDK4 ก็ตาม ทำให้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “การเสียชีวิตแบบสังเคราะห์ (Synthetic

lethality)” หมายถึงการตอบสนองของการยับยั้งบางอย่างโดยมีความจำเพาะกับการกลายพันธุ์ *KRAS* ในมะเร็งปอดชนิดไม่เล็กเท่านั้น

การศึกษาในมนุษย์ (Clinical study) เกี่ยวกับมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* กับการตอบสนองต่อยาชนิดยับยั้งเอนไซม์ CDK4/6

ในปี พ.ศ.2559 Patnaik และคณะ<sup>12</sup> ได้ทำการศึกษาแบบคลินิกในมนุษย์ระยะที่ 1 (Phase I clinical study) เพื่อศึกษาความปลอดภัย (Safety) เภสัชจลศาสตร์ (Pharmacokinetics) เภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics) และคุณสมบัติการต้านมะเร็ง (antitumor activity) ของยา Abemaciclib ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CDK4 และ CDK6 ทำให้ไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ CyclinD1-CDK4/6 ทำให้เกิดภาวะการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ไว้ในระยะ G1<sup>124 125</sup>

การศึกษาของ Patnaik และคณะได้รวบรวมผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งไขว้หลายชนิดรวม 225 ราย ประกอบด้วย มะเร็งเต้านม มะเร็งสมองชนิด Glioblastoma มะเร็งเม็ดสี (Melanoma) มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก รวมทั้งมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก จากผลการศึกษาในมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กจำนวน 68 คน มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 29 ราย (42%) และไม่พบการกลายพันธุ์ *KRAS* 39 ราย (58%) จากการศึกษาพบว่า

1. ประสิทธิภาพเรื่องอัตราการควบคุมโรค (disease control rate: DCR) ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ได้ 16 จาก 29 ราย (55%) และไม่มีอาการกลายพันธุ์ *KRAS* เท่ากับ 13 จาก 33 ราย (39%)

2. อัตราการควบคุมขนาดของโรคมามากกว่า 6 เดือน (6-month PFS rate) ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 9 จาก 29 ราย (31%) และไม่มีอาการกลายพันธุ์ *KRAS* 4 จาก 33 ราย (12%)

3. ค่ามัธยฐานระยะเวลาการปลอดโรค (median progression free survival: mPFS) ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 2.8 เดือน และไม่มีอาการกลายพันธุ์ *KRAS* 1.9 เดือน

โดยสรุปจากการศึกษาของ Patnaik และคณะพบว่ายา Abemaciclib มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มากกว่าไม่มีอาการกลายพันธุ์ *KRAS*

ดังนั้นโดยสรุปจากการทบทวนวรรณกรรมทำให้สามารถทราบว่า

1. ประเทศไทยพบการกลายพันธุ์ *KRAS* ในมะเร็งปอด 22%<sup>5</sup> ซึ่งมากกว่าของประเทศอื่นๆ ในชาติตะวันออกอื่นๆ เช่น จีน ญี่ปุ่นและเกาหลี ซึ่งมีการกลายพันธุ์ *KRAS* 11.2% แต่มีเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกับ ชาวตะวันตก คือ 26.1%<sup>6</sup> แต่เนื่องจากการศึกษามีจำนวนของมะเร็งปอดเพียง 58 รายทำให้ตัวเลขอาจจะคลาดเคลื่อนได้มาก จึงน่าจะสนใจว่าน่าจะมีการศึกษาในคนไข้ที่มากกว่านี้เพื่อให้ได้อุบัติการณ์ที่ใกล้เคียงความจริงมากที่สุดของประเทศไทย

2. จากรูปภาพที่ 2 มีสมมติฐานว่าการที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ทำให้มีการขัดขวางการทำงานของโปรตีน RASSF1A จนทำให้เกิดการสะสมของ cyclinD1 เพิ่มมากขึ้นทำให้สามารถยับยั้ง apoptosis ได้ จึงทำให้เกิดกลายเป็นมะเร็งได้ ร่วมกับมีการรายงานการทดลองในหนูถึงคุณสมบัติที่เรียกว่า synthetic lethality คือ ยาที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ CDK4/6 นั้นจะต้องเกิดขึ้นร่วมกับการกลายพันธุ์ *KRAS* ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่เล็กเท่านั้น<sup>123</sup>

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณนา แบบการวิจัยเชิงวิเคราะห์ แบบ cross sectional study

#### 3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology)

##### 3.2.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

###### ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็กที่ไม่มีการกลายพันธุ์ *EGFR* และ *ALK* rearrangement ที่มารับการรักษาที่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 กรกฎาคม 2560 ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *KRAS* และตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ *KRAS*

###### เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

1. มีผลชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช้เซลล์เล็กและไม่มีคามผิดปกติของ *EGFR* และ *ALK* rearrangement

2. ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกเป็นมะเร็งปอดระยะ I ถึง IV

3. มีการกลายพันธุ์ *KRAS* หรือไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS*

###### เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ตัวอย่างชิ้นเนื้อไม่สามารถนำมาแยกเพิ่มเติมได้ (ประเมินโดยพยาธิแพทย์)

2. ไม่มีข้อมูลจากแฟ้มเวชระเบียนหรือไม่สามารถเก็บข้อมูลได้

#### 3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากเป็น pilot study และ เป็นการหาขนาดตัวอย่างประเภทศึกษาความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (two independent group) จึงใช้สูตร Effect size

$$\frac{2 [(Z_{\alpha} + Z_{\beta})] \sigma ]^2}{(\mu_c - \mu_t)^2}$$

$Z_{\alpha}$  คือ ค่าของ type 1 error กำหนดไว้ที่ 0.05 ดังนั้นจะได้ค่าเท่ากับ 1.96

$Z_{\beta}$  คือ ค่าของ type 2 error กำหนดไว้ที่ 20% ดังนั้นจะได้ค่าเท่ากับ 0.84

$\sigma / (\mu_c - \mu_t) = \text{Effect size}^*$  กำหนดว่า คือ 0.8

ทำให้สามารถคำนวณ n ในแต่ละ arm ได้ 25 ชีนเนื้อ รวมปริมาณของชีนเนื้อคือ 50 ชีนเนื้อ  
\*เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาระดับของ cyclin D1 ในกลุ่มกลายพันธุ์ และไม่กลายพันธุ์ KRAS จึงใช้ effect size เป็นการประมาณโดยอิงกับความเป็นไปได้ของความสำเร็จของงานวิจัย (feasibility) ร่วมด้วย

### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### ผู้ป่วย

1. ค้นหาผู้ป่วยจากฐานข้อมูลของแผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในส่วนของ ผู้เข้าร่วม การศึกษาทุกคน ตั้งแต่ปี 1 มกราคม 2558 ถึง 31 กรกฎาคม 2560 หลังจากได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยแล้ว และได้รับการอนุญาตใช้เวชระเบียนและชีนเนื้อจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ก่อนเริ่มการดำเนินการ โดยใช้ข้อมูลจากเวชระเบียนและชีนเนื้อเดิม

2. เก็บข้อมูลทั่วไป (demographic data) ประกอบด้วย อายุ เพศ โรคประจำตัว น้ำหนักตัวที่ลด ประวัติการสูบบุหรี่

3. ลักษณะทางคลินิก ลักษณะทางพยาธิวิทยา (clinical and pathological characteristics) ประกอบด้วย ระยะ ลักษณะของการกระจายโรค ชนิดย่อยของเนื้องอก การตรวจการกลายพันธุ์ ข้อมูลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (ถ้ามี) การรักษาที่ได้รับ ระยะเวลาปลอดการดำเนินโรค โดยข้อมูลได้จากการทบทวนเวชระเบียนที่มีข้อมูลอยู่แล้ว

#### ชีนเนื้อพยาธิวิทยา

นำชีนเนื้อของผู้ป่วย มาตรวจสอบคุณภาพของชีนเนื้อโดยมีพยาธิแพทย์ท่านเดียวที่อ่าน

### การตรวจหา KRAS mutation gene

-การตรวจ KRAS\_mutation ทำโดยใช้ FDA-approved Cobas<sup>R</sup> KRAS mutation test

### การตรวจ KRAS mutation ด้วย Cobas<sup>R</sup> KRAS mutation test

ใช้หลักการ PCR amplification of target KRAS gene โดยใช้ 2 complimentary primer pairs spanning สำหรับ

- 1) 85 bp sequence of exon 2 codon 12 and 13
- 2) 75 bp sequence exon 3 codon 61 of KRAS gene

ดังนั้นในแต่ละ sample จะต้องทำการ amplification ใน 2 PCR reactions คือ 1) KRAS codon 12/13 reaction 2) KRAS codon 61 reaction ในการค้นหา (detection) ใช้ automated real-time mutation detection ด้วย cobas z 480 analyzer ซึ่งมีค่าความไว (sensitivity) ในการหาการกลายพันธุ์ที่ประมาณ 5% โดยใช้หลักการของ melting temperature program ร่วมกับ oligonucleotide specific probe with 5' fluorescent report and 3' quencher dye ที่อุณหภูมิต่ำ (low temperature) นั้น oligonucleotide probe จะสามารถจับได้ทั้ง wild type และ mutant amplicon และจะปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ (emit fluorescent) ได้ เนื่องจาก 5' end fluorescent reporter อยู่ห่างจาก 3' end quencher dye แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น probe จะแยกออกจาก amplicon ทำให้มีการลดลงของ fluorescent signal เนื่องจาก 5' end fluorescent reporter อยู่ใกล้กับ 3' end quencher dye โดย wild type amplicon กับ mutant amplicon จะมี melting temperature ที่แตกต่างกัน โดย wild type amplicon จะมี melting temperature ที่สูงกว่า mutant amplicon เนื่องจาก wild type amplicon มีการจับเข้าคู่อย่างสมบูรณ์ (perfect match) กับ probe ในขณะที่ mutant amplicon จะมีตำแหน่ง mismatch ดังนั้นจะสามารถแยก wild type กับ mutant KRAS ได้ที่ melting temperature ที่แตกต่างกัน โดยในแต่ละ reaction จะมีการใส่กลุ่มควบคุม (quality controls) ดังนี้ KRAS calibrator (KRAS wild-type) KRAS mutant control (Mutant KRAS exon 2 and 3 and wild-type KRAS) และ negative control

ขั้นตอนการตรวจ ประกอบไปด้วย

- 1.การเตรียม Working Master Mixes สำหรับการตรวจ KRAS codon 12/13 และ codon 61 โดยมีส่วนประกอบดังนี้ ต่อ 1 sample ดังแสดงใน ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงออกประกอบของสารทำปฏิกิริยาเพื่อหาการกลายพันธุ์ *KRAS*

	Working Mater Mixes for <i>KRAS</i> codon 12/13	Working Mater Mixes for <i>KRAS</i> codon 61
<i>KRAS</i> Reaction Mix (containing dNTPs, Z05 DNA polymerase, AmpErase enzyme)	10 ul	10 ul
Magnesium acetate (MGAC)	6 ul	6 ul
Oligonucleotide Mix (OM)	10 ul of <i>KRAS</i> 12/13 OM (ประกอบด้วย primers และ fluorescent probe for <i>KRAS</i> codon 12/13)	10 ul of <i>KRAS</i> 61 OM (ประกอบด้วย primers และ fluorescent probe for <i>KRAS</i> codon 61)

2. ทุกปฏิกิริยาให้ใช้ pipette ขนาด 25 ul โดยใช้ร่วมกับ Mater Mix into the microwell plate
3. Pipette 25 ul of 2 ng/ml specimen DNA sample (50 ng DNA) หรือ K-ras controls into the microwell plate and mix well
4. ปิดด้วย microwell plate และห่อด้วย foil และเริ่มกระบวนการ PCR cobas z 480 analyzer

ตารางที่ 9 การแปลผลการทดสอบการกลายพันธุ์ *KRAS* โดยวิธี Cobas

ผลการทดสอบ	ผลการกลายพันธุ์
พบการกลายพันธุ์ (Mutation detected)	พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 12/13 หรือ codon 61 (ซึ่ง อาจจะพบทั้ง 2 ตำแหน่งพร้อมกันได้ )
ไม่พบการกลายพันธุ์ (Mutation not detected)	ไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 12/13 และ codon 61
ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid)	ไม่สามารถแปลผลได้ แนะนำว่าให้นำชิ้นเนื้อมาละลายมาก ขึ้นตาม protocol
ล้มเหลว (failed)	ไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากอุปกรณ์หรือโปรแกรมเสีย



## ขั้นตอนการย้อม Immunohistochemistry (IHC) ของ cyclin D1

### 1. ขั้นตอนการเตรียมสไลด์

1.1 เตรียม formalin-fixed paraffin-embedded section หนา 2 ไมครอน หรือ slide suprefrost plus

1.2 นำสไลด์อบที่ 60 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

- Slide superfrost plus แห่งที่อุณหภูมิห้องโดยตั้งให้ตั้งฉากก่อนที่จะให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสนานที่สุด 10 นาที

1.3 Deparaffinized แล้ว rehydrate ด้วยน้ำกลั่น

2. กระบวนการ Epitope Retrieval โดยใช้กระบวนการอัตโนมัติของ เครื่อง PT Linked ของ Dako ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้

2.1. ยับยั้งกระบวนการ endogenous peroxidase activity ของตัวเซลล์เอง

2.2. ยับยั้งพื้นหลังอย่างไม่เฉพาะเจาะจง (block non-specific background)

2.3. กระบวนการเติมแอนติบอดี (antibody) โดยใช้ monoclonal rabbit anti-Human cyclinD1 clone EP12 ของยี่ห้อ Dako

2.4. กระบวนการเติมสี

### การนับเปอร์เซ็นต์การติดสีของ Immunohistochemistry

หลังจากปรึกษากับพยาธิแพทย์เพื่อให้สามารถสอดคล้องกับการนำไปใช้ของพยาธิแพทย์ท่านอื่นๆในอนาคต เห็นว่า การย้อมจะใช้ชุดย้อมหาปริมาณ cyclin D1 ซึ่งแปลผลโดยดูปริมาณ cyclin D1 บนผิวนิวเคลียสของเซลล์อย่างน้อย 100 เซลล์และแปลผลตามระดับการติดสีของ cyclin D1 หรือเรียกว่า Q-score ที่มีนิยามเป็นมาตรฐานแบ่งออกเป็น

1. ติดสีอย่างมาก (strongly positive) คือ 3 คะแนน นิยามคือเห็นได้ชัดจากกล้องจุลทรรศน์การขยาย 10 เท่า

2. ติดสีปานกลาง (moderately positive) คือ 2 คะแนน นิยามคือเห็นได้ชัดจากกล้องจุลทรรศน์การขยาย 40 เท่า

3. ติดเพียงเล็กน้อย (minimally positive) คือ 1 คะแนน นิยามคือเห็นได้ชัดจากกล้องจุลทรรศน์การขยาย 100 เท่า

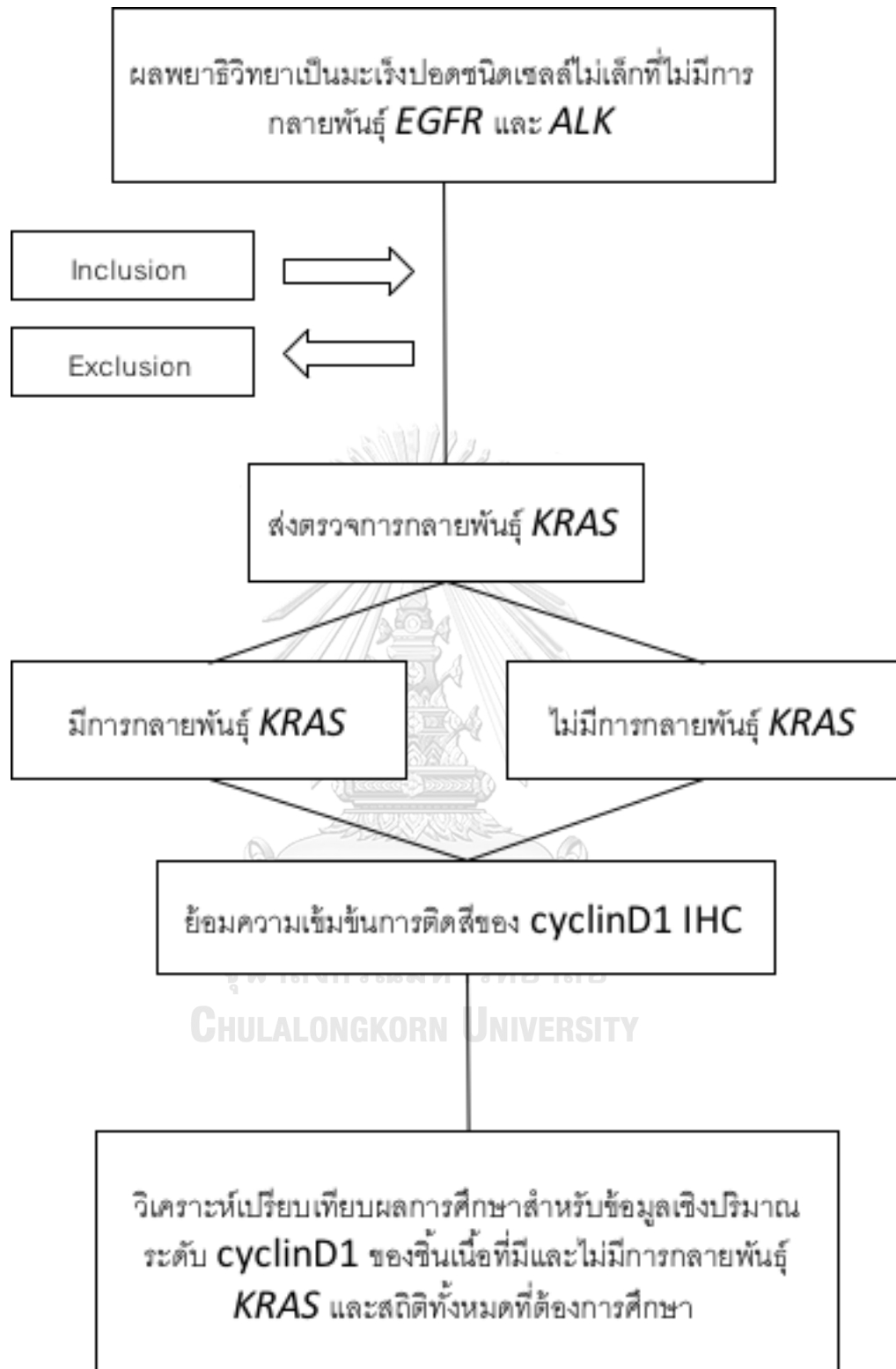
4. ไม่ติดสี หรือ 0 คะแนน นิยามคือ ไม่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์การขยาย 100 เท่า

โดยในแต่ละแผ่นชิ้นนี้อาจจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่ติดสีแตกต่างกันภายใน 100 เซลล์  
 ดังนั้น จะนำคะแนนคูณกับจำนวนเซลล์ที่มีการติดสี ทำให้ได้คะแนนรวม และนำไปหารกับคะแนน  
 เต็ม 300 คะแนน และคูณ 100 ตามสูตรดังนี้

$$\{ [ 1 \times (\% \text{ cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ cells } 3+) ] / 300 \} \times 100$$

ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับพยาธิแพทย์ที่อ่าน คือพยาธิแพทย์ที่มี  
 ความเชี่ยวชาญการอ่านชิ้นเนื้อมะเร็งปอดมากกว่า 20 ปี คือ รศ.นพ.ปญฺญชวิษฐ์ จันทรานุกัฒน์ ซึ่ง  
 จะไม่ทราบรายละเอียดผู้ป่วย (Blind)





แผนภูมิรูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บข้อมูลจากแผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ผู้เก็บและบันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัยโดยมีการเก็บข้อมูลและบันทึกใน case record form (ภาคผนวก) ซึ่งขั้นตอนการรวบรวมประกอบด้วย

1. ค้นหาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดไม่ใช่เซลล์เล็ก
2. ตรวจสอบประวัติการได้รับยาเคมีบำบัด รังสีวิทยา และการผ่าตัด
3. นำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมาตรวจหาการกลายพันธุ์ KRAS และอื่นๆ
4. ย้อมหาการแสดงออกของ cyclin D1 (cyclinD1 overexpression) ด้วยวิธี IHC
5. ทบทวนเวชระเบียน ภาพถ่ายทางรังสีวิทยา เพื่อดูระยะเวลาการดำเนิน

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ข้อมูลเชิงคุณภาพโดยใช้สถิติพรรณนา (Descriptive) แสดงความถี่ (frequency, N) และร้อยละ (%)
2. ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงค่ากลางด้วย ค่าเฉลี่ย มัชยฐาน และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)
3. ในลำดับของการวิเคราะห์อนุมานทางสถิติ โดยค่าสถิติทั้งหมดจะกำหนดค่าระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $p\text{-value} < 0.05$  ใช้สถิติวิเคราะห์ในแต่ละวัตถุประสงค์ของผลการศึกษาดังต่อไปนี้

3.1 วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการศึกษาสำหรับข้อมูลเชิงปริมาณระดับ cyclin D1 ของชิ้นเนื้อที่มีการกลายพันธุ์ KRAS และไม่มีการกลายพันธุ์ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยหรือไม่ ด้วยสถิติ unpaired t-test

3.2 วิเคราะห์ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกด้วยการวิเคราะห์สัดส่วนแบบคอกซ์ (Cox proportional hazards model) เพื่อหาปัจจัยที่มีผล เช่น การสูบบุหรี่ อายุ เชื้อชาติ ผลทางพยาธิวิทยา เป็นต้น

3.3 survival analysis ใช้ Cox regression และเปรียบเทียบ survival curve ของ KRAS MT และ WT ด้วย Log rank test

3.4 ใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 (IBM Corp., Chicago, IL, USA.) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

ผลของวัตถุประสงค์หลัก: ความเข้มข้นการติดสีของ Cyclin D1 กับ การกลายพันธุ์ KRAS

คำถามหลักของการวิจัยคือ เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับ cyclin D1 ในชิ้นเนื้อ มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มี และไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS ว่ามีความแตกต่างกันเกิน 20% หรือไม่ จากตารางที่ 12 พบว่าความเข้มข้นติดสีไซคลินดีวันเฉลี่ย อยู่ที่ 56% (พิสัย 30-82%) โดย ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นติดสีไซคลินดีวันของชิ้นเนื้อที่มีการกลายพันธุ์ KRAS เท่ากับ 64% (พิสัย 39-89%) และไม่มีการกลายพันธุ์คราสเท่ากับ 49% (พิสัย 24-74%) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ KRAS พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ( $p = 0.037$ )

ผลของวัตถุประสงค์รอง : ข้อมูลพื้นฐาน

งานวิจัยชิ้นนี้พบว่าในเนื้อตัวอย่างจำนวน 471 ราย ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 กรกฎาคม 2560 ซึ่งสามารถนำมาส่งตรวจหการกลายพันธุ์เป็นลำดับ ตามแผนภูมิที่ 3 พบการ กลายพันธุ์ EGFR รวม 262 ราย (55%) ไม่พบการกลายพันธุ์ EGFR 209 ราย (45%) พบ การเรียง ตัวผิดปกติของ ALK 3 ราย (0.6%) ทำให้เหลือชิ้นเนื้อเพื่อส่งตรวจการกลายพันธุ์ KRAS 206 ราย ซึ่ง 104 รายไม่สามารถส่งตรวจการกลายพันธุ์ KRAS ได้เพราะว่าประเมินแล้วไม่มีปริมาณ DNA ที่เพียงพอในการส่งตรวจทำให้เหลือชิ้นเนื้อเพียง 102 ราย ซึ่งมีชิ้นเนื้อที่ตรวจ KRAS แล้วแต่ไม่สามารถแปลผลได้ (Invalid result) จำนวน 7 ราย จึงเหลือชิ้นเนื้ออีก 95 ราย และตรวจพบการ กลายพันธุ์ KRAS จำนวน 28 ราย ซึ่งมีปริมาณชิ้นเนื้อเหลือเพียงพอสำหรับนำไปส่งตรวจความ เข้มข้นการติดสีไซคลินดีวันที่นิวเคลียสได้ 25 ราย และ ไม่พบการกลายพันธุ์ KRAS 67 ราย ซึ่งเรา ได้ทำการสุ่มตรวจชิ้นเนื้อที่เพียงพอสำหรับนำไปส่งตรวจความเข้มข้นการติดสีไซคลินดีวันทั้งสิ้น 27 ราย ดังนั้นจึงพบว่าการอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ KRAS เมื่อไม่ได้นำชิ้นเนื้อที่คัดออกเพราะว่า DNA ไม่เพียงพอ ( $n = 104$  ราย) หรือว่า DNA เพียงพอแต่ไม่สามารถแปลผลได้ ( $n = 7$  ราย) ดังนั้นจะมีการกลายพันธุ์ KRAS 28 ราย จากทั้งหมด 367 รายคิดเป็นร้อยละ 7.6%

จากข้อมูลชิ้นเนื้อที่นำมาข้อม IHC หาความเข้มข้นการติดสี cyclinD1 ทั้งหมด 52 รายที่พบข้อมูลดังนี้ ข้อมูลพื้นฐาน ดังแสดงในตารางที่ 11 ค่ามัธยฐานของผู้ป่วยที่เข้าการศึกษา คือ 67 ปี (พิสัย 54-80 ปี) เป็นเพศชายมากกว่าหญิง โดยเพศชายคิดเป็นร้อยละ 73.1% ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่เคยหรือกำลังสูบบุหรี่อยู่ 62.7% ส่วนใหญ่น้ำหนักตัวลดลงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5% คิดเป็น 60% ส่วนใหญ่ผู้ป่วยผู้ป่วยมีสภาวะร่างกายอยู่ในระดับที่ 1 เมื่อประเมินด้วยคะแนน ECOG ชนิดของเนื้องอกเป็นชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) 84.6% ส่วนใหญ่ระยะของโรคเริ่มต้นที่เป็นโรคคือ ระยะที่ 4 คิดเป็น 73.1% ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีการกลับเป็นซ้ำของโรคหลังการรักษาเบื้องต้น 85.7% และมีอัตราการเสียชีวิต 71.2% โดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาปลอดโรค 11 เดือน (พิสัย 12-24 เดือน) และ มีความเข้มข้นติดสีไซโคลินดีวันเฉลี่ย อยู่ที่ 56% (พิสัย 30-82%)

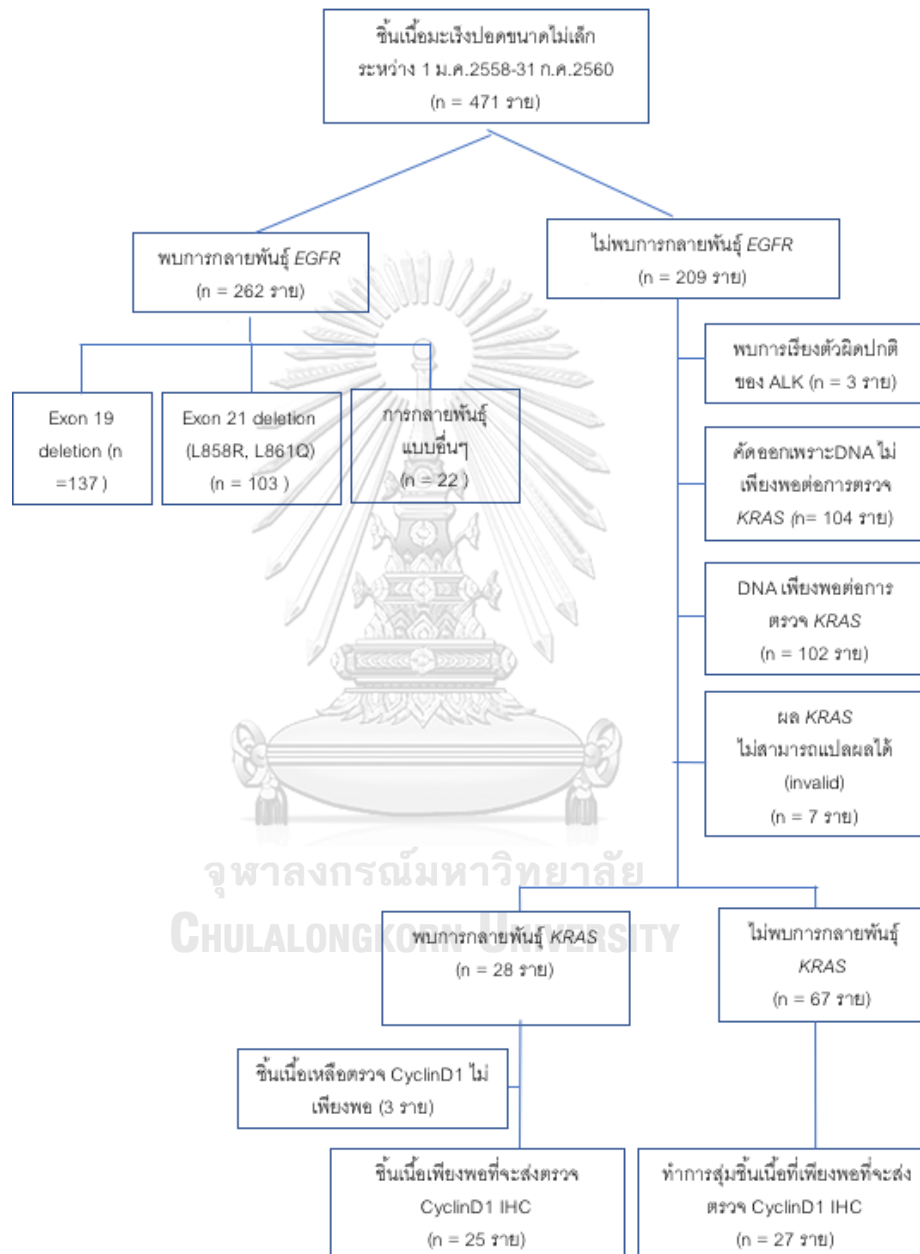
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* พบว่าข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ต่อ อายุ ECOG น้ำหนักตัวที่ลดลง ชนิดของเนื้องอก ระยะของโรคเริ่มต้น การกลับเป็นซ้ำของโรค อัตราการเสียชีวิต แต่มีความสัมพันธ์ที่พบมากกว่าในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) คือ เพศชาย ( $p = 0.001$ ) ประวัติการสูบบุหรี่ทั้งอดีตและปัจจุบัน ( $p = 0.005$ )

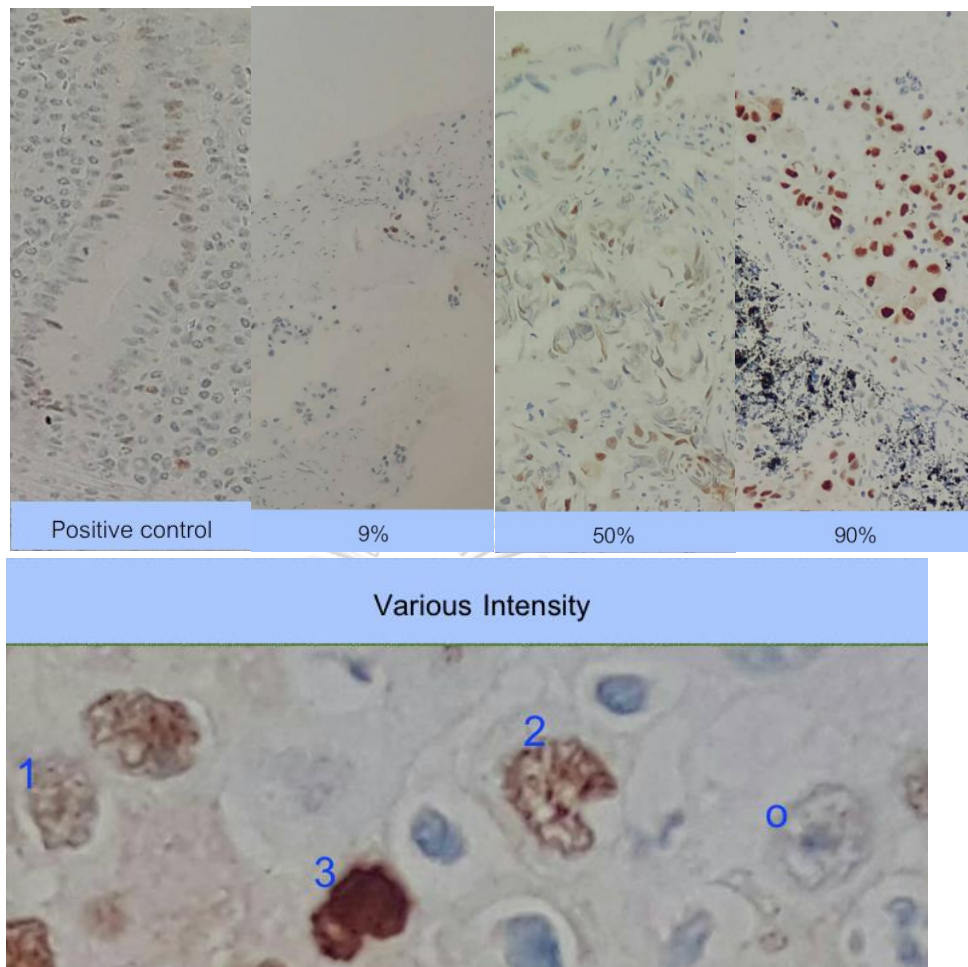
#### ผลของวัตถุประสงค์รอง : การรอดชีวิตกับการกลายพันธุ์ *KRAS*

คำถามรองของการวิจัยฉบับนี้ คือดูการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ในช่วงเวลาที่วิเคราะห์ผลการศึกษา 30 กันยายน พ.ศ.2560 พบผู้ป่วยเสียชีวิต 37 รายจาก 52 รายคิดเป็น ร้อยละ 71.2% โดยที่การเสียชีวิตพบในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* (84%) มากกว่าไม่กลายพันธุ์ (59.3%) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.097$ ) และทางผู้วิจัยพบว่า มีค่ากลางของการอยู่รอดเฉลี่ย 11 เดือน (พิสัย 12-24 เดือน) โดยที่การกลายพันธุ์ *KRAS* มีระยะเวลาการรอดชีวิตเฉลี่ยน้อยกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ เท่ากับ 8 (พิสัย 7.2-20) และ 14 (พิสัย 12.7-34.9) เดือน ตามลำดับ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.053$ ) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้แสดงเป็นแนวโน้มของการอยู่รอดด้วย กราฟการรอดชีวิตแบบแคบแพลนไมเออร์ เปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ตามแผนภูมิรูปที่ 5 พบว่าการกลายพันธุ์ *KRAS* มีแนวโน้มที่จะมีการรอดชีวิตน้อยกว่าไม่มีการกลายพันธุ์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์แยกออกเป็น ระยะที่ 1-2 ระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ตามรูปภาพที่ 5.2-5.4 ตามลำดับ พบว่าไม่มีระยะใดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตระหว่างมีการกลายพันธุ์และไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS*

แผนภูมิรูปที่ 3 แสดงแผนผังแสดงการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย

(consort diagram)





รูปภาพที่ 8 : ภาพผลลัพธ์ของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้  
 รูปภาพ 8A (บน) ภาพขยาย 200 เท่าของร้อยละการย้อมติดไซโตคลินดีวัน  
 รูปภาพ 8B ภาพขยาย 600 เท่า แสดงความเข้มในการติดสีเป็นสี่ระดับ  
 (3+ strong, 2+: intermediate, 1+: weak, 0: none).



ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลพื้นฐาน

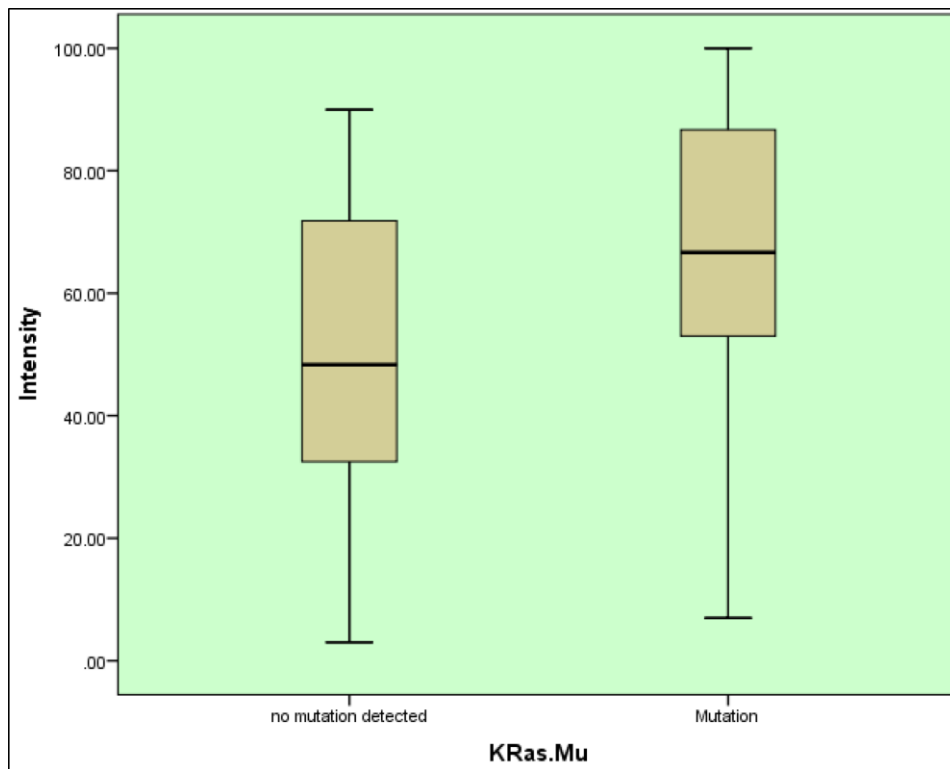
ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง		KRAS WT (N = 27)	KRAS MT (N = 25)	รวม (N = 52)	pvalue
อายุ	≤ 65 - no. (%)	12 (44.4%)	9 (36%)	21(40.4%)	0.736
	> 65 - no. (%)	15 (55.6%)	16 (64%)	31(59.6%)	
	ค่ากลางของอายุ	66	69	67	0.272
	พิสัย	57-83	52-83	54-80	
เพศ - no. (%)	หญิง	13 (48.1%)	1 (4%)	14(26.9%)	0.001*
	ชาย	14 (51.9%)	24 (96%)	38(73.1%)	
ECOG- no. (%)	0	5 (18.5%)	2 (8%)	7(13.5%)	0.257
	1	14 (51.9%)	16 (64%)	30(57.7%)	
	2	8 (29.6%)	5 (20%)	13(25%)	
	>2	0 (0%)	2 (8%)	2(3.8%)	
น้ำหนักลด - no. (%)	≤ 5%	15 (60%)	15 (60%)	30(60%)	1.000
	>5%	10 (40%)	10 (40%)	20(40%)	
ประวัติการ สูบบุหรี่ - no. (%)	ไม่เคย	15 (57.7%)	4 (16%)	19(37.3%)	0.005*
	เคยหรือ ปัจจุบันสูบบุหรี่	11 (42.3%)	21(84%)	32(62.7%)	
ชนิดทาง พยาธิวิทยา - no. (%)	Adenocarcinoma	23 (85.2%)	21 (84%)	44(84.6%)	0.717
	NSCLC-favor adenocarcinoma	2 (7.4%)	2 (8%)	4(7.7%)	
	NSCLC-NOS	1 (3.7%)	2 (8%)	3 (5.8%)	
	Lymphoepithelial carcinoma	1 (3.7%)	0 (0%)	1 (1.9%)	
ระยะ- no. (%)	I-II	2 (7.4%)	2 (8%)	4 (7.7%)	0.851
	III	6 (22.2%)	4 (16%)	10(19.2%)	
	IV	19 (70.4%)	19 (76%)	38(73.1%)	
การกลับเป็น ซ้ำของโรค - no. (%)	ไม่กลับเป็นซ้ำ	2 (25%)	0 (0%)	2(14.3%)	0.473
	กลับเป็นซ้ำ	6 (75%)	6 (100%)	12(85.7%)	

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง		KRAS WT (N = 27)	KRAS MT (N = 25)	รวม (N = 52)	pvalue
การเสียชีวิต - no. (%)	ไม่เสียชีวิต - no. (%)	11 (40.7%)	4 (16%)	15(28.8%)	0.097
	เสียชีวิต - no. (%)	16 (59.3%)	21 (84%)	37(71.2%)	
	ค่ากลางของการ อยู่รอด (เดือน)	14.0	8.0	11.0	0.053
	พิสัยเวลาของการ อยู่รอด (เดือน)	12.7-34.8	7.2-20	12-24	

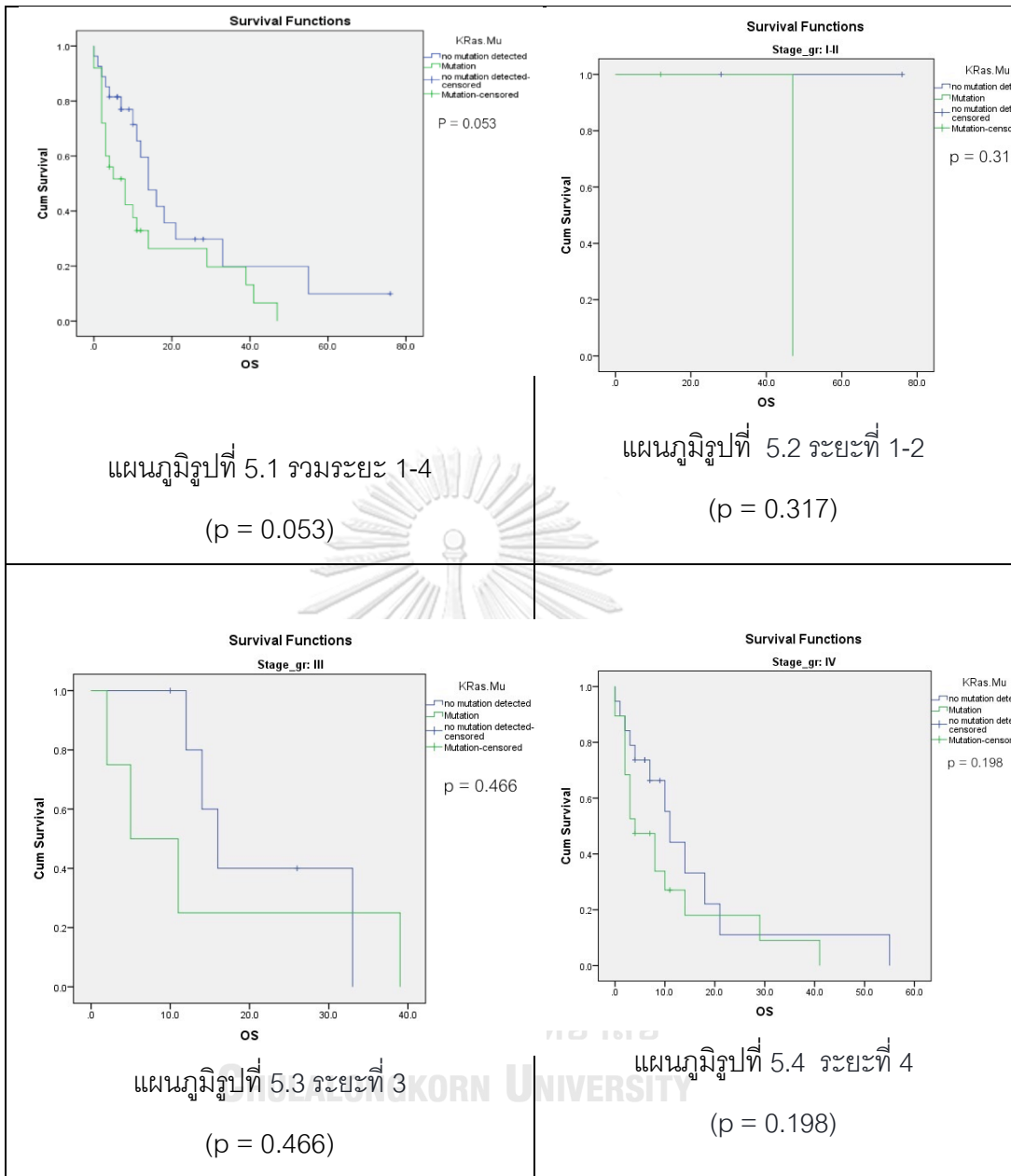
\*p &lt; 0.05

ตารางที่ 11 แสดงความเข้มข้นของการติตไซคลินดีวัน

ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่าง		KRAS WT (N = 27)	KRAS MT (N = 25)	รวม (N = 52)	pvalue
CyclinD1	เปอร์เซ็นต์ความ เข้มข้นการติตจาก IHC	49	64	56	0.037*
	พิสัยเปอร์เซ็นต์ความ เข้มข้นการติตสีของ ไซคลินดีวัน	24-74	39-89	30-82	



แผนภูมิรูปที่ 4 แสดงแผนภาพแบบกล่อง (Box Plot) เปรียบเทียบแนวโน้มความเข้มข้นของ Cylind1 ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์เคราส



แผนภูมิรูปที่ 5 กราฟการรอดชีวิตแยกตามระยะเปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มีการกลายพันธุ์

KRAS วิเคราะห์โดย log-rank test

แผนภูมิรูปที่ 5.1 รวมระยะ 1-4 แผนภูมิรูปที่ 5.2 แสดงระยะที่ 1-2

แผนภูมิรูปที่ 5.3 แสดง ระยะที่ แผนภูมิรูปที่ 5.4 แสดงระยะที่ 4

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐานทางด้านคลินิกจะเห็นได้ว่า ความชุกของการกลายพันธุ์ *KRAS* นี้คือ 7.6% ซึ่งน้อยกว่า การศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทยของ Petmitr และคณะ<sup>5</sup> พบการกลายพันธุ์ *KRAS* 22% (12 รายจาก 58 ราย) แต่ว่าวิจัยนี้มีความชุกใกล้เคียงกับการศึกษาแบบ *metanalysis*<sup>6</sup> พบว่าชาวเอเชีย คือ จีน เกาหลีและญี่ปุ่นพบการกลายพันธุ์ 11.2% ชาวตะวันตกพบประมาณ 26.1% ซึ่งความแตกต่างระหว่างงานวิจัยฉบับนี้กับข้อมูลก่อนหน้า อาจจะเป็นเพราะว่าการศึกษาของเรามีจำนวนชิ้นเนื้อที่ต้องคัดออกเนื่องด้วย DNA ไม่เพียงพอต่อการตรวจการกลายพันธุ์ *KRAS* สูงถึง 22% (104 รายจาก 471 ราย) ก็เป็นไปได้

สำหรับอีกเหตุผลหนึ่งที่จะทำให้ความชุกของการกลายพันธุ์ *KRAS* น้อยกว่ากับการศึกษาของ Petmitr และคณะ ค่อนข้างมาก อาจจะเป็นเพราะว่ามีการเลือกส่งตรวจการกลายพันธุ์ *EGFR* และความผิดปกติการเรียงตัวของ *ALK* ในผู้ป่วยที่มีโอกาสที่จะมีผลเป็นบวก เช่น ผู้หญิง ไม่สูบบุหรี่ แต่ความชุกของการศึกษานี้มีความชุกใกล้เคียงกับการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ *EGFR* ในประเทศไทยของ Shi และคณะในปี 2557 พบว่ามีเท่ากับ 53.8%<sup>126</sup> โดยที่งานวิจัยฉบับนี้มีความชุกของการกลายพันธุ์ *EGFR* 55.6% ทำให้คิดว่าถึงแม้จะมีการเลือกส่งตรวจการกลายพันธุ์ *EGFR* และความผิดปกติการเรียงตัวของ *ALK* แต่ก็อาจจะส่งผลไม่มากที่จะทำให้ความชุกของ *KRAS* มีความคาดเคลื่อนมากนัก

โดยสรุปคิดว่า ความชุกของการกลายพันธุ์ *KRAS* 7.6% จากงานวิจัยฉบับนี้จึงมีความน่าเชื่อถือ สำหรับเหตุผลตามที่ *metanalysis*<sup>6</sup> กล่าวว่าชาวเอเชียมีอุบัติการณ์น้อยกว่าชาวตะวันตก อาจจะเป็นเนื่องจากเทคนิคการตรวจที่แตกต่างกัน หรือสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดมะเร็งปอดชนิดไม่เล็กแตกต่างกัน เช่น การสัมผัสกับก๊าซเรดอน มลภาวะทางอากาศ หรือว่าไอระเหยจากน้ำมัน แต่ว่าปัจจัยดังกล่าวยังไม่ได้รับการพิสูจน์ว่าสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ *KRAS* หรือไม่ก็ตาม

การศึกษานี้พบลักษณะทางคลินิกที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้า คือ พบการกลายพันธุ์ *KRAS* ในเพศชาย (96%) มากกว่าเพศหญิง (4%) พบในคนที่เคยสูบบุหรี่และสูบบุหรี่ในปัจจุบัน (84%) มากกว่าไม่เคยสูบบุหรี่ (16%)<sup>127</sup> แต่ก็พบว่า ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ อายุ คะแนน ECOG น้ำหนักลด การกลับเป็นซ้ำของโรค รวมถึงการเสียชีวิต แต่ว่าสำหรับ *KRAS* MT สามารถเป็น

ปัจจัยในการพยากรณ์โรคได้หรือไม่ การศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเพราะว่าข้อมูลมีความขัดแย้งกัน<sup>127</sup> โดยที่ระยะเริ่มแรกในการวินิจฉัยอาจจะส่งผลต่อปัจจัยการพยากรณ์โรคที่แตกต่างกัน คือ จากข้อมูลวิจัยแบบ pooled analysis ของ Shepherd และคณะ<sup>128</sup> พบว่า ในผู้ป่วย 1,543 รายที่สามารถผ่าตัดได้และได้รับเคมีบำบัดเสริมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการรอดชีวิตระหว่างผู้ป่วย 300 รายที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* เทียบกับผู้ป่วย 1,243 รายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ( $p > 0.05$ ) ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วย NSCLC ระยะที่ IV ที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มีการพยากรณ์โรคที่แย่กว่า โดยข้อมูลจากการศึกษาของ Johnson และคณะ<sup>129</sup> พบว่าในผู้ป่วย NSCLC ระยะที่ 4 จำนวนรวม 1,036 ราย แบ่งออกเป็นที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 241 ราย (23%) มีการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* 275 ราย (26.5%) และไม่มีการกลายพันธุ์ *EGFR* และ *KRAS* 520 ราย (50.5%) ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดหรือยาออกฤทธิ์มุ่งเป้า พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์แบบ multivariate analysis ทำให้พบว่าการกลายพันธุ์ *KRAS* มีอัตราการรอดชีพที่น้อยกว่า (Hazard ratio [HR], 1.21;  $P = 0.048$ ) แสดงว่า ปัจจัยการพยากรณ์โรคมีความเกี่ยวข้องกับระยะเริ่มต้นของการวินิจฉัย

สำหรับงานวิจัยฉบับนี้พบว่ามีความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยระยะเวลาการรอดชีวิตสั้นกว่าในกลุ่ม *KRAS* MT (8 เดือน) เมื่อเทียบกับ *KRAS* WT (14 เดือน) โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.053$ ) สำหรับสาเหตุที่ทำให้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอาจจะเป็นเพราะว่า 1) ประกอบด้วยหลายระยะ โดยที่ส่วนใหญ่เป็นระยะที่ IV คือ 73.1% ระยะที่ III 19.2% และน้อยสุดคือระยะที่ I-II 7.7% 2) เป็นการสำรวจแบบย้อนหลังทำให้มีปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้เกิดเป็นอคติ ที่อาจจะทำให้มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วย เช่นโรคประจำตัวของผู้ป่วย การรักษาที่แตกต่างกัน เช่น สูตรยาเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพแตกต่างกันในแต่ละสูตร หรือ 3) ปริมาณของผู้ป่วยที่มีจำนวนน้อยเพียง 52 ราย

สำหรับคำถามหลักของการวิจัยคือ เพื่อศึกษาความแตกต่างของการติดสี Cyclin D1 ที่นิวเคลียสในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ว่ามีความแตกต่างกันเกิน 20% หรือไม่ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นติดสี CyclinD1 ของกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มีมากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากการศึกษา ก่อนหน้า ทำให้ทราบว่าโปรตีน CyclinD1 เป็นโปรตีนที่อาจจะตรวจพบได้ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส ซึ่ง CyclinD1 ในไซโตพลาสซึมจะเป็นลักษณะที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive form) แต่ว่าในนิวเคลียสจะเป็นแบบที่พร้อมทำงาน (active form) ซึ่งหลังจากโปรตีน CyclinD1 ถูกขับออกนอกนิวเคลียสจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ยูบิควิตินไลเกส (Ubiquitin ligase)<sup>130</sup> การศึกษาของ

Comstock และคณะพบว่าในมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* จะมี เอนไซม์ดียูบิควิตินเนส (DUB: Deubiquitinase) ยูเอสพี 18 สูงกว่า<sup>131</sup> ซึ่งเอนไซม์ดียูบิควิตินเนส (DUB: Deubiquitinase) ยูเอสพี 18 (USP18) มีหน้าที่ทำให้เกิดการสลายของเอนไซม์ยูบิควิตินเนสมากขึ้น ทำให้ไม่มีเอนไซม์ไปทำให้เกิดการทำลายโปรตีน CyclinD1 ในไซโตพลาสซึม ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่อธิบายว่าทำไมไซคลินดีวันในนิวเคลียสจึงพบได้มากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS*

สำหรับสาเหตุอื่นๆ ที่อาจจะกระตุ้นการแสดงออกของ cyclinD1 ที่เป็นผลลัพธ์สุดท้ายอีกด้วย ดังแสดงในรูปภาพที่ 6 คือ 1) RTK (receptor tyrosine kinase) 2) Wnt signalling pathway 3) NK-KB pathway ซึ่งทั้ง 3 เส้นทางนี้ จะทำให้เกิดการถอดรหัสของยีน *CCND1* เพิ่มขึ้น หรือการแปลรหัสสร้างโปรตีน cyclinD1 เพิ่มขึ้น เช่นถ้ามี 1) การกระตุ้นผ่านทาง PI3K-AKT-mTOR pathway 2) การตรวจพบการหายไปของ miRNA (microRNAs) ที่มีเป้าหมายที่ยีน *CCND1* เช่น miR-15a และ miR-16 โดยอาจจะร่วมกับการที่มีการหมุนเวียนกลับมาใช้โปรตีนไซคลินดีเพิ่มขึ้นผ่านการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง T286 โดยใช้เอนไซม์ GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) แต่เนื่องด้วยลักษณะที่เรียกว่า Mutual exclusivity ของการกลายพันธุ์ *KRAS* จึงคิดว่าไม่น่าจะทำให้เกิดกระบวนการสร้าง cyclinD1 เพิ่มขึ้นได้จากการกลายพันธุ์อื่นร่วมกัน

จากการศึกษาก่อนคลินิก (preclinical study) ของ Puyol และคณะพบว่าในมะเร็งปอดของหนูพบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดถ้าให้สารไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CDK4 ในหนูที่มีการกลายพันธุ์แบบ *KRAS* แต่จะไม่พบลักษณะการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งถ้าเกิดว่าไม่พบการกลายพันธุ์แบบ *KRAS* หรือว่ามีการยับยั้งเพียงแค่ออนไซม์ CDK4 เท่านั้น โดยมีขนาดของการลดลงของเนื้อเยื่อมะเร็งปอดแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ<sup>123</sup>

ดังนั้นจึงมีการศึกษาในคนต่อมา คือ การศึกษาในระดับคลินิกระดับที่ 1 (Phase I clinical study) ของ Patnaik และคณะ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1.หาความปลอดภัยของการการใช้ยา 2.หาเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic effect) 3.เภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) 4. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการโตของเนื้องอก (antitumoral activity) เป็นการศึกษาแบบหลายสถาบัน (multicenter study) ซึ่งเป็นการทดลองแบบตะกร้า (Basket trial) คือ ยา 1 ชนิดต่อมะเร็งหลายชนิด รวมจำนวนผู้ป่วย 225 รายซึ่งประกอบด้วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก มะเร็งสมองชนิดไกลิโอบลาสโตมา (Glioblastoma) มะเร็งเม็ดสี (Melanoma) มะเร็งเต้านม (Breast Cancer) มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (Colorectal carcinoma) ในส่วนของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก จำนวน 68 ราย ซึ่งประกอบด้วยมะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 29 ราย คิดเป็น 42.6% พบว่า

การใช้ยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CDK4 และ CDK6 ที่ชื่อว่า อะเบมาซิคลิบ (Abemaciclib) ทำให้เกิดการตอบสนองต่อยาในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (DCR; Disease control rate) ได้ 55% เมื่อเทียบกับไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ซึ่งควบคุมโรคได้เพียงแค่ 39% และทำให้มีการปลอดโรค (PFS; progression free survival) ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* 2.8 เดือน และ 1.9 เดือน ในผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ทำให้มีการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ที่ชื่อว่า จูนิเปอร์ (JUNIPER) ที่จะศึกษาประสิทธิภาพของยา abemaciclib เทียบกับ ยาเออโลทินิบ (Erlotinib) ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* เท่านั้นและเคยได้รับการรักษามาด้วยวิธีอื่นมาแล้ว ประมาณ 450 คน ปัจจุบันได้รวบรวมผู้ป่วยครบแล้วและจะมีการประกาศผลการศึกษาในปีพ.ศ. 2561 นี้

โดยสรุปจากผลการวิจัยฉบับนี้ทำให้สนับสนุนเหตุผลที่ทำให้การใช้ยายับยั้งเอนไซม์ CDK4/6 ที่ทำงานร่วมกับโปรตีน CyclinD1 ได้ผลในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ เนื่องจากพบการแสดงของโปรตีน cyclinD1 ที่เพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มากกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 6  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY  
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

### 6.1 ข้อสรุปผลการศึกษาและการประยุกต์ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทำให้เห็นว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* มีความแตกต่างในเรื่องของการติดสี CyclinD1 บริเวณนิวเคลียสมากกว่ามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ไม่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* อย่างน้อย 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งทำให้ทราบได้ว่าอุบัติการณ์การเกิดการกลายพันธุ์ *KRAS* ของคนไทยที่มารักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์น้อยกว่าชาติตะวันตก รวมทั้งผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางคลินิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ เพศชายมากกว่าหญิง มีประวัติเคยหรือกำลังสูบบุหรี่มากกว่าไม่สูบบุหรี่ อีกทั้งการศึกษานี้ทำให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณความเข้มข้นการติดสีของ CyclinD1 ที่



นิวเคลียสไม่ใช่ปัจจัยในการพยากรณ์โรค แต่การที่มีการกลายพันธุ์ *KRAS* ทำให้มีแนวโน้มว่าจะมีระยะเวลารอดชีวิตที่สั้นกว่าไม่มีการกลายพันธุ์ถึงแม้ว่าจะแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็

## 6.2 ข้อจำกัดในการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง (pilot study) ซึ่งยังใช้จำนวนของชิ้นเนื้อค่อนข้างน้อย โดยที่ค่าความแตกต่าง 20% ที่กำหนดเป็นตัวเลขสมมติ (Arbitrary number) ที่คิดว่าเพียงพอในการแยกความสำคัญออกจากกันได้ระหว่างความเข้มข้นของไซคลินดีวันในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ สำหรับการมีพยาธิแพทย์เพียง 1 ท่านโดยที่ไม่ได้ทำการทดสอบกับ gold standard เช่น การที่มีผลพยาธิวิทยาที่ได้รับการยอมรับว่าดีดีสีเข้มข้น 50% แล้วทดสอบพยาธิแพทย์ที่มาอ่าน แต่ว่าทางผู้วิจัยและคณะได้ทำวิจัยร่วมกับพยาธิแพทย์ที่มีประสบการณ์สูงและเชี่ยวชาญในการอ่านชิ้นเนื้อมะเร็งปอดมากกว่า 20 ปี โดยที่วิธีการอ่าน Q-score ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับในสากลและพยาธิแพทย์มีความเชี่ยวชาญ

## 6.3 จุดแข็งในการศึกษา

จุดแข็งที่ 1 คือ ข้อมูลของอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ *KRAS* ในประเทศไทยน่าเชื่อถือมากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากการศึกษานี้ทำให้ทราบอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ *KRAS* 28 ราย จากทั้งหมด 367 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.6% ซึ่งมีความแตกต่างจากข้อมูลของ Petmitr S และคณะ<sup>5</sup> ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *KRAS* 12 ราย จาก 58 ราย คิดเป็น 22% ซึ่งอุบัติการณ์ของการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับ อุบัติการณ์ในชาติตะวันออกอื่นๆ มากกว่า เช่น จีน ญี่ปุ่นและเกาหลี ซึ่งมีการกลายพันธุ์ *KRAS* 11.2% ซึ่งข้อมูลของการศึกษาเรามีจำนวนของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจมากกว่า คือ 357 ราย เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าคือ 58 ราย ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้จะมีการคัดผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ *EGFR* และ *ALK* ออกจากการศึกษาออกไปก่อน แต่ว่าความชุกของการเกิดการกลายพันธุ์ มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย จึงคิดว่า selection bias น่าจะไม่มีผลกระทบต่อความชุกที่ตรวจพบ

จุดแข็งที่ 2 คือ วิธีการย้อมสีที่ติด cyclinD1 ในนิวเคลียสซึ่งเป็นตำแหน่งของ CyclinD1 ที่เป็นตำแหน่งที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง ร่วมกับค่าใช้จ่ายในการย้อม IHC ของ CyclinD1 มีราคาไม่สูงทำให้เหมาะสมกับการที่จะใช้การติดสีย้อมทดแทนการตรวจการเพิ่มขึ้นของยีน *CCND1* ซึ่งมีราคาแพงต่างกันหลายเท่า

#### 6.4 ข้อเสนอแนะในการทำการศึกษต่อไปในอนาคต

อาจจะเพิ่มจำนวนของกลุ่มตัวอย่าง โดยอาจทำซ้ำเพื่อเพิ่มจำนวน รวมถึงการเก็บข้อมูลไปข้างหน้าแบบ prospective อาจจะย้อมการติดสีของเอนไซม์ CDK4 และ CDK6 ร่วมด้วย เพื่อดูว่ามีการติดสีที่แตกต่างกันเหมือนกับที่พบใน cyclinD1 หรือไม่ สำหรับการเพิ่ม validity ของการอ่านผลพยาธิวิทยาของพยาธิแพทย์ต้องมีการทำการทดสอบความแม่นยำในการอ่านด้วยแผ่นอ่านความเข้มข้นมาตรฐาน



## รายการอ้างอิง

1. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a003236.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013;63:11-30.
3. Mok TS. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:661-8.
4. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. Clin Cancer Res 2012;18:6169-77.
5. Petmitr S, Wongsommart D, Chaksangchaichot P, Pakeetoot T, Sutinont P, Sirivaidyapong P, et al. Mutational analysis of ras gene family in lung cancer in Thai. Oncol Repl 2003;10:1497-501.
6. Dearden S, Stevens J, Wu YL, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). Ann Oncol 2013;24:2371-6.
7. Renaud S, Falcoz PE, Schaeffer M, Guenot D, Romain B, Olland A, et al. Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. Br J Cancer 2015;113:1206-15.
8. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. J Natl Cancer Inst 2012;104:228-39.
9. Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. Lung Cancer 2010;69:272-8.
10. Ludovini V, Bianconi F, Pistola L, Chiari R, Minotti V, Colella R, et al. Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors

of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncoll* 2011;6:707-15.

11. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncoll* 2008;9:962-72.

12. Patnaik A, Rosen LS, Tolaney SM, Tolcher AW, Goldman JW, Gandhi L, et al. Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discov* 2016;6:740-53.

13. Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* 2007;55:1-14.

14. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10:59-64.

15. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010;463:899-905.

16. Dragoj M, Milosevic Z, Bankovic J, Dinic J, Pesic M, Tanic N, et al. Association of CCND1 overexpression with KRAS and PTEN alterations in specific subtypes of non-small cell lung carcinoma and its influence on patients' outcome. *Tumour Biol* 2015;36:8773-80.

17. Hackshaw A, Law M, Wald N. Lung Cancer and passive smoking. Increased risk is not disputed. *Bmj* 2000;321:1221-2; author reply 2-3.

18. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *Jama* 2005;294:1505-10.

19. Wong K, Seow A, Koh W, Shankar A, Lee H, Yu MC. Smoking cessation and lung cancer risk in an Asian population: Findings from the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer* 2010;103:1093-6.
20. Barone-Adesi F, Mirabelli D, Magnani C. [Risk of lung cancer in individuals with previous exposure to asbestos]. *Epidemiol Prevl* 2016;40:20-5.
21. Kreuzer M, Fenske N, Schnelzer M, Walsh L. Lung cancer risk at low radon exposure rates in German uranium miners. *Br J Cancer* 2015;113:1367-9.
22. Tirmarche M, Harrison J, Laurier D, Blanchardon E, Paquet F, Marsh J. Risk of lung cancer from radon exposure: contribution of recently published studies of uranium miners. *Ann ICRPI* 2012;41:368-77.
23. Wang XR, Chiu YL, Qiu H, Au JS, Yu IT. The roles of smoking and cooking emissions in lung cancer risk among Chinese women in Hong Kong. *Ann Oncoll* 2009;20:746-51.
24. Liu ZY, He XZ, Chapman RS. Smoking and other risk factors for lung cancer in Xuanwei, China. *Int J Epidemioll* 1991;20:26-31.
25. Tomczak A, Miller AB, Weichenthal SA, To T, Wall C, van Donkelaar A, et al. Long-term exposure to fine particulate matter air pollution and the risk of lung cancer among participants of the Canadian National Breast Screening Study. *Int J Cancerl* 2016;139:1958-66.
26. Raaschou-Nielsen O, Beelen R, Wang M, Hoek G, Andersen ZJ, Hoffmann B, et al. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ Intl* 2016;87:66-73.
27. Yang WS, Zhao H, Wang X, Deng Q, Fan WY, Wang L. An evidence-based assessment for the association between long-term exposure to outdoor air pollution and the risk of lung cancer. *Eur J Cancer Prevl* 2016;25:163-72.
28. Wood DE. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines for Lung Cancer Screening. *Thorac Surg Clinl* 2015;25:185-97.

29. Tantraworasin A, Saeteng S, Lertprasertsuke N, Arreyakajohn N, Kasemsarn C, Patumanond J. Prognostic factors of tumor recurrence in completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Resl* 2013;5:77-84.
30. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancerl* 2015;87:193-200.
31. Chute CG, Greenberg ER, Baron J, Korson R, Baker J, Yates J. Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancerl* 1985;56:2107-11.
32. Kara M, Dikmen E, Arikan OK, Altan Kara S. Recurrent laryngeal nerve paralysis resulting from a metastatic lymphadenopathy caused by a right-sided lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surgl* 2004;25:651.
33. Kamel EM, Goerres GW, Burger C, von Schulthess GK, Steinert HC. Recurrent laryngeal nerve palsy in patients with lung cancer: detection with PET-CT image fusion -- report of six cases. *Radiologyl* 2002;224:153-6.
34. Shida D, Asato Y, Amemiya R, Suzuki A, Yoshimi F. Right aortic arch with left lung cancer: focusing on left recurrent laryngeal nerve. *Ann Thorac Surgl* 2002;73:985-6.
35. Lee D, Moon SM, Kim D, Kim J, Chang H, Yang B, et al. Lung cancer with superior vena cava syndrome diagnosed by intravascular biopsy using EBUS-TBNA. *Respir Med Case Repl* 2016;19:177-80.
36. Lee HN, Tiwana MS, Saini M, Verma SK, Saini M, Jain N, et al. Superior vena cava obstruction (SVCO) in patients with advanced non small cell lung cancer (NSCLC). *Gulf J Oncologl* 2014;1:56-62.
37. Marulli G, Battistella L, Mammana M, Calabrese F, Rea F. Superior sulcus tumors (Pancoast tumors). *Ann Transl Medl* 2016;4.
38. Li X, Bie Z, Zhang Z, Li Y, Hu X, Liu W, et al. Clinical analysis of 64 patients with lung-cancer-associated hypercalcemia. *J Cancer Res Therl* 2015;11 Suppl:C275-9.

39. Tai P, Yu E, Jones K, Sadikov E, Mahmood S, Tonita J. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH) in patients with limited stage small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;53:211-5.
40. Titulaer MJ, Maddison P, Sont JK, Wirtz PW, Hilton-Jones D, Klooster R, et al. Clinical Dutch-English Lambert-Eaton Myasthenic syndrome (LEMS) tumor association prediction score accurately predicts small-cell lung cancer in the LEMS. *J Clin Oncol* 2011;29:902-8.
41. Qian X, Qin J. Hypertrophic pulmonary osteoarthropathy with primary lung cancer. *Oncol Lett* 2014;7:2079-82.
42. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015;10:1243-60.
43. Park SY, Kim BH, Kim JH, Lee S, Kang GH. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1561-7.
44. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:39-51.
45. Silvestri GA, Littenberg B, Colice GL. The clinical evaluation for detecting metastatic lung cancer. A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:225-30.
46. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *J Acad Nutr Diet* 2012;112:730-8.
47. Zeng Q, Liu M, Zhou N, Liu L, Song X. Serum human epididymis protein 4 (HE4) may be a better tumor marker in early lung cancer. *Clin Chim Acta* 2016;455:102-6.

48. Nagy B, Jr., Bhattoa HP, Steiber Z, Csoban M, Szilasi M, Mehes G, et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1639-48.
49. Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 2012;76:138-43.
50. Zissimopoulos A, Stellos K, Permenopoulou V, Petrakis G, Theodorakopoulos P, Baziotis N, et al. [The importance of the tumor marker CYFRA 21-1 in patients with lung cancer after surgery or chemotherapy]. *Hell J Nucl Med* 2007;10:62-6.
51. Oremek GM, Sapoutzis N. Pro-gastrin-releasing peptide (Pro-GRP), a tumor marker for small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003;23:895-8.
52. Tang JH, Zhang XL, Zhang ZH, Wang R, Zhang HM, Zhang ZL, et al. Diagnostic value of tumor marker pro-gastrin-releasing peptide in patients with small cell lung cancer: a systematic review. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:1563-8.
53. Wang HQ, Zhao L, Zhao J, Wang Q. Analysis on early detection of lung cancer by PET/CT scan. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:2215-7.
54. Schmidt-Hansen M, Baldwin DR, Hasler E, Zamora J, Abaira V, Roque IFM. PET-CT for assessing mediastinal lymph node involvement in patients with suspected resectable non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:Cd009519.
55. Bar-Shalom R, Kagna O, Israel O, Guralnik L. Noninvasive diagnosis of solitary pulmonary lesions in cancer patients based on 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose avidity on positron emission tomography/computed tomography. *Cancer* 2008;113:3213-21.
56. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:e211S-e50S.
57. Detterbeck FC, Lewis SZ, Diekemper R, Addrizzo-Harris D, Alberts WM. Executive Summary: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:7s-37s.



58. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, Rocco G, Sculier JP, Varela G, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J* 2009;34:17-41.
59. Brunelli A, Kim AW, Berger KI, Addrizzo-Harris DJ. Physiologic evaluation of the patient with lung cancer being considered for resectional surgery: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:e166S-e90S.
60. Hou B, Deng XF, Zhou D, Liu QX, Dai JG. Segmentectomy versus wedge resection for the treatment of high-risk operable patients with stage I non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis* 2016;10:435-43.
61. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15:504-35.
62. Reichert M, Steiner D, Kerber S, Bender J, Posentrup B, Hecker A, et al. A standardized technique of systematic mediastinal lymph node dissection by video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) leads to a high rate of nodal upstaging in early-stage non-small cell lung cancer. *Surg Endosc* 2016;30:1119-25.
63. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:234s-42s.
64. Keller SM, Adak S, Wagner H, Johnson DH. Mediastinal lymph node dissection improves survival in patients with stages II and IIIa non-small cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *Ann Thorac Surg* 2000;70:358-65; discussion 65-6.
65. Lymph Node Assessment and Impact on Survival in Video-Assisted Thoracoscopic Lobectomy or Segmentectomy. *The Annals of Thoracic Surgery* 2015;100:910 - 6.
66. Gajra A, Newman N, Gamble GP, Kohman LJ, Graziano SL. Effect of number of lymph nodes sampled on outcome in patients with stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1029-34.

67. Pertile P, Poli A, Dominioni L, Rotolo N, Nardecchia E, Castiglioni M, et al. Is chest X-ray screening for lung cancer in smokers cost-effective? Evidence from a population-based study in Italy. *Cost Eff Resour Alloc* 2015;13:15.
68. Yang M, Cao H, Guo X, Zhang T, Hu P, Du J, et al. The number of resected lymph nodes (nLNs) combined with tumor size as a prognostic factor in patients with pathologic N0 and Nx non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8:e73220.
69. Chen H, Louie AV. SABR vs. Limited Resection for Non-small Cell Lung Cancer: Are We Closer to an Answer? *Curr Treat Options Oncol* 2016;17:27.
70. Shi A, Zhu G. [Current Status of Stereotactic Ablative Radiotherapy (SABR) for Early-stage Non-small Cell Lung Cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2016;19:389-93.
71. Chen T, Luo J, Wang R, Gu H, Gu Y, Huang Q, et al. Visceral pleural invasion predict a poor survival among lung adenocarcinoma patients with tumor size  $\leq$  3cm. *Oncotarget* 2017;8:66576-83.
72. Reck M, van Zandwijk N, Gridelli C, Baliko Z, Rischin D, Allan S, et al. Erlotinib in advanced non-small cell lung cancer: efficacy and safety findings of the global phase IV Tarceva Lung Cancer Survival Treatment study. *J Thorac Oncol* 2010;5:1616-22.
73. Park K, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17:577-89.
74. Matsuo N, Azuma K, Sakai K, Hattori S, Kawahara A, Ishii H, et al. Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients. *Sci Repl* 2016;6.
75. Giroux Leprieur E, Wislez M. [Crizotinib: At last in first-line treatment of advanced-stage ALK-rearranged non-small cell lung cancer]. *Bull Cancer* 2016;103:125-6.
76. Schwartz LH. RECIST 1.1 – Update and Clarification: From the RECIST Committee. 2016;62:132-7.

77. Harvey JJ. AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE. *Nature* 1964;204:1104-5.
78. Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:311-35.
79. Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982;296:404-9.
80. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Robbins KC, Barbacid M. Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:2845-9.
81. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981;290:261-4.
82. Downward J. Signal transduction. New exchange, new target. *Nature* 1998;396:416-7.
83. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 2000;10:147-54.
84. Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1998;273:19925-8.
85. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:201-5.
86. Keller JW, Franklin JL, Graves-Deal R, Friedman DB, Whitwell CW, Coffey RJ. Oncogenic KRAS provides a uniquely powerful and variable oncogenic contribution among RAS family members in the colonic epithelium. *J Cell Physiol* 2007;210:740-9.
87. Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756:115-25.
88. Hassan AB, Paraskeva C. Colorectal cancer prognosis: is it all mutation, mutation, mutation? *Gut* 2005;54:1209-11.

89. James RM, Arends MJ, Plowman SJ, Brooks DG, Miles CG, West JD, et al. K-ras proto-oncogene exhibits tumor suppressor activity as its absence promotes tumorigenesis in murine teratomas. *Mol Cancer Resl* 2003;1:820-5.
90. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevl* 2000;9:1193-7.
91. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Resl* 2003;63:728-34.
92. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncoll* 2007;25:5240-7.
93. Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2112-6.
94. Appels NM, Beijnen JH, Schellens JH. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologistl* 2005;10:565-78.
95. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Naturel* 2013;503:548-51.
96. Sun Q, Burke JP, Phan J, Burns MC, Olejniczak ET, Waterson AG, et al. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51:6140-3.
97. Chen HH, Wang YC, Fann MJ. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Bioll* 2006;26:2736-45.
98. Sedlacek HH. Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematoll* 2001;38:139-70.

99. Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell* 1998;9:2545-60.
100. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:9408-21.
101. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Sciencel* 1996;274:1672-7.
102. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancerl* 2011;11:558-72.
103. Bienvenu F, Jirawatnotai S, Elias JE, Meyer CA, Mizeracka K, Marson A, et al. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Naturel* 2010;463:374-8.
104. McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J, Ewen ME. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5382-7.
105. Reutens AT, Fu M, Wang C, Albanese C, McPhaul MJ, Sun Z, et al. Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinoll* 2001;15:797-811.
106. Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, et al. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Cheml* 2005;280:16934-41.
107. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Genel* 2002;299:35-55.
108. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinologyl* 2004;145:5439-47.
109. Li Z, Wang C, Jiao X, Lu Y, Fu M, Quong AA, et al. Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol Cell Bioll* 2006;26:4240-56.

110. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, et al. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 1997;17:5338-47.
111. Zwijnen RM, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997;88:405-15.
112. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
113. Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, Elias JE, Becks L, Bienvenu F, et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* 2011;474:230-4.
114. Li Z, Jiao X, Wang C, Shirley LA, Elsaleh H, Dahl O, et al. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res* 2010;70:8802-11.
115. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 2009;220:292-6.
116. Comstock CE, Revelo MP, Buncher CR, Knudsen KE. Impact of differential cyclin D1 expression and localisation in prostate cancer. *Br J Cancer* 2007;96:970-9.
117. Dhar KK, Branigan K, Parkes J, Howells RE, Hand P, Musgrove C, et al. Expression and subcellular localization of cyclin D1 protein in epithelial ovarian tumour cells. *Br J Cancer* 1999;81:1174-81.
118. Reissmann PT, Koga H, Figlin RA, Holmes EC, Slamon DJ. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:61-70.
119. Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T, et al. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996;73:294-300.

120. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 1997;17:3850-7.
121. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 2002;22:4309-18.
122. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25:315-9.
123. Puyol M, Martin A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, et al. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2010;18:63-73.
124. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, Del Prado M, Lallena MJ, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs* 2014;32:825-37.
125. Tate SC, Cai S, Ajamie RT, Burke T, Beckmann RP, Chan EM, et al. Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the antitumor activity of LY2835219, a new cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in mice bearing human tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2014;20:3763-74.
126. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol* 2014;9:154-62.
127. Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 2006;8:30-8.
128. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Janne PA, Pignon JP, Graziano S, et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and

KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;31:2173-81.

129. Johnson ML, Sima CS, Chaft J, Paik PK, Pao W, Kris MG, et al. Association of KRAS and EGFR Mutations with Survival in Patients with Advanced Lung Adenocarcinomas. *Cancer* 2013;119:356-62.

130. Guo Y, Yang K, Harwalkar J, Nye JM, Mason DR, Garrett MD, et al. Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene* 2005;24:2599-612.

131. Mustachio LM, Lu Y, Tafe LJ, Memoli V, Rodriguez-Canales J, Mino B, et al. Deubiquitinase USP18 Loss Mislocalizes and Destabilizes KRAS in Lung Cancer. *Mol Cancer Res* 2017;15:905-14.





## ภาคผนวก (Appendix)

แบบบันทึกข้อมูลผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

SN (sample number) \_\_\_\_\_

Age at diagnosis \_\_\_\_\_ DOB \_\_\_\_\_

Sex Female <sup>0</sup> Male <sup>1</sup>

Comorbidity \_\_\_\_\_

BW loss  $\leq 5\%$  <sup>0</sup>  $> 5\%$  <sup>1</sup>

Smoking Never <sup>0</sup> Former <sup>1</sup> Current <sup>2</sup> Pack – Year \_\_\_\_\_

Pathology Pathological No \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_ Site \_\_\_\_\_

Adenocarcinoma <sup>1</sup> Subtype Lepidic <sup>2</sup> Acinar <sup>3</sup> Papillary <sup>4</sup> Solid <sup>5</sup>

Micropapillary <sup>6</sup> Squamous cell CA <sup>7</sup>

NSCLC-favor adeno <sup>8</sup> NSCLC-favor squamous <sup>9</sup>

NSCLC-NOS <sup>10</sup> Large cell <sup>11</sup> Other \_\_\_\_\_ <sup>12</sup>

Initial staging Early <sup>2</sup> Locally advance <sup>2</sup> Metastasis <sup>3</sup>

T size \_\_\_\_\_ cm T1 <sup>1</sup> T2a <sup>2</sup> T2b <sup>3</sup> T3 <sup>4</sup> T4 <sup>5</sup> Tx <sup>6</sup>

N N0 <sup>0</sup> N1 <sup>1</sup> N2 <sup>2</sup> N3 <sup>3</sup> Nx <sup>4</sup>

M M0 <sup>0</sup> M1a <sup>1</sup> M1b <sup>2</sup> M1c <sup>3</sup> Mx <sup>4</sup> \_\_\_\_\_

Site of metastasis : Lung <sup>1</sup> Pleura <sup>2</sup> Liver <sup>3</sup> Adrenal <sup>4</sup>

Brain <sup>5</sup> LN <sup>6</sup> Other <sup>7</sup> \_\_\_\_\_

Treatment (for early or locally advanced disease) Date start Rx \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Surgery No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>

if yes : Lobectomy <sup>1</sup> Pneumonectomy <sup>2</sup> Wedge resection <sup>3</sup>

Location \_\_\_\_\_ positive margin No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>

Visceral pleural involved No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>

Radiation No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>  
 if yes : CCRT <sup>1</sup> Sequential CRT <sup>2</sup> Postop RT <sup>3</sup> SBRT <sup>4</sup>  
 Dose \_\_\_\_\_ Gy \_\_\_\_\_ Fraction Last \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Chemotherapy No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>  
 if yes : Neo/Adjuvant <sup>1</sup> Chemo-RT <sup>2</sup>  
 Regimen \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ cycles Last \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Recurrence No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>  
 if yes : date \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

site : Lung <sup>1</sup> Pleura <sup>2</sup> Liver <sup>3</sup> Adrenal <sup>4</sup>  
 Brain <sup>5</sup> LN <sup>6</sup> Other <sup>7</sup> \_\_\_\_\_

Treatment for recurrence or metastasis None <sup>0</sup>

Treatment	Cycles	Date begin	Date end	Response (PR, SD, PD)	PD site, date

Genomic alteration: Not test <sup>0</sup> Test <sup>1</sup>

-EGFR mutation No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup> if yes EGFR Del 19 <sup>1</sup> EGFR L858R <sup>2</sup> Other <sup>3</sup> \_\_\_\_\_

-ALK fusion No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup> if yes by IHC (d5F3) <sup>1</sup> FISH <sup>2</sup>

-KRAS mutation No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>

if yes Amino acid G12C <sup>1</sup> G12V <sup>2</sup> G12D <sup>3</sup> G12A <sup>4</sup> Other \_\_\_\_\_ <sup>5</sup>

-CCND1 amplification No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup>

-CyclinD1 expression No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup> if yes : level \_\_\_\_\_ (%)

-CDK4 expression No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup> if yes : level \_\_\_\_\_ (%)

-CDK6 expression No <sup>0</sup> Yes <sup>1</sup> if yes : level \_\_\_\_\_ (%)

### Death

No <sup>0</sup> Last follow up date \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Yes <sup>1</sup> date \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายภาสกร วันชัยจิระบุญ

วันเดือนปีเกิด วันที่ 25 พฤษภาคม พุทธศักราช 2526 ที่จังหวัดชลบุรี

การศึกษา

พ.ศ. 2545 - 2551 แพทยศาสตรบัณฑิตจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2555 - 2558 แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2559 - 2561 แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขามะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ  
 นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์ (มะเร็งวิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY