

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราทีนมะเร็งชนิดแอมพูลารีเชียในผู้ป่วยไทย

นางสาวปิยะดา สิริทธิเดชไพบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

PREVALENCE OF K-RAS GENE MUTATION IN AMPULLARY CANCER IN THAI
PATIENTS

MISS PIYADA SITTHIDEATPHAIBOON

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิด
แอมพูลารีในผู้ป่วยไทย

โดย นา

นางสาว ปิยะดา สิทธิเดชไพบูลย์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์

นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุเทพ กลชาญวิทย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ แพทย์หญิง อภิญญาเพ็ญ สาระยา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธิติยา เดชเทวพร)

ปิยะดา สิทธิเดชไพบูลย์ : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลลารีในผู้ป่วยไทย

(Prevalence of K-RAS Gene Mutation in Ampullary Cancer in Thai Patients)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 97 หน้า.

ที่มา มะเร็งชนิดแอมพูลลารี เป็นมะเร็งที่มีพยากรณ์โรคดีกว่ามะเร็งอื่นๆในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลลารี อาจมีความแตกต่างในระดับการกลายพันธุ์ของยีน หนึ่งในนั้นคือการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ข้อมูลเกี่ยวกับความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่มีรายงานมีจำกัด และเป็นข้อมูลในประเทศตะวันตก ยังไม่มีการศึกษาในไทยหรือเอเชีย ซึ่งอาจมีความชุกที่แตกต่างจากในประเทศแถบตะวันตก

วัตถุประสงค์ ศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสของมะเร็งชนิดแอมพูลลารีในผู้ป่วยไทย

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งชนิดแอมพูลลารี ที่ได้รับการวินิจฉัยและมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ.2549 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ.2555 ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีชิ้นเนื้อส่งตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีไฟโรซีควอนติง

ผลการศึกษา พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลลารี จำนวน 29 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 63 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 46 โดยพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 มากที่สุด จำนวน 28 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 96.6 กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราสมีแนวโน้มที่จะพบในผู้ป่วยที่มีสภาพร่างกายที่ไม่แข็งแรง, ระยะที่ 3-4 ของโรค, ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่ไม่ดี, มีการกระจายของโรคไปยังต่อมน้ำเหลือง และการผ่าตัดมะเร็งออกได้ไม่หมด มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ค่ามัธยฐานการรอดชีวิตของประชากรทั้งหมดในการศึกษา อยู่ที่ 38.34 เดือน (95% confidence interval 21.28 – 55.41 เดือน) และอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ร้อยละ 24.8 โดยกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส มีแนวโน้มที่มีการรอดชีวิตสั้นกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (ค่ามัธยฐานการรอดชีวิต 29.93 และ 44.32 เดือน, ตามลำดับ) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.35$)

สรุปผลการวิจัย ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลลารีในการศึกษานี้ อยู่ที่ร้อยละ 46 ซึ่งสูงปานกลาง มีแนวโน้มว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราส จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกและพยาธิวิทยาที่ไม่ดี แต่การศึกษานี้ ยังไม่สามารถบอกการพยากรณ์โรคของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลลารีได้ ควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น

ภาควิชาอายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชาอายุรศาสตร์..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา2555.....

5474138030: MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: PERIAMPULLARY TUMORS/AMPULLARY CANCER/KRAS MUTATION

PIYADA SITTHIDEATPHAIBOON: PREVALENCE OF K-RAS GENE MUTATION IN

AMPULLARY CANCER IN THAI PATIENTS. ADVISOR: ASST. PROF. VIROTE

SRIURANPONG, M.D., 97 pp.

Background and Objective: Ampullary cancer has been regards to have a better prognosis than the other periampullary tumors. Certain data suggests that the difference may stem from certain distinct biology such as *K-ras* mutation. Prior reports show a large variation of the prevalence of *K-ras* mutation from 0 to 75% in ampullary carcinomas. We sought to characterize the prevalence of *K-ras* mutations in ampullary carcinoma in Thai patients.

Methods: We reviewed hospital medical records of ampullary carcinoma patients who were treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital (KCMH) from 1 Jan 2006 to 31 Dec 2012. There were 63 patients with histologically confirmed ampullary adenocarcinoma. Formalin-fixed paraffin embedded tissues were analyzed for *K-ras* mutation at codon 12 and 13 using the PCR amplification and pyrosequencing method method (Pyromark Q96 ID; Qiagen). The clinical characteristics and treatment outcomes were analyzed in correlation with pathological data and *K-ras* mutation status (with Chi-square or Fisher exact test).

Results: There were 29 (46%) of 63 tumor tissues harbored *K-ras* mutation. Most mutations occurred at codon 12 in 28 of 29 (96.6%) patients and codon 13 in 1 (3.4%) patient. *K-ras* gene mutations tended to have poorer performance status, more TNM stage III-IV, poorly or undifferentiated histologic grade, positive surgical margin and metastases to regional lymph nodes than *K-ras* wild types, but these differences were not statistically significant. The overall survival (OS) of the whole population was 38.34 months (95% confidence interval of 21.28 – 55.41 months) and the 5-year overall survival rate was 24.8%. There was a trend of a non-statistically significant improvement in overall survival in patients whose tumor tissues displayed wild type *K-ras* over mutant *K-ras* with median OS 44.32 and 29.93 months, respectively ($p = 0.35$).

Conclusion: We found moderately high prevalence of *K-ras* mutation in Thai ampullary carcinoma patients at 46%. Further evaluation of *K-ras* mutation in a larger population of ampullary carcinoma is warranted.

DepartmentMedicine.....Student's signature

Field of studyMedicine.....Advisor's signature.....

Academic year ...2012.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. อาจารย์นายแพทย์ สืบพงศ์ ธารสารวิมล ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
2. อาจารย์แพทย์หญิง นภา ปริญญานิติกุล ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
3. อาจารย์แพทย์หญิง ชนิตา วินะยานุวัติคุณ ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
4. คุณชวลิต แซ่ล้อ พนักงานวิจัย ช่วยประสานงานและติดตามผู้ป่วย

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชนพ ช่างโชติ ผู้ช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นเนื้อพยาธิวิทยา
6. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนฤมล คล้ายแก้ว ผู้ช่วยเหลือในด้านการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นเนื้อพยาธิวิทยา
7. คุณอุบล พุ่มสุข นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 ผู้ช่วยเหลือในด้านการจัดเตรียมชิ้นเนื้อพยาธิวิทยา
8. ดร. ชินโชติ ธีรภักดิ์ภิญโญ หัวหน้าฝ่ายวิจัยและพัฒนา ศูนย์จุฬาลงกรณ์ ผู้ให้คำปรึกษาทางด้านการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์จุฬาลงกรณ์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน

รวมทั้งบิดา, มารดา, และครอบครัว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญแผนภูมิ	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 คำถามการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	3
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น	4
1.7 คำสำคัญ	4
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย	4
1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย	5
1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	7
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9

บทที่ 3 มะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่	14
3.1 บทนำ	14
3.2 ระบาดวิทยา.....	14
3.3 ลักษณะทางอณูชีววิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่.....	16
3.4 ลักษณะอาการทางคลินิก.....	18
3.5 การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค.....	18
3.6 ระยะโรค	22
3.7 การรักษา	24
บทที่ 4 การกลายพันธุ์ของยีนเคราส	28
4.1 การค้นพบยีนราส	28
4.2 กระบวนการส่งสัญญาณของยีนราส	29
4.3 การกลายพันธุ์ของยีนเคราส	32
บทที่ 5 การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส	35
5.1 ขั้นตอนการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส	35
5.2 วิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส	36
5.3 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแบบวิธีของไอจีโน	40
บทที่ 6 วิธีดำเนินการวิจัย	45
6.1 รูปแบบของการวิจัย.....	45
6.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....	45
6.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล	47
6.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	49
6.5 ปัญหาทางจริยธรรม	50
6.6 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข	50
6.7 การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน	51
6.8 งบประมาณ.....	51
บทที่ 7 ผลการศึกษา.....	52
	หน้า
บทที่ 8 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	69

8.1 สรุปผลการวิจัย	69
8.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	69
8.3 ข้อเสนอแนะ.....	74
รายการอ้างอิง	75
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	92
ภาคผนวก ค.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	97

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	10
ตารางที่ 2	11
ตารางที่ 3	11
ตารางที่ 4	13
ตารางที่ 5	23
ตารางที่ 6	24
ตารางที่ 7	54
ตารางที่ 8	55
ตารางที่ 9	56
ตารางที่ 10	58
ตารางที่ 11	59
ตารางที่ 12	60
ตารางที่ 13	63
ตารางที่ 14	66
ตารางที่ 15	68
ตารางที่ 16	70

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1	แสดงการทำงานของยีนเคราสที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ... 5
แผนภูมิที่ 2	แสดงผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 135 ราย 53
แผนภูมิที่ 3	แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13..... 57
แผนภูมิที่ 4	แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรีย 63 ราย 61
แผนภูมิที่ 5	แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรีย ที่มีและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 62
แผนภูมิที่ 6	แสดง Kaplan-Meier survival curve ตามปัจจัยทางด้านพยาธิวิทยา แบบการวิเคราะห์ตัวแปรเดียว (Univariate analysis)..... 65
แผนภูมิที่ 7	แสดง Kaplan-Meier progression free survival curve ของผู้ป่วยมะเร็ง ชนิดแอมพลูลาเรียที่มีและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 67
แผนภูมิที่ 8	แสดงการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา 71
แผนภูมิที่ 9	แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพลูลาเรีย, มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งตับอ่อน..... 72

สารบัญรูป

รูปที่ 1	แสดงลักษณะทางกายวิภาคของ ampulla of Vater.....	7
รูปที่ 2	แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์.....	7
รูปที่ 3	แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ จากการศึกษาของ Howe และคณะ ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราสและ ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส	12
รูปที่ 4	แสดงอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ในช่วงปี ค.ศ.1973 ถึง 2005	15
รูปที่ 5	แสดงอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ตามเพศในช่วงปี ค.ศ.1973 ถึง 2005	15
รูปที่ 6	แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ชนิดต่างๆ.....	16
รูปที่ 7	แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีในมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์	17
รูปที่ 8	แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีหลังการผ่าตัดในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ และมะเร็งตับอ่อน	18
รูปที่ 9	แสดงมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์จากการตรวจด้วย ERCP	20
รูปที่ 10	แสดงประวัติศาสตร์ของการค้นพบยีนราส.....	29
รูปที่ 11	แสดงกระบวนการส่งสัญญาณกระตุ้นยีนราส.....	30
รูปที่ 12	แสดงการส่งสัญญาณของยีนราสไปยังเส้นทางต่างๆ	32
รูปที่ 13	แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ การกระตุ้นการทำงานของยีนเคราสในภาวะปกติ และผิดปกติ จนนำไปสู่ การเกิดมะเร็ง.....	33
รูปที่ 14	แสดงขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส	35
รูปที่ 15	แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบไพโรซีควอนซิ่ง	38
รูปที่ 16	แสดงการเติมนิวคลีโอไทด์เบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบหรือ primer โดยอาศัย DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	38
รูปที่ 17	แสดงปฏิกิริยาการเกิดแสงที่ได้จากปฏิกิริยา luciferase	39

รูปที่ 18	แสดงปฏิกิริยาการทำลายนิวคลีโอไทด์และ ATP โดยเอ็นไซม์ apyrase.....	39
รูปที่ 19	แสดง pyrogram trace โดยความสูงของกราฟ ขึ้นกับปริมาณเบสคู่สม ชนิดเดียวกันที่เกิดปฏิกิริยา	40
รูปที่ 20	แสดงการสร้างดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการตรวจไฟโรซีควอนซิ่ง	41
รูปที่ 21	แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF1	42
รูปที่ 22	แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF2	42
รูปที่ 23	แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF3	42
รูปที่ 24	แสดงการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง	43
รูปที่ 25	แสดงการศึกษาในชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน ในมะเร็งลำไส้ใหญ่	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CT	Computerized tomography
ECOG	Eastern Collaborative Oncology Group
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERCP	Endoscopic Retrograde cholangiopancreatography
EUS	Endoscopic Ultrasonography
FAP	Familial adenomatous polyposis
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
MRCP	Magnetic Resonance Cholangiopancreatography
OS	Overall survival
PFS	Progression free survival
PCR	Polymerase chain reaction
PTC	Percutaneous transhepatic cholangiography
TNM	Tumor-Node-Metastasis
US	Ultrasonography

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย (Background and Rationale)

มะเร็งชนิดแอมพูลารีเรีย เป็นมะเร็งที่มีต้นกำเนิดมาจาก papilla of Vater ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างรอยต่อของท่อน้ำดีส่วนปลาย (distal common bile duct) และท่อของตับอ่อน (pancreatic duct) มาเปิดร่วมกันตรงลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ถูกล้อมรอบด้วย sphincter of Oddi, เป็นส่วนหนึ่งของมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีเรีย อันประกอบไปด้วยมะเร็งของตับอ่อนส่วนหัว (pancreatic head carcinoma), มะเร็งของท่อน้ำดีส่วนปลาย (distal common bile duct carcinoma), มะเร็งของลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenal cancer) และมะเร็งชนิดแอมพูลารีเรีย พบประมาณร้อยละ 6 ถึง 20 ของมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีเรีย ทั้งหมด⁽¹⁻³⁾ และถือว่าเป็นมะเร็งชนิดที่มีพยากรณ์โรคที่ต่ำกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีเรีย ด้วยกัน⁽⁴⁻⁶⁾ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสามารถวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ตั้งแต่ระยะแรกของโรค จากการที่มีอาการและอาการแสดงของการอุดตันของท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นเร็ว⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอาจมีความแตกต่างในระดับการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้มะเร็งชนิดแอมพูลารีเรีย มีพยากรณ์โรคที่แตกต่างจากมะเร็งตับอ่อน^(8,9) ซึ่งหนึ่งในการกลายพันธุ์ของยีนที่พบในมะเร็งชนิดนี้ก็คือ การกลายพันธุ์ของยีน*crebra*

การกลายพันธุ์ของยีน*crebra* พบได้บ่อยทั้งในมะเร็งของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ประมาณร้อยละ 40 และมะเร็งตับอ่อน ซึ่งพบสูงถึงร้อยละ 60⁽¹⁰⁾ แต่การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน*crebra* ในมะเร็งชนิดแอมพูลารีเรีย ยังมีจำกัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นโรคที่พบน้อย โดยมีรายงานถึงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน*crebra* ที่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 75^(7, 11-15)

จากการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน*crebra* ในมะเร็งตับอ่อนในผู้ป่วยไทยของ นพ. วิทวัส จิตต์ผิงงาม จำนวน 25 ราย ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน*crebra* 10 รายหรือร้อยละ

40 แต่พบมีมะเร็งชนิด แอมพลูเรีย จำนวน 9 ราย ซึ่งสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน
 เคราส 2 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 22.2 แต่เนื่องจากเป็นเพียงการตรวจพบโดยบังเอิญ และจำนวน
 ผู้ป่วยในการศึกษาที่น้อยเกินไป ที่จะสรุปถึงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่พบได้ จึง
 เป็นที่มาของการศึกษานี้ เพื่อที่จะศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิด
 แอมพลูเรีย ในผู้ป่วยไทย อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาลักษณะนี้มากนักในประชากรเอเชีย ซึ่งอาจมี
 ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแตกต่างจากประชากรในประเทศแถบตะวันตก

1.2 คำถามการวิจัย (Research question)

คำถามการวิจัยหลัก (Primary Research Question)

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ในผู้ป่วยไทยแตกต่างจาก
 การศึกษาก่อนหน้านี้หรือไม่

คำถามการวิจัยรอง (Secondary Research Question)

การกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย มีผลต่อการพยากรณ์ของโรคหรือไม่
 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 12 เป็นอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

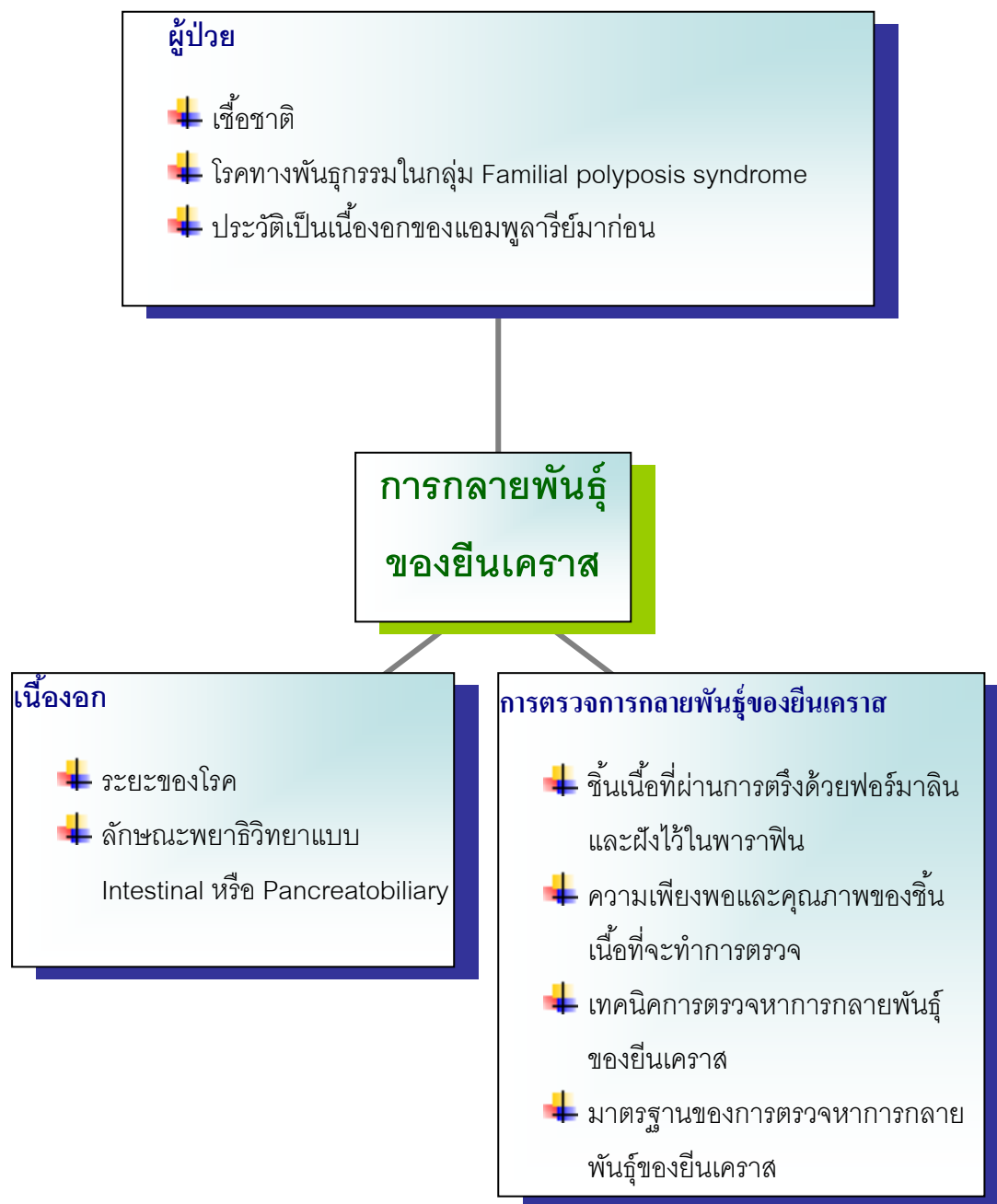
เพื่อศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสของมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ในผู้ป่วยไทย

1.4 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

H0 : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ในผู้ป่วยไทย
 ไม่มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้

Ha : ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ในผู้ป่วยไทย
 มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption) ไม่มี

1.7 คำสำคัญ (Key words)

Periampullary tumors

Ampullary cancer

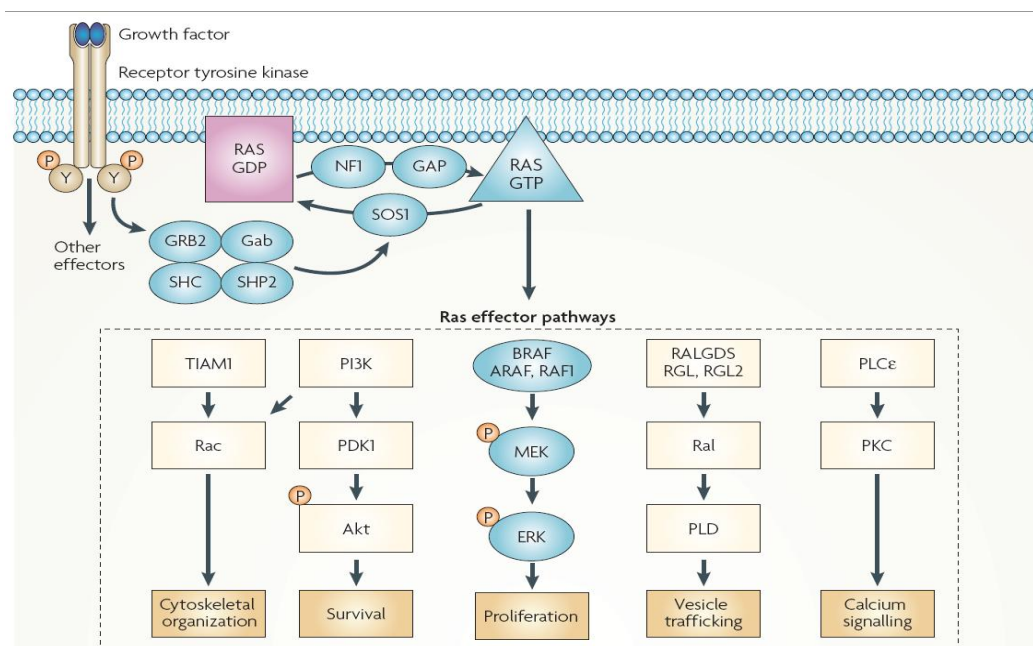
K ras mutation

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

Periampullary tumors เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ ของ ampulla of Vater ซึ่งประกอบไปด้วยมะเร็งที่กำเนิดมาจากตับอ่อน, ท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลาย, ลำไส้เล็กส่วนต้นรวมทั้งมะเร็งของ ampulla of Vater เอง

Ampullary cancer เป็นหนึ่งในมะเร็งในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ โดยที่มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ เป็นมะเร็งที่มีต้นกำเนิดมาจาก papilla of Vater ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างรอยต่อของท่อน้ำดีส่วนปลาย (distal common bile duct) และท่อของตับอ่อน (pancreatic duct) มาเปิดรวมกันตรงลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ถูกล้อมรอบด้วย sphincter of Oddi

K ras mutation การกลายพันธุ์ของยีนแควาส ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 เป็นยีนที่ก่อให้เกิดมะเร็งในกลุ่มของราสยีน ซึ่งมีอยู่ 3 รูปแบบ ได้แก่ H-ras, K-ras, และ N-ras โดย K-ras ได้มาจากการศึกษาพบยีนชนิดนี้ครั้งแรกจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาจาก Kirsten rat sarcoma virus ส่วนใหญ่ของการกลายพันธุ์ของยีนแควาส เกิดขึ้นที่ตำแหน่งโคดอน 12 นำมาซึ่งกระบวนการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์ และเกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ดังแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 แสดงการทำงานของยีนแคราสที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์

โปรตีนแคราส ถูกกระตุ้นการทำงานเมื่อจับกับกวานโนซีนที่มีฟอสเฟต 3 ตัว (guanosine triphosphate, GTP) เกิดการกระตุ้นการทำงานของยีนอื่นๆเป็นลำดับต่อมา โดยเฉพาะการกระตุ้นผ่านเส้นทางของ RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase) นำไปสู่การเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์ เกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

1.9.1. เป็นการศึกษาย้อนหลังอาจทำให้เก็บข้อมูลได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากข้อมูลส่วนนี้อาจไม่ได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลไว้ตั้งแต่แรก หรือข้อมูลบางส่วนอาจสูญหาย

1.9.2. เทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ยังอยู่ในขั้นตอนของกระบวนการวิจัย ซึ่งยังไม่มีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ชัดเจน

1.9.3 อุบัติการณ์ของโรคที่ค่อนข้างน้อย จึงทำให้อาจได้จำนวนตัวอย่างที่น้อย

1.10 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัย (Expected Benefits and Application)

1.10.1. ทำให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสของมะเร็งชนิดแอมพลูเรียในผู้ป่วยไทย

1.10.2. เป็นข้อมูลสำหรับใช้วางแผนในการศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study) ต่อไปในอนาคต

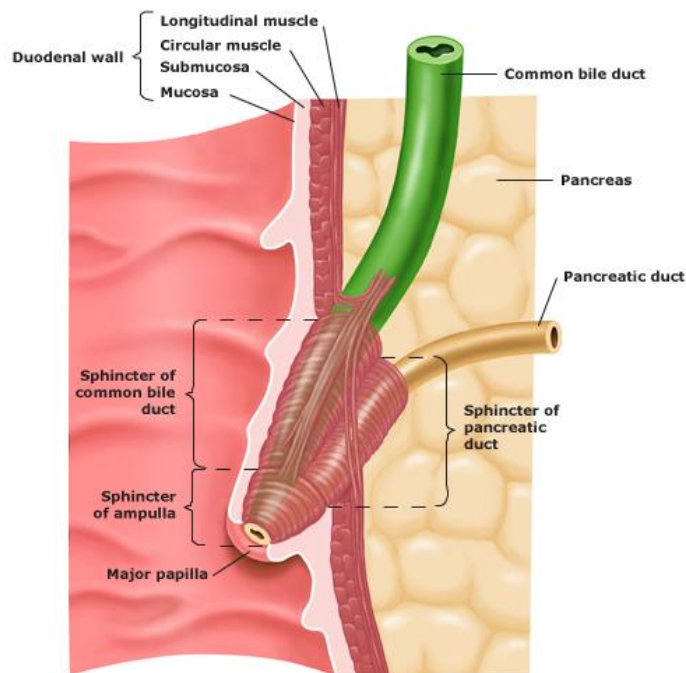
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

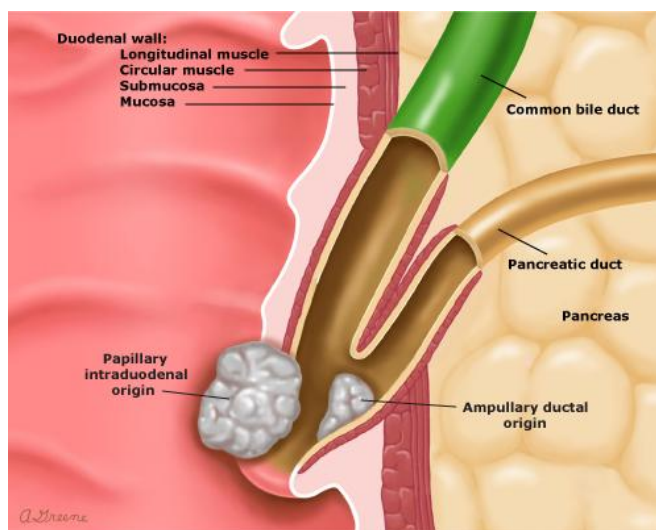
มะเร็งในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ ของ ampulla of Vater ซึ่งประกอบไปด้วยมะเร็งที่กำเนิดมาจากตับอ่อน, ท่อน้ำดีส่วนปลาย, ลำไส้เล็กส่วนต้นรวมทั้งมะเร็งของ ampulla of Vater เอง

Ampulla of Vater เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยชั้นกล้ามเนื้อของ sphincter of Oddi ล้อมรอบทางออกของท่อน้ำดีส่วนปลายและท่อของตับอ่อนที่จะมาเปิดออกบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และมีส่วนของ papilla of Vater อยู่ที่ส่วนปลายของบริเวณดังกล่าว ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของ ampulla of Vater

มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ ก็คือมะเร็งชนิดที่กำเนิดมาจากส่วนของ ampulla of Vater ซึ่งอยู่ที่ส่วนปลายของรอยต่อระหว่างท่อน้ำดีส่วนปลายและท่อของตับอ่อน นั่นเอง ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์

ดังนั้นมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ อาจกำเนิดมาจากชั้นเยื่อเมือกของท่อทางเดินน้ำดี, ตับอ่อน หรือลำไส้เล็กส่วนต้น จึงให้ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือชนิด intestinal และชนิด pancreatobiliary⁽¹⁶⁾

แม้ว่ามะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ จะพบค่อนข้างน้อย เพียง 4-6 รายต่อประชากร 1 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 6 ถึง 20 ของมะเร็งชนิดที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ ทั้งหมด⁽¹⁻³⁾ แต่ถือว่าเป็นมะเร็งชนิดที่มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ ด้วยกัน โดยพบมีอัตราการผ่าตัดได้สูงมากกว่าร้อยละ 90 และอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีประมาณร้อยละ 30 ถึง 50 เมื่อเทียบกับมะเร็งตับอ่อนที่มีอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีน้อยกว่าร้อยละ 10⁽⁴⁻⁶⁾ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสามารถวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ตั้งแต่ระยะแรกของโรค จากการศึกษาอาการและอาการแสดงของการอุดตันของทางเดินน้ำดีที่เกิดขึ้นเร็ว⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าอาจมีความแตกต่างในระดับการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ มีพยากรณ์โรคที่แตกต่างจากมะเร็งตับอ่อน^(8,9)

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ มีความคล้ายคลึงกับมะเร็งของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มากกว่ามะเร็งตับอ่อน⁽¹⁸⁾ รวมทั้งมีการตรวจพบลักษณะที่เป็น adenomatous polyps นำมาก่อนในกระบวนการพัฒนาการเกิดของมะเร็งชนิดนี้ที่เรียกว่า adenoma-carcinoma

sequence อีกด้วย นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรค familial adenomatous polyposis (FAP) ยังพบอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นของทั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรีย ช่วยสนับสนุนว่ากระบวนการเกิดมะเร็งของทั้งสองชนิดนี้อาจมีความคล้ายคลึงกัน⁽¹⁹⁾ หนึ่งในการกลายพันธุ์ของยีนที่พบในมะเร็งชนิดนี้ก็คือ การกลายพันธุ์ของยีนเคราส

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ราส (Ras) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดยชื่อ ras ได้มาจากชื่อย่อของ rat sarcoma ซึ่งเป็นโปรตีนตัวแรกในกลุ่มที่ถูกค้นพบ ชื่อราส ยังนำมาใช้หมายถึงยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเหล่านี้อีกด้วย ยีนราสในมนุษย์มีอยู่ 3 ชนิดคือ Harvey (H-), Neuroblastoma (N-) และ Kirsten (K-) โดย H-ras และ K-ras เป็นยีน 2 ตัวแรกที่ถูกค้นพบจากการศึกษาในไวรัสที่สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในหนู (rat sarcoma virus)⁽¹⁰⁾ ได้แก่ Harvey และ Kirsten sarcoma virus ถูกค้นพบโดย Jennifer Harvey⁽²⁰⁾ และ Warner Kirsten⁽²¹⁾ ตามลำดับ และยีนราสตัวสุดท้ายถูกค้นพบในเวลาต่อมา ตั้งชื่อมาจากเซลล์ neuroblastoma ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบมียีนชนิดนี้เป็นครั้งแรก⁽²²⁾ การกลายพันธุ์ที่ยีนราสพบบ่อยที่โคดอน (codon) 12, 13 และ 61 นำไปสู่การควบคุมการแบ่งตัว, การเจริญเติบโต, และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ที่ผิดปกติ กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด⁽²³⁻²⁵⁾

ยีนราส จัดเป็นยีนก่อมะเร็งที่พบมากที่สุดในมนุษย์ ประมาณร้อยละ 20-25 ในมะเร็งทั้งหมด และอาจพบสูงถึงร้อยละ 90 ในมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งตับอ่อน ดังตารางที่ 1⁽¹⁰⁾

| HRAS, KRAS, NRAS and BRAF mutations in human cancer

Cancer type	HRAS	KRAS	NRAS	BRAF
Biliary tract	0%	33%	1%	14%
Bladder	11%	4%	3%	0%
Breast	0%	4%	0%	2%
Cervix	9%	9%	1%	0%
Colon	0%	32%	3%	14%
Endometrial	1%	15%	0%	1%
Kidney	0%	1%	0%	0%
Liver	0%	8%	10%	3%
Lung	1%	19%	1%	2%
Melanoma	6%	2%	18%	43%
Myeloid leukaemia	0%	5%	14%	1%
Ovarian	0%	17%	4%	15%
Pancreas	0%	60%	2%	3%
Thyroid	5%	4%	7%	27%

ตารางที่ 1 แสดงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในมะเร็งชนิดต่างๆ⁽¹⁰⁾

การกลายพันธุ์ของยีนแคราส พบได้บ่อยทั้งในมะเร็งของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ประมาณร้อยละ 40 และมะเร็งตับอ่อน ซึ่งพบสูงถึงร้อยละ 60 แต่การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ยังมีจำกัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นโรคที่พบน้อย โดยมีรายงานถึงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสที่แตกต่างกันสูงมากตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 75^(7, 11-15)

Motojima และคณะ⁽¹¹⁾ ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนแคราส จากชิ้นเนื้อมะเร็งชนิดที่อยู่รอบแอมพลูเรีย 105 ราย แบ่งออกเป็นมะเร็งตับอ่อน 44 ราย, มะเร็งของท่อทางเดินน้ำดี 46 ราย, และมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย 15 ราย พบมีการกลายพันธุ์ของยีนแคราส ในตำแหน่งโคดอน 12 จำนวน 2 รายหรือร้อยละ 13.3 ดังในตารางที่ 2

Diagnosis	Incidence	P value
Pancreatic carcinoma	39/44 (88.6%)	
Ampullary carcinoma	2/15 (13.3%)	< 0.005
Bile duct carcinoma	9/46 (19.6%)	< 0.005
• Distal	7/17 (41.2%)	
• Middle	0/6	
• Proximal	2/23 (8.7%)	

ตารางที่ 2 แสดงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสจากการศึกษาของ Motojima และคณะ

Howe และคณะ⁽⁷⁾ ได้ทำการศึกษากการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในชิ้นเนื้อของมะเร็งชนิดแอมพูลลารีรี่ และเนื้องอกของแอมพูลลารีรี่ จำนวน 138 ราย ตรวจพบมีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 34 รายจากชิ้นเนื้อของมะเร็งชนิดแอมพูลลารีรี่ 92 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 37 โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 จำนวน 30 ราย (ร้อยละ 88.2) และตำแหน่งโคดอน 13 จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 11.8) โดยพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังแสดงในตารางที่ 3

K-ras mutation in 34 Isolates of ampullary carcinomas

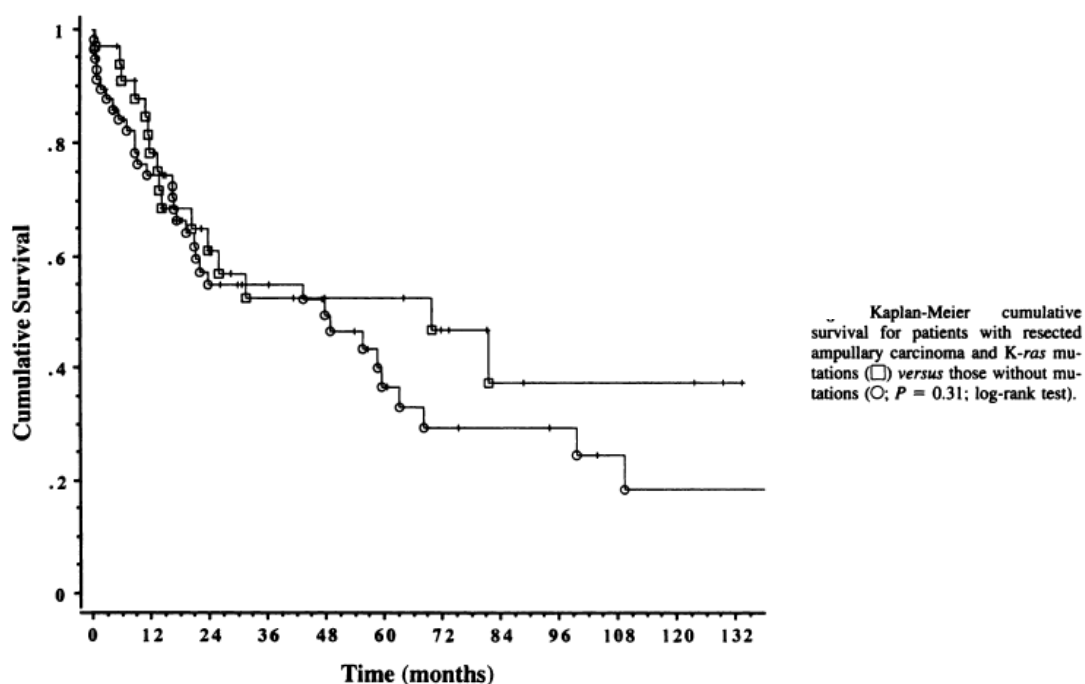
	Codon 12	Codon 13	Amino acid	Incidence
Wild type	GGT		Glycine	58/92 (63%)
Mutation	GAT		Aspartate	35.5%
	GTT		Valine	23.5%
	CGT		Arginine	11.8%
	TGT		Cysteine	8.8%
	GCT		Alanine	5.9%
	AGT		Serine	2.9%
		GAC	Aspartate	11.8%

ตารางที่ 3 แสดงการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งต่างๆจากการศึกษาของ Howe และคณะ

การศึกษานี้ได้พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนเคราสกับปัจจัยทางด้านคลินิกและพยาธิวิทยา ดังนี้ ขนาดของก้อนเนื้องอกที่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร จะตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสร้อยละ 27.5 ส่วนขนาดของก้อนเนื้องอกที่มากกว่า 2 เซนติเมตร จะตรวจพบ

การกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ร้อยละ 48.8 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.035$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์กับ tumor grade, histologic subtype, ระยะของโรค, perineural invasion หรือการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

ในการศึกษานี้ ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ และกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ โดยมีความมัธยฐานของการรอดชีวิตที่ 69.7 เดือนและ 47.6 เดือน ตามลำดับ ($P = 0.31$) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ จากการศึกษานี้ของ Howe และคณะ ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์และไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์⁽⁷⁾

จากการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ในมะเร็งตับอ่อนในผู้ป่วยไทยของ นพ. วิทวัส จิตต์ผิงงาม จำนวน 25 ราย ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ 10 รายหรือร้อยละ 40 แต่พบมีมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ จำนวน 9 ราย ซึ่งสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส์ 2 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 22.2

จากที่กล่าวข้างต้นว่าการศึกษาทางด้านความผิดปกติทางพันธุกรรมของมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ยังมีข้อมูลค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากอุบัติการณ์ของโรคที่พบน้อย และการศึกษาที่ผ่านมา มีจำนวนผู้ป่วยที่น้อย ทำให้มีความแตกต่างของความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสค่อนข้างมาก ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึงร้อยละ 75 อีกทั้งการที่จำนวนผู้ป่วยที่น้อยในแต่ละการศึกษา จึงยังไม่สามารถให้ข้อสรุปที่ชัดเจนถึงความสำคัญทางคลินิกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งชนิดนี้ ซึ่งได้รวบรวมการศึกษาต่างๆที่ผ่านมาเกี่ยวกับความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ไว้ในตารางที่ 4

Study	No. mutated	No. of tumors	% Mutations
Smit	0	1	0
Motojima ⁽¹¹⁾	2	15	13.3
Stork ⁽¹²⁾	3	4	75
Scarpa, 1993 ⁽¹³⁾	2	11	18.2
Scarpa, 1994 ⁽¹⁴⁾	3	12	25
Howe ⁽⁷⁾	34	92	37
Zhoa ⁽¹⁵⁾	14	37	38
Wittawat	2	9	22.2

ตารางที่ 4 แสดงการศึกษาต่างๆที่ผ่านมาเกี่ยวกับความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย

บทที่ 3

มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ (Ampullary Cancer)

3.1 บทนำ

มะเร็งในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ ของ ampulla of Vater ซึ่งประกอบไปด้วยมะเร็งที่กำเนิดมาจากตับอ่อน, ท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลาย, ลำไส้เล็กส่วนต้นรวมทั้งมะเร็งของ ampulla of Vater เอง

Ampulla of Vater เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยชั้นกล้ามเนื้อของ sphincter of Oddi ล้อมรอบทางออกของท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลายและท่อของตับอ่อนที่จะมาเปิดออกบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และมีส่วนของ papilla of Vater อยู่ที่ส่วนปลายของบริเวณดังกล่าว

มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ ก็คือมะเร็งชนิดที่กำเนิดมาจากส่วนของ ampulla of Vater ซึ่งอยู่ที่ส่วนปลายของรอยต่อระหว่างท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลายและท่อของตับอ่อน นั่นเอง

ดังนั้นมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ อาจกำเนิดมาจากชั้นเยื่อเมือกของท่อทางเดินน้ำดี, ตับอ่อนหรือลำไส้เล็กส่วนต้น จึงให้ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือชนิด intestinal และชนิด pancreatobiliary ⁽¹⁶⁾

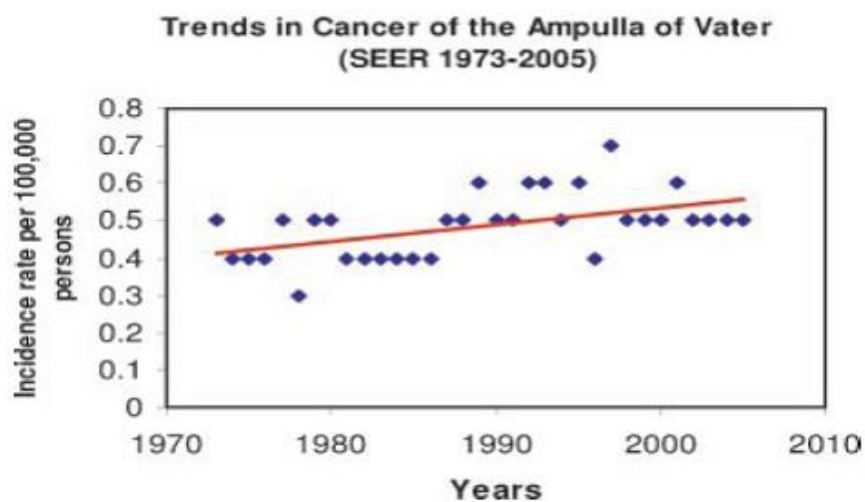
3.2 ระบาดวิทยา

แม้ว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งของเนื้อเยื่อลำไส้เล็ก จะสามารถเกิดขึ้นได้บ่อยบริเวณของ ampulla of Vater มากกว่าลำไส้เล็กส่วนอื่นๆ แต่พบอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ค่อนข้างน้อย เพียง 4-6 รายต่อประชากร 1 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 6 ถึง 20 ของมะเร็งชนิดที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ ทั้งหมด ⁽¹⁻³⁾ หรือเพียงร้อยละ 0.2 ถึง 0.4 ของมะเร็งทางเดินอาหารทั้งหมด พบมีรายงานว่าการอุบัติการณ์ของโรค มีการเพิ่มขึ้นในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา ⁽¹⁾

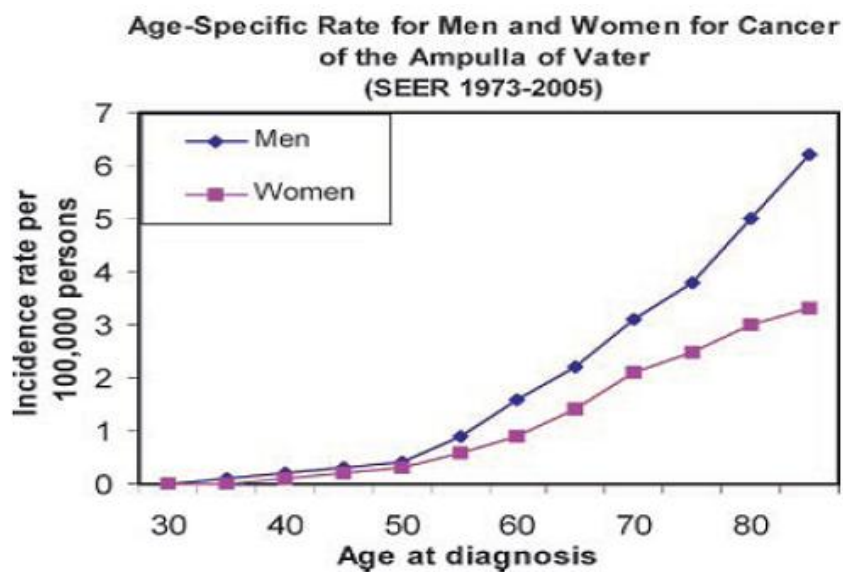
เนื้องอกของแอมพูลารีย์ ทั้งเนื้องอกที่เป็นมะเร็งและไม่ใช่มะเร็ง สามารถเกิดขึ้นได้เองหรืออาจเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม อุบัติการณ์ของโรคจะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรค

ทางพันธุกรรมถึง 200-300 เท่า ได้แก่โรค familial adenomatous polyposis (FAP) และโรค hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)

การคัดกรองด้วยการส่องกล้องทางเดินอาหาร จึงมีความสำคัญในการค้นหา มะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ระยะเริ่มแรกในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ซึ่งจะพบก้อนเนื้องอกก่อนกลายเป็นมะเร็งได้บ่อย และผู้ป่วยกลุ่มนี้ ยังสามารถเกิดก้อนเนื้องอกที่สามารถกลายเป็นมะเร็งได้ตลอดทางเดินอาหารส่วนต้นถึง ร้อยละ 90 ⁽²⁸⁾



รูปที่ 4 แสดงอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ในช่วงปี ค.ศ.1973 ถึง 2005 ⁽¹⁾



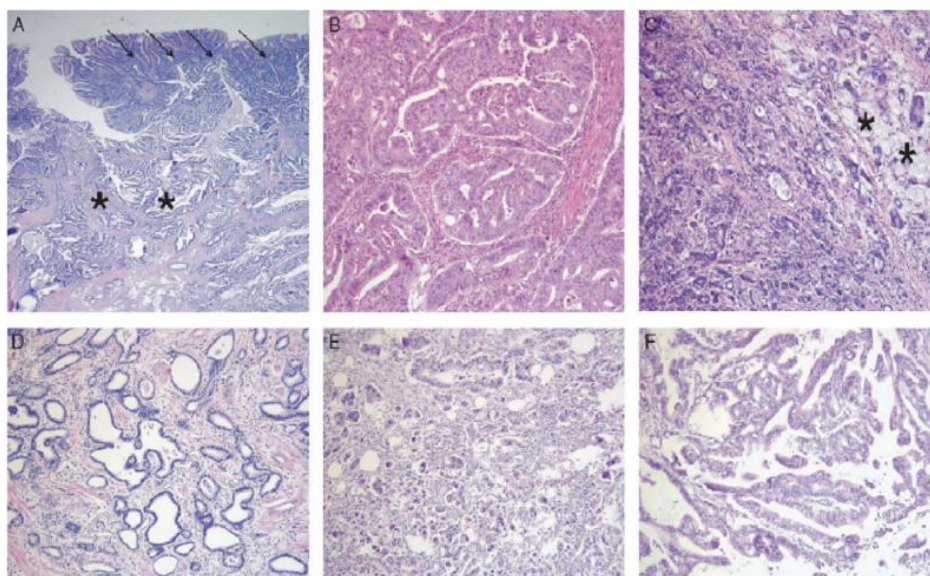
รูปที่ 5 แสดงอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ตามเพศในช่วงปี ค.ศ.1973 ถึง 2005 ⁽¹⁾

อายุเฉลี่ยเมื่อวินิจฉัยของมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยู่ที่ 60-70 ปี^(26, 29-31) แต่ในผู้ป่วยที่มีโรคทางพันธุกรรมดังกล่าว อาจสามารถวินิจฉัยโรคได้ที่อายุน้อยกว่า จากผลของการคัดกรองด้วยกล้องส่องทางเดินอาหารในผู้ป่วยกลุ่มนี้

3.3 ลักษณะทางอณูชีววิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อย

มีหลายๆการศึกษาทางอณูชีววิทยาพบว่ามะเร็งชนิดแอมพูลารี้อย มีความคล้ายคลึงมะเร็งทางเดินอาหารมากกว่ามะเร็งตับอ่อน ดังนี้

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อย มีความคล้ายคลึงกับมะเร็งทางเดินอาหาร มากกว่ามะเร็งตับอ่อน⁽¹⁸⁾ จากการศึกษาของ Ruemmele และคณะ ในมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อย จำนวน 170 ราย พบว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบมากที่สุดคือ intestinal subtype (ร้อยละ 47), รองลงมาคือ pancreatobiliary subtype (ร้อยละ 24), poorly differentiated adenocarcinoma (ร้อยละ 13), intestinal mucinous (ร้อยละ 8) และ papillary subtype (ร้อยละ 5)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยชนิดต่างๆ

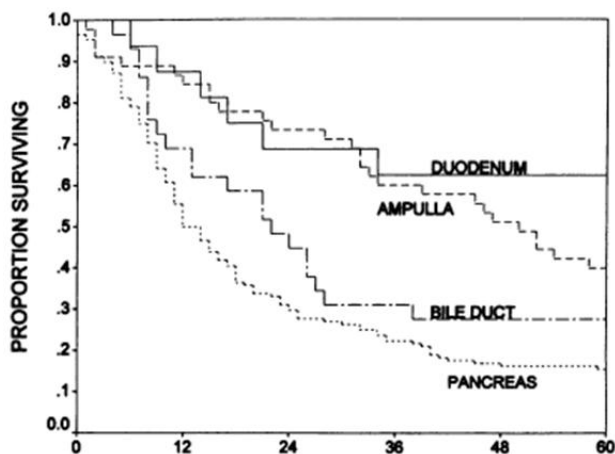
A-B. Intestinal adenocarcinoma C. Intestinal-mucinous D. Pancreatobiliary E. Poorly differentiated adenocarcinoma and F. Papillary adenocarcinoma⁽¹⁸⁾

การตรวจพบลักษณะที่เป็น adenomatous polyps นำมาก่อนในกระบวนการพัฒนาการเกิดของมะเร็งชนิดนี้ที่เรียกว่า adenoma-carcinoma sequence ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่เป็นโรค familial adenomatous polyposis (FAP) ยังพบอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นของทั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อย ช่วยสนับสนุนว่ากระบวนการเกิดมะเร็งของทั้งสองชนิดนี้น่าจะมีความคล้ายคลึงกัน⁽¹⁹⁾

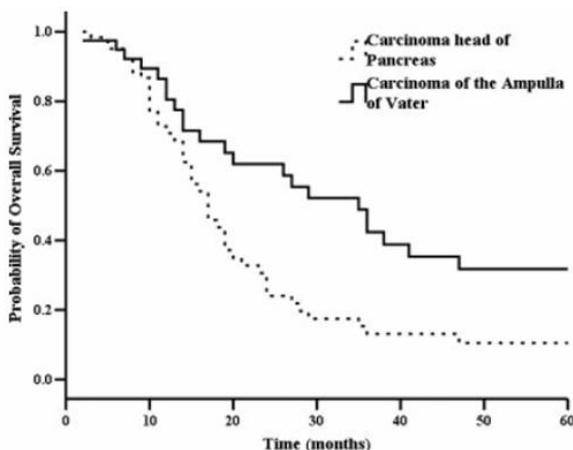
พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสีในกระบวนการเกิดมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยู่ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น โดยมีอุบัติการณ์ร้อยละ 37 ซึ่งใกล้เคียงกับอุบัติการณ์ของยีนชนิดนี้ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก⁽⁷⁾

พบการแสดงออกของโปรตีน cyclooxygenase-2 (COX-2) ในมะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยู่ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้บ่อยในมะเร็งของทางเดินอาหาร มากกว่ามะเร็งตับอ่อน โดยสามารถตรวจพบการแสดงออกของ COX-2 ได้สูงถึงร้อยละ 78 โดยมีการแบ่งชนิดของมะเร็งชนิดนี้ ตามการแสดงออกของโปรตีนนี้ พบว่าใน intestinal subtype จะพบการแสดงออกของ COX-2 ถึงร้อยละ 95 ตรงข้ามกับใน pancreatobiliary subtype ที่มีการแสดงออกเพียงร้อยละ 50 เท่านั้น⁽³²⁾

มะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยู่ ถือเป็นมะเร็งชนิดที่มีพยากรณ์โรคดีกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆในกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารี้อยู่ด้วยกัน⁽³³⁾ โดยพบมีอัตราการผ่าตัดได้สูงมากกว่าร้อยละ 90 และอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีประมาณร้อยละ 30 ถึง 50 เมื่อเทียบกับมะเร็งตับอ่อนที่มีอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปี น้อยกว่าร้อยละ 10⁽⁴⁻⁶⁾ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสามารถวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ตั้งแต่วัยแรกของโรค จากการที่มีอาการและอาการแสดงของการอุดตันของทางเดินน้ำดีที่เกิดขึ้นเร็ว⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าอาจมีความแตกต่างในระดับการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้มะเร็งชนิดแอมพูลารี้อยู่ มีพยากรณ์โรคที่แตกต่างจากมะเร็งตับอ่อน^(8, 9)



รูปที่ 7 แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีในมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารี้อยู่⁽³³⁾



รูปที่ 8 แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีหลังการผ่าตัดในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์และมะเร็งตับอ่อน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.006$)⁽⁵⁾

3.4 ลักษณะอาการทางคลินิก

ลักษณะอาการทางคลินิกที่พบมากที่สุด ในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ คือ อาการตัวตาเหลือง จากการอุดตันของทางเดินน้ำดี (ร้อยละ 80)⁽³¹⁾ มักไม่มีอาการปวดหรือมีอาการปวดแบบไม่เฉพาะเจาะจงตรงบริเวณลิ้นปี่ ส่วนอาการคันจากการคั่งของทางเดินน้ำดีและอาการติดเชื้อของทางเดินน้ำดี พบได้แต่ไม่บ่อย^(34, 35) ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจพบมีนิ่วในทางเดินน้ำดีส่วนปลายร่วมด้วย จากการอุดตันของทางเดินน้ำดี (ร้อยละ 25) อาการอื่นๆที่พบได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียนจากก้อนเนื้องอกที่มีขนาดใหญ่กดเบียดทางเดินอาหาร, ถ่ายเป็นมันลอย จากการดูดซึมไขมันผิดปกติ, อ่อนเพลีย, น้ำหนักลด ส่วนอาการที่พบน้อย คือ อาการตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน, โลหิตจาง จากการขาดธาตุเหล็ก และเลือดออกจากทางเดินอาหาร

3.5 การวินิจฉัยและการวินิจฉัยแยกโรค

การวินิจฉัยมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ ใช้การตรวจทางรังสีวิทยา, การส่องกล้องทางเดินอาหารและทางเดินน้ำดี ร่วมกับการตรวจทางพยาธิวิทยา

แม้ว่าจะมีการพัฒนาการส่องกล้องทางเดินอาหารและทางเดินน้ำดี เพื่อช่วยในการแยกแยะระหว่างเนื้องอกที่ไม่ใช่มะเร็ง และมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ แต่ในบางครั้งก็สามารถแยกกันได้อย่าง

ระหว่าง 2 ภาวะนี้ โดยไม่ผ่าตัด รวมทั้งในเนื้องอกของแอมพูลารีรี สามารถเปลี่ยนแปลงกลายเป็น มะเร็งในภายหลัง หรืออาจมีบางส่วนของมะเร็งชนิดแอมพูลารีรีซ่อนอยู่ภายในของเนื้องอกเหล่านี้

นอกจากนี้ ยังจำเป็นต้องแยกมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี ออกจากมะเร็งชนิดอื่นๆในกลุ่มที่อยู่ รอบแอมพูลารีรี ได้แก่ มะเร็งตับอ่อนส่วนหัว, มะเร็งลำไส้เล็กส่วนต้น และมะเร็งท่อทางเดินน้ำดี ส่วนปลาย แม้ว่าการตรวจทางรังสีวิทยาและการส่องกล้องทางเดินอาหารและทางเดินน้ำดี อาจ ช่วยแยกได้บ้าง แต่ในบางกรณี ต้องแยกโดยใช้การผ่าตัดและการตรวจทางพยาธิวิทยาเท่านั้น ซึ่ง มีการพยากรณ์โรคที่แตกต่างกัน⁽³⁶⁾

3.5.1 การตรวจทางคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูง (Transabdominal ultrasonography — US)

เป็นการตรวจเพิ่มเติมที่ควรทำเป็นครั้งแรก ในผู้ป่วยที่มีอาการตัวตาเหลืองจากการอุดตัน ทางเดินน้ำดี เนื่องจากเป็นการตรวจที่ผู้ป่วยไม่เจ็บตัว (non-invasive) สามารถบอกตำแหน่งและ สาเหตุของการอุดตันทางเดินน้ำดีได้ แต่บางครั้งอาจมองเห็นบริเวณตับอ่อนและแอมพูลารีรีได้ยาก จากการบดบังของลมในลำไส้ รวมทั้งเป็นการตรวจที่ขึ้นกับความชำนาญของผู้ตรวจเป็นสำคัญ (operator dependent) โดยทั่วไป มีความถูกต้อง ร้อยละ 15⁽³⁷⁾

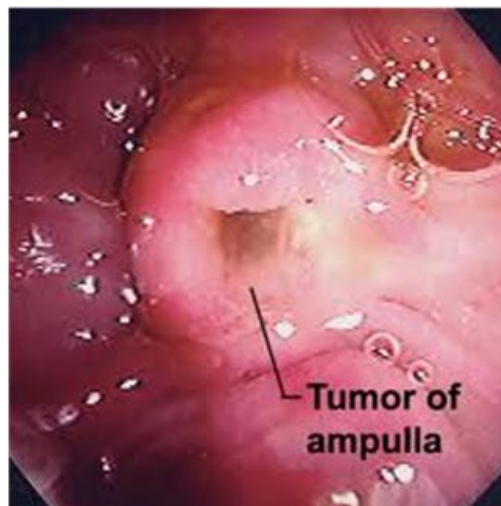
3.5.2 การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ช่องท้อง (Abdominal CT)

การตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ช่องท้อง มีความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจ ทางคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูง โดยเฉพาะใช้เทคนิคสำหรับการตรวจบริเวณที่อยู่รอบแอมพูลารีรี โดยเฉพาะ หรือ “pancreatic protocol” นอกจากนี้ ยังมีประโยชน์ในการกำหนดระยะของโรค สามารถบอกการกระจายของโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียงและอวัยวะอื่นๆนอกบริเวณ แอมพูลารีรี เช่น ตับ, เยื่อหุ้มช่องท้อง, ปอด และกระดูก เป็นต้น รวมทั้งประเมินความเป็นไปได้ใน การผ่าตัดได้ แต่อาจมีข้อจำกัดในการประเมินก้อนเนื้องอกกดเบียดอวัยวะข้างเคียง รวมทั้งการ ลูกกลมไปยังเส้นเลือดใหญ่⁽³⁸⁾

3.5.3 การส่องกล้องทางเดินน้ำดีและตับอ่อน (endoscopic retrograde cholangiopancreatography - ERCP)

เป็นการตรวจที่สามารถช่วยให้ได้ภาพทางรังสีที่แสดงการอุดตันของทางเดินน้ำดี และทางเดินของตับอ่อน สามารถได้ชิ้นเนื้อตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อการวินิจฉัย (tissue diagnosis) และยังสามารถให้การรักษาภาวะเหลืองจากการอุดตันของทางเดินน้ำดี โดยการใส่หลอดขยายทางเดินน้ำดีที่มีการอุดตัน ได้ในเวลาเดียวกัน แต่มีข้อจำกัดในการประเมินระยะของโรค และการวางแผนการผ่าตัด

มะเร็งชนิดแอมพูลารีอ์ สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนจากการส่องกล้อง โดยส่วนใหญ่ จะเป็นก้อนเนื้ออกที่ยื่นออกมาด้านนอก (exophytic mass) และลักษณะที่น่าสงสัยว่าจะเป็นมะเร็ง คือ ก้อนที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 เซนติเมตร หรือมีแผล ดังรูปที่ 9 โดยทั่วไปมีความถูกต้องสูง ร้อยละ 88⁽³⁹⁾ อย่างไรก็ตาม พบมีผลลบลงจากการตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสูงถึงร้อยละ 50 ดังนั้นการตรวจไม่พบมะเร็งด้วยวิธีนี้ จึงไม่สามารถยืนยันได้ว่า ไม่เป็นมะเร็งจริง



รูปที่ 9 แสดงมะเร็งชนิดแอมพูลารีอ์จากการตรวจด้วย ERCP

3.5.4 การตรวจด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของทางเดินน้ำดีและตับอ่อน (magnetic resonance cholangiopancreatography - MRCP)

เป็นการตรวจที่ผู้ป่วยไม่เจ็บตัว (non-invasive) เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่มีข้อห้ามในการตรวจด้วยวิธี ERCP (ผู้ป่วยที่เคยผ่าตัดบริเวณช่องท้อง ที่ทำให้โครงสร้างกายวิภาคของทางเดินอาหาร, ทางเดินน้ำดี เปลี่ยนแปลงไป เช่น Roux-en-Y gastrojejunostomy) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถมองเห็นตรงแอมพูลารีย์ได้ชัดเจน หรือไม่สามารถตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจได้ โดยทั่วไป มีความถูกต้อง ร้อยละ 76⁽³⁹⁾

3.5.5 การฉีดสีทางเดินน้ำดีโดยเจาะผ่านผนังหน้าท้อง (percutaneous transhepatic cholangiography - PTC)

เป็นการตรวจที่ผู้ป่วยเจ็บตัว (invasive) โดยใช้เข็มเจาะผ่านผนังหน้าท้องไปยังทางเดินน้ำดีภายในตับ เพื่อฉีดสีดูทางเดินน้ำดี มักทำกรณีที่ไม่สามารถตรวจด้วยวิธี ERCP นอกจากนี้ยังสามารถตรวจชิ้นเนื้อโดยวิธี brush cytology ได้ แต่มีข้อจำกัดในการมองเห็นทางเดินน้ำดีนอกตับ, ทางเดินท่อตับอ่อน, ก้อนเนื้อออกตรงลำไส้เล็กส่วนต้น รวมทั้งตรงบริเวณแอมพูลารีย์

3.5.6 การส่องกล้องตรวจด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (endoscopic ultrasonography - EUS)

สามารถตรวจหาก้อนเนื้ออกแอมพูลารีย์ขนาดเล็กได้ดี พอๆกับวิธี ERCP และดีกว่า CT กับ transabdominal US ช่วยในการวินิจฉัยโดยสามารถตัดตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา บอกการลุกลามของก้อนเนื้อออกไปยังอวัยวะข้างเคียง โดยเฉพาะต่อมน้ำเหลือง และเส้นเลือดใหญ่ ประเมินระยะของโรคและความเป็นไปได้ในการผ่าตัด

ข้อจำกัดคือ ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจ และยังมีเฉพาะในโรงเรียนแพทย์หรือโรงพยาบาลศูนย์ขนาดใหญ่เท่านั้น

3.5.7 สารบ่งชี้มะเร็งในเลือด (serum tumor markers)

ได้แก่ การตรวจ carbohydrate antigen CA 19-9 and/or carcinoembryonic antigen (CEA) ไม่เฉพาะเจาะจงสำหรับมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรีย สามารถมีค่าผิดปกติได้ในมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งตับอ่อน, มะเร็งของท่อทางเดินน้ำดี, และมะเร็งรังไข่ เป็นต้น และสามารถพบได้ในภาวะอื่นๆที่ไม่ใช่มะเร็งได้ด้วย เช่น ตับอ่อนอักเสบ, ตับอักเสบ, มีการอุดกั้นของทางเดินน้ำดีจากสาเหตุอื่นๆ เช่น นิ่วในทางเดินน้ำดี, โรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น จึงมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยโรค แต่อาจมีประโยชน์ในการติดตามการรักษา, การตอบสนองต่อการรักษา รวมทั้งการกลับเป็นซ้ำของโรค

3.6 ระยะโรค

การแบ่งระยะโรคของมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรีย นิยมใช้ระบบ tumor-node-metastasis (TNM) system ขององค์กร AJCC (American Joint Committee on Cancer)/UICC (International Union Against Cancer) โดยปัจจุบันเป็นครั้งที่ 7 ของปี ค.ศ. 2010 ดังตารางที่ 5

Primary tumor (T)

T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor limited to the ampulla of Vater or sphincter of Oddi
T2	Tumor invades duodenal wall
T3	Tumor invades pancreas
T4	Tumor invades peripancreatic soft tissues or other adjacent organs or structures other than pancreas

Regional lymph nodes (N)

N0 No regional lymph node metastasis

N1 Regional lymph node metastasis

Distant metastasis (M)

M0 No distant metastasis

M1 Distant metastasis

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stage III	T4	Any N	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

ตารางที่ 5 แสดงระยะโรคของมะเร็งชนิดแอมพูลารี

โดยการแบ่งระยะโรคแบบ TNM staging system ช่วยทำนายการพยากรณ์โรคของมะเร็งชนิดนี้ได้ดี ดังตารางที่ 6 ⁽²⁹⁾

Stage	Sample size Patients, % (n)	5-Year survival (%)		10-Year survival (%)	
		Observed	Cancer specific	Observed	Cancer specific
Overall	1301	36.8	47.3	26.3	41.8
AJCC 6th edition stage					
Ia	17.3% (218)	59.5	73.9	42.8	64.7
Ib	20.2% (255)	56.5	65.7	35.4	61.4
IIa	20.0% (252)	30.3	41.3	24.6	36.0
IIb	38.3% (483)	22.1	30.1	15.6	23.5
III	3.0% (38)	26.7	34.4	20.0	34.4
IV	1.2% (15)	0	0	0	0
N stage ^a					
N0	39.8% (518)	47.6	59.4	33.8	54.1
N1	57.6% (749)	21.0	28.4	14.9	21.9

AJCC, American Joint Committee on Cancer.

^a N stage was not available for 34 patients (2.6%).

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีตามระยะของโรค ⁽²⁹⁾

3.7 การรักษา

ขึ้นกับระยะโรคเป็นสำคัญ โดยการรักษาในระยะแรกที่สำคัญคือ การผ่าตัด เนื่องจากเป็นวิธีเดียวที่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ โดยเกณฑ์ที่ใช้พิจารณาการผ่าตัด ได้แก่ ไม่มีการกระจายของตัวมะเร็งออกนอกตับอ่อน, ไม่มีกดเบียดของเส้นเลือดดำใหญ่ mesentery หรือ portal, ไม่มีการกดเบียดของเส้นเลือดแดงใหญ่ celiac และ mesentery

3.7.1 การผ่าตัด

เป็นการรักษาหลักในระยะแรกของโรค วิธีการผ่าตัดที่เป็นมาตรฐานคือ การผ่าตัดแบบ Whipple operation คือการตัดส่วนหัวของตับอ่อนและลำไส้เล็กส่วนต้นออก และนำส่วนของกระเพาะอาหาร, ตับอ่อนส่วนที่เหลือ และท่อทางเดินน้ำดีมาเชื่อมต่อ เพื่อสร้างทางเชื่อมกันใหม่ หรือเรียกว่า Roux-en-Y anastomoses อัตราการผ่าตัดได้ในมะเร็งชนิดแอมพลูลาเรียดีกว่ามะเร็งตับอ่อนมาก (ร้อยละ 90 เทียบกับร้อยละ 20-30) ⁽³⁷⁾

การพยากรณ์โรคในผู้ป่วยที่รักษาด้วยการผ่าตัด ขึ้นกับ การลุกลามของก้อนมะเร็ง, การผ่าตัดให้ได้ขอบเขตที่เพียงพอ, และการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง ⁽³⁵⁾ โดยอัตราการอยู่

รอดที่ 5 ปีในกลุ่มที่มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลือง เท่ากับร้อยละ 17-50 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง อยู่ที่ร้อยละ 64-80

เนื่องจากมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย พบการกลับเป็นซ้ำของโรคได้ถึงร้อยละ 50 ตามหลังการรักษาด้วยการผ่าตัด ส่วนใหญ่เป็นการกระจายไปยังอวัยวะอื่นนอกแอมพลูเรีย ตำแหน่งที่พบมีการกระจายของโรคมากที่สุดคือ ตับ รองลงมาคือ เยื่อช่องท้อง ตำแหน่งอื่นๆที่พบได้ เช่น ปอด, กระดูก และต่อมน้ำเหลืองไหลปลาร้าซ้าย

3.7.2 การรักษาเสริมหลังการผ่าตัด (adjuvant treatment)

จากที่กล่าวข้างต้นว่า แม้ว่ามะเร็งชนิดแอมพลูเรียจะสามารถผ่าตัดให้หายขาดได้สูง แต่ผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 50 เสียชีวิตจากการกลับเป็นซ้ำของโรค การรักษาเสริมหลังการผ่าตัดจึงเป็นสิ่งสำคัญ แต่มีการศึกษาเพียงเล็กน้อยเท่านั้นในผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้ ทำให้มีข้อจำกัดในการพิจารณาการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด ข้อมูลส่วนใหญ่จึงอ้างอิงจากการศึกษาในมะเร็งตับอ่อน โดยมี 2 ทางเลือกได้แก่ การรักษาด้วยการฉายแสงร่วมกับยาเคมีบำบัด และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดอย่างเดียว

1) การรักษาด้วยการฉายแสงร่วมกับยาเคมีบำบัด

ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง⁽⁴⁰⁻⁴⁵⁾ หนึ่งในรายงานการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากที่สุดมาจากเมโยคลินิก⁽⁴¹⁾ ศึกษาในผู้ป่วย 125 รายที่ได้รับการผ่าตัดในมะเร็งชนิดแอมพลูเรีย ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเสริมด้วยการฉายแสงร่วมกับการยาเคมีบำบัด มีจำนวน 29 ราย ที่เหลือไม่ได้รับการรักษาเสริม จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบหลายตัวแปร พบว่าการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองเป็นปัจจัยเดียวที่เกี่ยวข้องกับอัตราการอยู่รอด อัตราการรอดชีวิตที่ 1 ปี, 3 ปี, และ 5 ปี ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาเสริม เท่ากับร้อยละ 91, 54 และ 48 ตามลำดับ เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาเสริม อยู่ที่ร้อยละ 66, 22 และ 11 ตามลำดับ แต่ในกลุ่มที่มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง พบว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาเสริมมีอัตราการอยู่รอดที่นานกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาเสริม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การศึกษาย้อนหลังจากรายงานอื่นๆ กลับได้ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกัน และการศึกษาที่เป็น randomized phase 3 trial เพียง 1 การศึกษา⁽⁴⁶⁾ ก็ไม่พบ

ประโยชน์ชัดเจนของการรักษาเสริมในผู้ป่วยกลุ่มนี้ โดยเป็นการศึกษาของ EORTC ศึกษาในผู้ป่วย 218 ราย ที่ได้รับการผ่าตัดในมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์และมะเร็งตับอ่อน ให้การรักษาด้วยการฉายแสง 40 Gy ร่วมกับยาเคมีบำบัด 5FU เทียบกับไม่ได้รับการรักษาเสริม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของอัตราการอยู่รอดที่ 2 ปี (ร้อยละ 67 และ 63 ตามลำดับ)

2) การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดอย่างเดียว

การศึกษาประโยชน์ของการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด มีการศึกษาโดยตรงในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ ในการศึกษานานาชาติ ESPAC-3⁽⁴⁷⁾ ในผู้ป่วย 304 ราย เปรียบเทียบระหว่างการให้ leucovorin-modulated 5-FU หรือ gemcitabine หรือไม่ให้การรักษาเสริม พบว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ามัธยฐานการรอดชีวิตระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาเคมีบำบัดและกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาเสริม (57.1 เดือน และ 43 เดือน ตามลำดับ, $P = 0.32$) รวมทั้งไม่มีความแตกต่างระหว่างชนิดของยาเคมีบำบัดที่ใช้ (ค่ามัธยฐานการอยู่รอดในกลุ่มที่ได้ leucovorin-modulated FU และ gemcitabine 56 เดือนและ 57.1 เดือน ตามลำดับ) แต่พบมีผลข้างเคียงในกลุ่มที่ได้ 5FU มากกว่า โดยเฉพาะ แผลในปากและท้องเสีย

อีกการศึกษาหนึ่งแบบ randomized มาจากประเทศญี่ปุ่น ในผู้ป่วย 508 รายที่เป็นมะเร็งตับอ่อนและมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพูลารีย์ โดยให้ mitomycin C ร่วมกับ 5FU เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษาเสริม พบว่าการให้ยาเคมีบำบัดเสริม มีประโยชน์เฉพาะในมะเร็งของถุงน้ำดีเท่านั้น อัตราการอยู่รอดที่ 5 ปี เท่ากับร้อยละ 26 และ 14 ตามลำดับ แต่ไม่พบประโยชน์ในมะเร็งชนิดอื่นๆ รวมทั้งมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ร้อยละ 28 และ 34 ในกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดและไม่ได้ ตามลำดับ)

โดยสรุปจึงยังไม่มีข้อตกลงชัดเจนถึงการรักษาเสริมหลังผ่าตัดที่เหมาะสมในผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ รวมถึงวิธีการให้การรักษาเสริมระหว่างการรักษาด้วยการฉายแสงร่วมกับยาเคมีบำบัด หรือยาเคมีบำบัดอย่างเดียว

3.7.3 การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดในระยะแพร่กระจาย

เนื่องจากเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์น้อย จึงมีการศึกษาจำนวนไม่มาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษารวมกันระหว่างมะเร็งแอมพลูเรียกับมะเร็งตับอ่อน, มะเร็งลำไส้เล็ก, และมะเร็งทางเดินน้ำดี มีการศึกษาหนึ่งคือ ABC trial⁽⁴⁹⁾ ที่รวมมะเร็งชนิดแอมพลูเรียไว้ด้วยเพียงร้อยละ 5 เป็นการศึกษาในผู้ป่วย 410 รายในระยะที่ผ่าตัดไม่ได้และระยะแพร่กระจาย ในมะเร็งกลุ่มที่อยู่รอบแอมพลูเรีย เปรียบเทียบระหว่างการให้ gemcitabine อย่างเดียว หรือ gemcitabine ร่วมกับ cisplatin พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการรอดชีวิตในกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกัน (ค่ามัธยฐานการอยู่รอด เท่ากับ 8.3 และ 11.7 เดือน ในกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดตัวเดียว และกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดร่วมกัน ตามลำดับ)

บทที่ 4

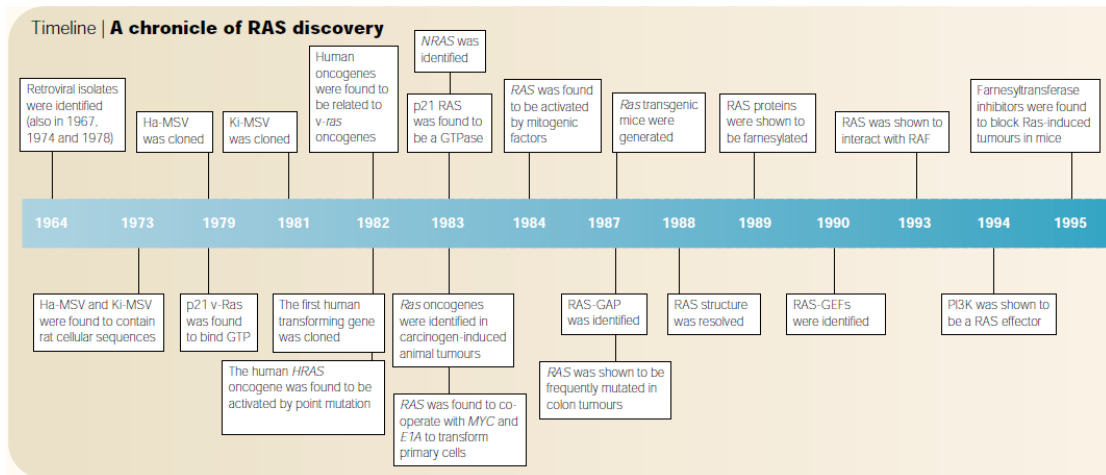
การกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation)

4.1 การค้นพบยีนราส (Ras gene)

ราส (Ras) เป็นกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดยชื่อ ras ได้มาจากชื่อย่อของ rat sarcoma ซึ่งเป็นโปรตีนตัวแรกในกลุ่มที่ถูกค้นพบ ชื่อราส ยังนำมาใช้หมายถึงยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเหล่านี้อีกด้วย เมื่อราส ถูกกระตุ้นการทำงาน จะมีการกระตุ้นการทำงานของยีนตัวอื่นๆที่อยู่ในลำดับต่อมา เกิดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต, การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ดังนั้นเมื่อเกิดกลายพันธุ์ของยีนราส จึงเกิดการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติไป นำมาซึ่งการกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ยีนราส จัดเป็นยีนก่อมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในมนุษย์ ประมาณร้อยละ 20-25 ในมะเร็งทั้งหมด และอาจพบสูงถึงร้อยละ 90 ในมะเร็งบางชนิด เช่นมะเร็งตับอ่อน ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบัน จึงมีการรักษาด้วยยาที่สามารถยับยั้งการทำงานของยีนราส ในมะเร็งที่พบมีการกลายพันธุ์ของยีนชนิดนี้

ยีนราสในมนุษย์มีอยู่ 3 ชนิดคือ Harvey (H-), Neuroblastoma (N-) และ Kirsten (K-) โดย H-ras และ K-ras เป็นยีน 2 ตัวแรกที่ถูกค้นพบจากการศึกษาในไวรัสที่สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งในหนู (rat sarcoma virus) ⁽¹⁰⁾ ได้แก่ Harvey และ Kirsten sarcoma virus ถูกค้นพบโดย Jennifer Harvey ⁽²⁰⁾ และ Warner Kirsten ⁽²¹⁾ ตามลำดับ และยีนราสตัวสุดท้ายถูกค้นพบในเวลาต่อมา ตั้งชื่อจากเซลล์ neuroblastoma ซึ่งเป็นเซลล์ที่ถูกพบมียีนชนิดนี้เป็นครั้งแรก ⁽²²⁾

การกลายพันธุ์ที่ยีนราสพบบ่อยที่โคดอน (codon) 12, 13 และ 61 นำไปสู่การควบคุมการแบ่งตัว, การเจริญเติบโต, และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ที่ผิดปกติ กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ⁽²³⁻²⁵⁾



รูปที่ 10 แสดงประวัติศาสตร์ของการค้นพบยีนราส⁽¹⁰⁾

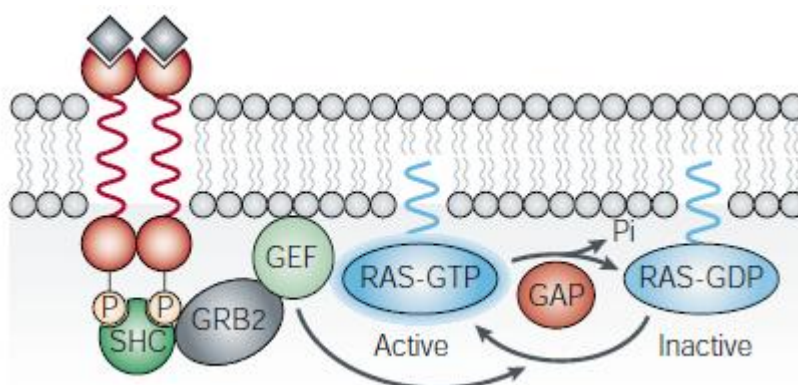
4.2 กระบวนการส่งสัญญาณของยีนราส

ราสโปรตีน เป็นสมาชิกของกลุ่มโปรตีนจี หรือโปรตีนที่จับกับนิวคลีโอไทด์กวานอซีน (GTP-binding proteins) ยีนราส 3 ชนิดที่พบมีการกลายพันธุ์ในมนุษย์ – HRAS, KRAS และ NRAS – มีโครงสร้างการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงถึงร้อยละ 85 แม้ว่าจะทำหน้าที่หลายๆ อย่างคล้ายกัน แต่พบมีความแตกต่างกันในหลายประการ⁽⁵⁰⁾ ตัวอย่างเช่น พบมีการแสดงออกของโปรตีน HRAS, KRAS และ NRAS ในหลายๆ เซลล์ แต่พบ KRAS ในเซลล์เกือบทุกชนิด โดยพบว่า HRAS และ NRAS ไม่มีความสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตของหนูปกติ ในขณะที่ KRAS กลับมีเป็นสิ่งจำเป็นที่หนูใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต

การทำงานของโปรตีนราสในภาวะปกติ จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการปรับเปลี่ยนภายหลังจากการแปลรหัสทางพันธุกรรม (post-translation) เริ่มตั้งแต่การกำหนดตำแหน่งที่ถูกตัดโดยโปรตีนตัดอยู่ที่ผิวด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อที่จะสามารถสรรหาโปรตีนอื่นๆ ที่เป็นเป้าหมายต่อไป การกระตุ้นการทำงานของยีนราส ขึ้นกับว่ายีนราสจับกับนิวคลีโอไทด์กวานอซีนที่มีฟอสเฟต 3 ตัว (guanosine triphosphate, GTP) ที่จะอยู่ในภาวะถูกกระตุ้นให้ทำงาน และสามารถกระตุ้นยีนเป้าหมายเป็นลำดับต่อไปได้ หรือยีนราสจับกับนิวคลีโอไทด์กวานอซีนที่มีฟอสเฟต 2 ตัว (guanosine diphosphate, GDP) ที่จะอยู่ในภาวะยับยั้งการทำงาน ในภาวะปกติการกระตุ้นการทำงานของยีนราส จะถูกควบคุมให้อยู่ในภาวะสมดุลระหว่าง GTP และ GDP โดยมีเอนไซม์

GTPase activating proteins (GAPs) ภายในเซลล์ ทำหน้าที่ย่อยสลาย RAS-GTP ไปเป็น RAS-GDP และมีปัจจัยกระตุ้นการทำงาน หรือ guanine nucleotide exchange factors (GEFs)

กระบวนการกระตุ้นการทำงานของยีนรหัสโดย GEFs ที่มีการศึกษากันมากที่สุดคือการกระตุ้นผ่าน SOS1 และ SOS2 ซึ่งเป็น mammalian homologues ของยีน *Drosophila* son of sevenless โดยหลังจากมีการกระตุ้นตัวรับการเจริญเติบโตที่อยู่นอกผิวเซลล์ (epidermal growth factor receptor, EGFR) จะมีการกระตุ้นการทำงานของ tyrosine kinase ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟต ไปจับกับส่วน SH2 domain ของโปรตีนแปลงสัญญาณที่ชื่อว่า growth-factor-receptor-bound protein 2 (GRB2) ร่วมกับการเพิ่มจำนวนของ SOS ที่ผิวเซลล์ที่ยีนรหัส ถูกกำหนดตำแหน่งไว้อยู่ เกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์กลายเป็น RAS-GTP ที่อยู่ในภาวะพร้อมทำงาน ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงกระบวนการส่งสัญญาณกระตุ้นยีนรหัส (Signaling upstream of RAS) ⁽⁵⁰⁾

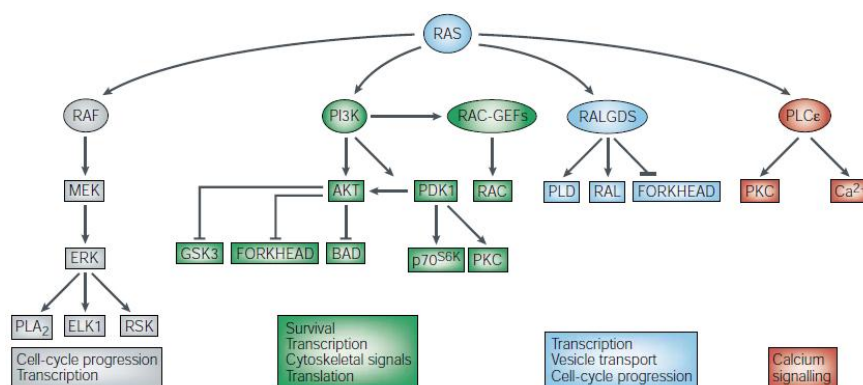
หลังจากยีนรหัสถูกกระตุ้นให้ทำงานในรูปของ RAS-GTP จะสามารถกระตุ้นยีนต่างๆที่เป็นเป้าหมายในลำดับต่อไป นำมาซึ่งการแบ่งตัว, การเจริญเติบโต, การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และการอยู่รอดของเซลล์ โดยยีนเป้าหมายตัวแรกของยีนรหัสที่มีการศึกษารองรับมากที่สุดคือ RAF ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนในกลุ่ม serine/threonine kinase ประกอบไปด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ c-RAF1, BRAF และ ARAF การกระตุ้น RAF ทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนอีก 2 ชนิดคือ mitogen-activated protein kinase 1 และ 2 (MEK 1 และ 2) นำมาซึ่งการกระตุ้นโปรตีนลำดับต่อไปคือ extracellular signal-regulated kinase 1 และ 2 (ERK 1 และ 2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการ

ทำงานของอีกหลายๆโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ได้แก่ ETS family transcription factors เช่น ELK1 ซึ่งควบคุมการแสดงออกของ FOS หรือ c-JUN ที่ควบคุมการสร้าง AP1 transcription factor เกิดเป็น FOS-JUN heterodimer ซึ่งควบคุมการแสดงของโปรตีนที่ควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) ได้แก่ cyclin ชนิด D ทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะพัก เข้าสู่ระยะเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งตัวหรือ G1

นอกจากการกระตุ้นเส้นทางของ RAF/MAPK แล้ว ยีนรหัสยังสามารถกระตุ้นเส้นทางอื่นๆมากมาย ดังแสดงในรูปที่ 12⁽⁵⁰⁾ ที่สำคัญคือการกระตุ้นโปรตีน phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) ชนิดที่ 1 สร้างตัวนำสัญญาณ (second-messenger) ได้แก่ phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ที่สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมายในลำดับต่อไปมากมาย แต่ที่ให้ความสนใจกันมากคือโปรตีนที่ควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ PDK1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) และ AKT (หรือ PKB) นอกจากนั้นการกระตุ้น PI3K ยังนำมาซึ่งการกระตุ้น RAC ซึ่งเป็นโปรตีนในครอบครัว RHO เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) และ transcription-factor pathways เช่นการกระตุ้น nuclear factor-**KB** (NF-**KB**)

เส้นทางที่ 3 คือการกระตุ้นโปรตีน RAL ซึ่งมีโปรตีนในกลุ่มที่สำคัญ 3 ชนิดคือ RAL guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS), RALGDS-like gene (RGL/RSB2) และ RGL2/RLF เกิดการกระตุ้น phospholipase D1 และ CDC42/RAC-GAP-RAL binding protein 1 (RALBP1) ซึ่งส่งสัญญาณยังยั้งการทำงานของ FORKHEAD transcription factors เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในวงจรชีวิตเซลล์ ผ่านทางการสร้าง cyclin-dependent kinase inhibitor KIP1 (หรือ p27) และเกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ผ่านทางการแสดงออกของ BIM และ FAS LIGAND

เส้นทางสุดท้ายของการกระตุ้นยีนรหัสคือ Phospholipase **CE** (PLC**E**) ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ไปเป็น diacylglycerol และ inositol trisphosphate เกิดการกระตุ้น protein kinase C (PKC) และการเคลื่อนย้ายของแคลเซียมจากภายในเซลล์ ดังสรุปในรูปที่ 12



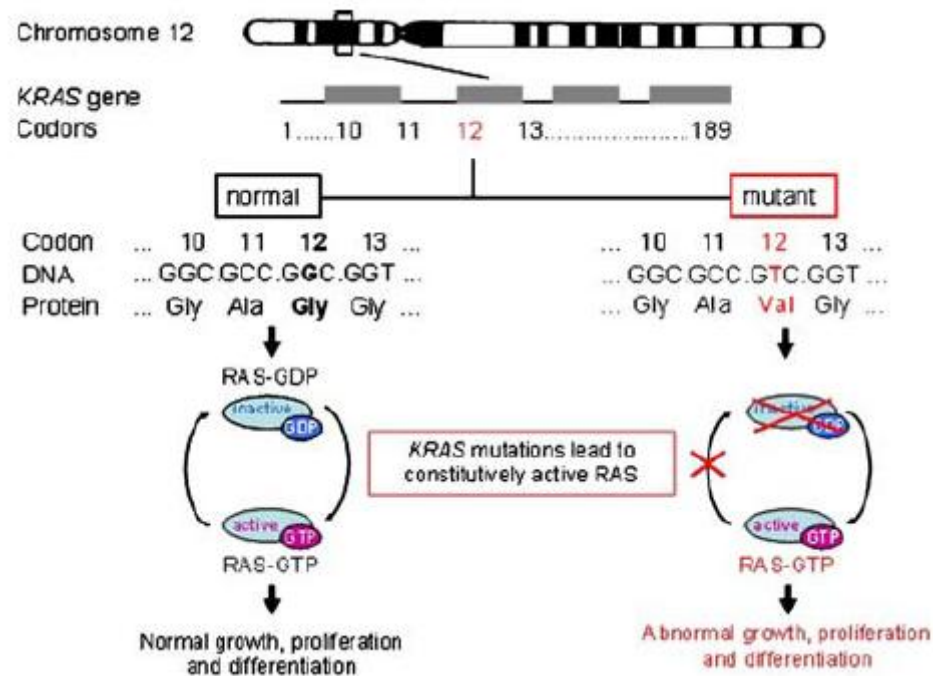
รูปที่ 12 แสดงการส่งสัญญาณของยีนราสไปยังเส้นทางต่างๆ (Signaling downstream of RAS) ⁽⁵⁰⁾

จากเส้นทางส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นยีนราสต่างๆดังได้กล่าวมา การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนราส จึงสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งได้หลากหลาย ได้แก่การกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์โดยไร้การควบคุมผ่านทางกระตุ้นของโปรตีนที่ควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ เช่น cyclin D1 นำมาซึ่งการยับยั้งการทำงานของ retinoblastoma (RB) และการกีดกันการทำงานของตัวยับยั้งวงจรชีวิตเซลล์ เช่น KIP1 เป็นต้น นอกจากนั้นยังเกิดการติดต่อกระบวนการที่ทำให้เซลล์เกิดการตาย (apoptosis) ผ่านทางการส่งสัญญาณผ่าน AKT/PKB รวมทั้งการกระตุ้นยีนราสได้นำมาซึ่งการกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ผ่านทางการเพิ่มขึ้นของ ERK ที่ทำให้มีการสร้างสารกระตุ้นการเกิดเส้นเลือดใหม่ (angiogenic factors) และการเพิ่มความสามารถในการลุกลามของมะเร็งผ่านทางกระตุ้น ERK ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ matrix metalloproteinases และการกระตุ้น RAC ที่ควบคุมเกี่ยวกับโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton)

4.3 การกลายพันธุ์ของยีนเคราส

การกลายพันธุ์ของยีนเคราส เป็นการกลายพันธุ์ของยีนเพียงตำแหน่งเดียว ทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป 1 ตัว นำมาซึ่งการทำงานที่ผิดปกติไปจนเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 มากที่สุด (ร้อยละ 82 ของการกลายพันธุ์ที่ยีนเคราสทั้งหมด), รองลงมาคือที่โคดอน 13 (ร้อยละ 17) ตำแหน่งอื่นๆที่มีรายงาน คือโคดอน 61 และ 146

(ร้อยละ 1-4) ยีนแคราสทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในกลุ่มของโปรตีนจี (G protein) หรือ guanosine-nucleotide-binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสวิตช์ปิด-เปิด ของการส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นตัวรับที่ผิวเซลล์ (epidermal growth factor receptor, EGFR) เพื่อส่งสัญญาณต่อเข้าไปในเซลล์ โดยเฉพาะการกระตุ้นผ่านเส้นทางของ RAS-MAPK (mitogen-activated protein kinase) ในภาวะพักหรือปิดสวิตช์ โปรตีนแคราสจะจับกับนิวคลีโอไทด์กวานอซีนที่มีฟอสเฟต 2 ตัว (guanosine diphosphate, GDP) แต่ในภาวะถูกกระตุ้นหรือเปิดสวิตช์ จะจับกับนิวคลีโอไทด์กวานอซีนที่มีฟอสเฟต 3 ตัว (guanosine triphosphate, GTP) ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนแคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และการกระตุ้นการทำงานของยีนแคราสในภาวะปกติ และผิดปกติ จนนำไปสู่การเกิดมะเร็ง⁽⁵¹⁾

การกลายพันธุ์ของยีนแคราส โดยเฉพาะที่ตำแหน่งโคดอน 12 นำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียง 1 ตัว ตัวอย่างเช่นเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไกลซีน เป็น วาลีน (p.Gly12Val) ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้บ่อยที่สุดในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ในภาวะปกติ จะมีกระบวนการควบคุมสมดุลระหว่าง RAS-GTP ที่อยู่ในภาวะเปิดสวิตช์ และ RAS-GDP ที่อยู่ในภาวะปิดสวิตช์ โดยการทำงานของปัจจัยกระตุ้น RAS (guanine

nucleotide exchange factors, GEFs) และโปรตีนที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย RAS-GTP กลับไปเป็น RAS-GDP (GTPase-activating proteins, GAPs)

เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนเคราสขึ้น กระบวนการควบคุมสมดุลนี้จะหายไป ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนต่างๆ เป็นลำดับต่อมาโดยไร้การควบคุม เกิดการเจริญเติบโต, การแบ่งตัว และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ที่ผิดปกติ จนเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง การกลายพันธุ์ของยีนเคราสเกิดขึ้นตั้งแต่การเกิดมะเร็งในระยะแรก และมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโต และลุกลามมากขึ้น สอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่า การกลายพันธุ์ของยีนเคราส บ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสเพิ่มขึ้นในระยะแพร่กระจาย, มีศักยภาพที่โรคจะแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆสูง, ระยะเวลาการรอดชีวิตและโรคสงบสั้นลง^(52, 53)

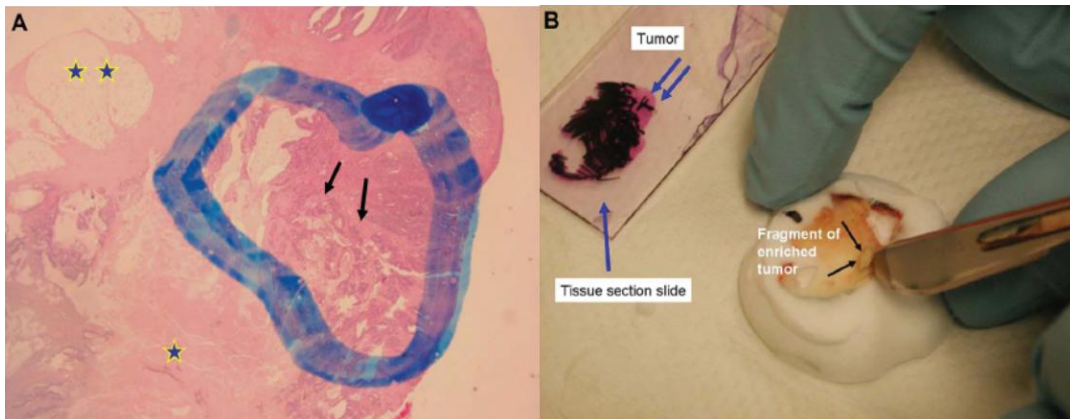
แม้ว่าบทบาทของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในการบอพยากรณ์โรค อาจยังมีข้อโต้แย้งอยู่ในปัจจุบัน แต่การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนนี้ มีบทบาทสำคัญในการเลือกวิธีการรักษาของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในระยะแพร่กระจายของโรค โดยพบว่าการรักษาด้วยยาที่มุ่งเป้าไปที่การยับยั้งการทำงานของ EGFR (EGFR-targeting agents) ทำให้ก้อนมะเร็งไม่สามารถส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ ให้เกิดการเจริญเติบโตได้ นำมาซึ่งการตายของก้อนมะเร็งในที่สุด แต่การรักษาด้วยยานี้ จะไม่ได้ผลในมะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ที่จะไม่สามารถควบคุมจากสัญญาณที่ส่งผ่านมาจากการกระตุ้นที่ผิวเซลล์ได้ สนับสนุนจากหลายการศึกษาที่พบว่ามะเร็งที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราสจะตอบสนองต่อยาต้าน EGFR น้อย, มีระยะเวลาการรอดชีวิตและโรคสงบที่สั้นลง เมื่อรักษาด้วยยา cetuximab และ panitumumab^(55, 56) ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

บทที่ 5

การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation testing)

5.1 ขั้นตอนการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

ชิ้นเนื้อที่ใช้สำหรับการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ส่วนใหญ่ได้มาจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดหรือตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัย โดยการสกัดดีเอ็นเอ มักได้มาจากชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block) หลังจากนั้นพยาธิแพทย์จะช่วยเลือกส่วนของชิ้นเนื้อที่มีปริมาณของมะเร็งที่มากที่สุด นำมาตัดแบ่งเป็นสไลด์ และทำการย้อมสี H&E ต่อไป ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ⁽⁵⁷⁾

(A) แสดงพยาธิแพทย์ทำการเลือกส่วนของชิ้นเนื้อที่มีปริมาณมะเร็งอยู่มากที่สุด (ลูกศร) เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อตาย (ดาว 1 ดวง) และส่วนที่ไม่ใช่มะเร็ง (ดาว 2 ดวง) (B) แสดงชิ้นเนื้อที่นำมาตัดแบ่งเป็นสไลด์จากบริเวณที่เลือกไว้ในรูป (A) (ลูกศรสีน้ำเงิน 1 เส้น) รวมทั้งสามารถเลือกจากชิ้นเนื้อที่มองเห็นก้อนมะเร็งได้ชัดเจนจากชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (ลูกศรสีดำ)

5.2 วิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนโคราอส

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนโคราอสมากกว่า 60 วิธี ส่วนใหญ่ใช้วิธีการหาลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป (sequencing methods) ซึ่งถือเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐาน วิธีอื่นๆ ได้แก่ high-resolution melting analysis (HRM), single-strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), array/strip analysis, และ allele-specific PCR

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีการหาลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป (Sequencing methods) ซึ่งมีอยู่ 2 วิธีคือการหาลำดับเบสโดยตรงแบบแซงเกอร์ (Sanger sequencing) และวิธีไพโรซีควนซิง (pyrosequencing)

การหาลำดับเบสโดยตรงแบบแซงเกอร์ ถือเป็นารตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นมาตรฐาน เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจหาที่สามารถบอกชนิดการกลายพันธุ์ได้ สามารถบอกความผิดปกติในระดับพันธุกรรมเล็กๆได้ และใช้เป็นารตรวจยืนยันวิธีการตรวจอื่นๆ

5.2.1 การหาลำดับเบสโดยตรงแบบแซงเกอร์ (Sanger sequencing)⁽⁵⁸⁾

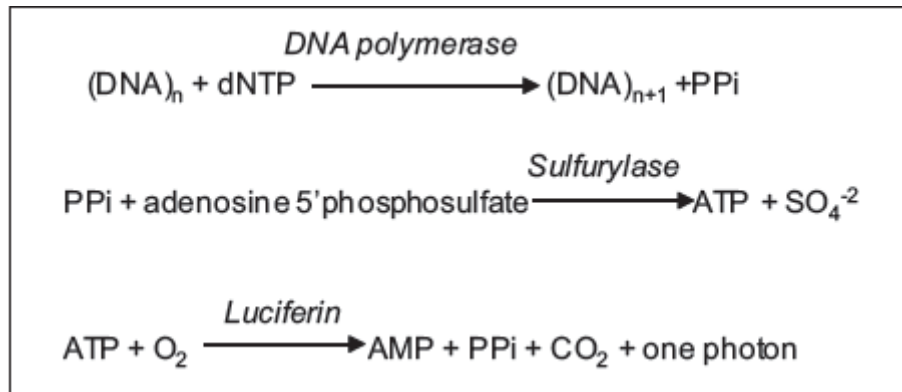
คิดค้นในปี ค.ศ. 1975 โดย Frederick Sanger นักชีวเคมีชาวอังกฤษ และได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมีในปี ค.ศ. 1980 การหาลำดับเบสโดยตรงแบบแซงเกอร์ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า dideoxy method หรือ chain-termination method ใช้หลักการการสร้างเบสคู่สมโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งจะสร้างเบสนิวคลีโอไทด์ 2 รูปแบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ 2'-deoxy form (dNTP) และ 2',3'-dideoxynucleotide (ddNTP) แต่ละนิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วยเบส 4 ตัว (A, T, G, C) และจะติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน 4 ชนิด (fluorophores) จึงสามารถอ่านลำดับเบสโดยการตรวจหาสารเรืองแสงด้วยระบบเลเซอร์ โดยทั่วไปวิธีนี้มีความแม่นยำสูง พบความผิดพลาดน้อยกว่าร้อยละ 1, สามารถหาลำดับเบสได้มากถึง 800 เบสในเวลาเดียวกัน ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนโคราอส ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ จำเป็นต้องมีปริมาณดีเอ็นเอของมะเร็งที่มากพอจะสามารถตรวจหาการ

กลายพันธุ์ได้ อย่างน้อยร้อยละ 15-50 เนื่องจากการเพิ่มของปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็ง จะรบกวนการแปลผล

5.2.2 วิธีไฟโรซีควนซิง (pyrosequencing) ⁽⁵⁹⁾

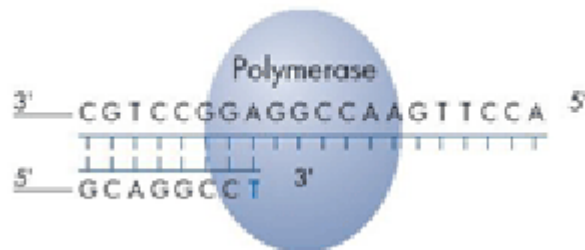
เป็นวิธีหาลำดับเบสโดยการวัด inorganic pyrophosphate (PPi) ที่ถูกปลดปล่อยออกมา จากการทำปฏิกิริยา การเติมเบสคู่สม (complementary base) กับดีเอ็นเอต้นแบบหรือ primer โดยเอนไซม์ DNA polymerase จะทำการสร้างสายดีเอ็นเอจาก primer และปฏิกิริยาจะหยุดลง เมื่อถึงเบสที่ไม่เป็นเบสคู่สมกัน ปริมาณของ PPi ที่ถูกปลดปล่อยออกมา จะเป็นสัดส่วนเดียวกับ ปริมาณของเบสคู่สมที่ถูกใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะรวมกับ adenosine 5'phosphosulfate และเปลี่ยนไปเป็น ATP โดยใช้เอนไซม์ sulfurylase หลังจากนั้นจะถูกย่อยสลายเป็นโฟตอนจาก ปฏิกิริยา luciferin ซึ่งปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้ จะสามารถวัดได้ด้วยเครื่อง photomultiplier tube, avalanche photodiode, หรือ charge-coupled device camera ดัง แสดงในรูปที่ 15

ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ สามารถตรวจหาลำดับเบสได้เพียง 40-50 เบส แต่มีข้อดีคือสามารถ ตรวจหาการกลายพันธุ์ แม้มีปริมาณดีเอ็นเอของมะเร็งเพียง ร้อยละ 1.25-6 เท่านั้น จึงเพิ่มความ ไวของการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแคราส ที่อาจถูกเจือจางจากส่วนของเนื้อเยื่อที่เป็น KRAS wild type เช่นในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่มีภาวะ microsatellite instability หรือมีการ อักเสบเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นการแปลผลด้วยวิธีไฟโรซีควนซิงจากการตรวจจับแสง มีความ แม่นยำมากกว่าการแปลผลด้วยวิธีแซงเกอร์ ที่ใช้การดูสีที่แตกต่างกันของ fluorophore ซึ่งอาจ คลาดเคลื่อนได้ในกรณีมีสัญญาณเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 15 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบไฟโรซีควอนซิง⁽⁵⁷⁾

ขั้นตอนที่ 1 การเติมนิวคลีโอไทด์เบสที่เป็นเบสคู่สม (dNTP) กับดีเอ็นเอต้นแบบหรือ Primer ดังรูปที่ 16 จะเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ DNA polymerase เมื่อเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอขึ้น inorganic pyrophosphate (PPi) จะถูกปลดปล่อยออกมา แต่ถ้าไม่ใช่เบสคู่สมกัน จะถูกทำลายโดยเอนไซม์ apyrase

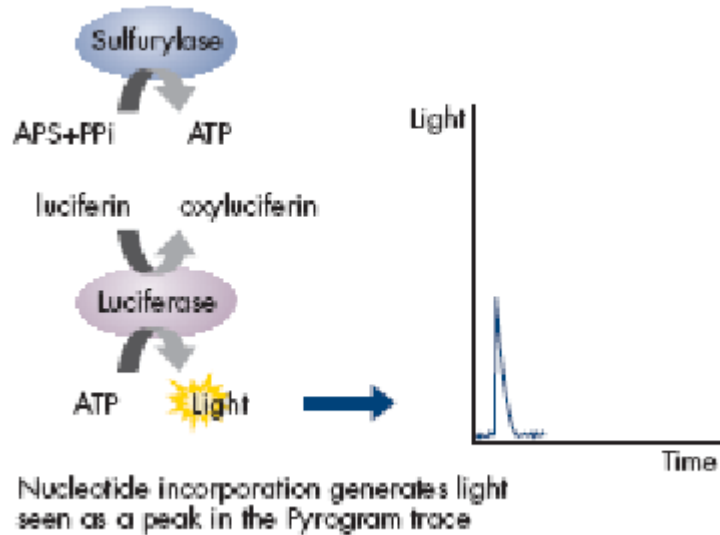


รูปที่ 16 แสดงการเติมนิวคลีโอไทด์เบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบหรือ primer โดยอาศัย DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา⁽⁶⁰⁾

ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยน PPi ไปเป็น ATP โดยเอนไซม์ ATP sulfurylase ซึ่งอาศัย adenosine 5' phosphosulfate (APS) เป็นสารตั้งต้น

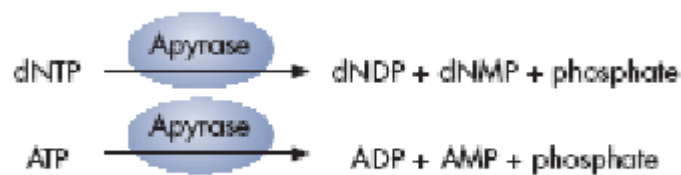
ขั้นตอนที่ 3 ATP ที่เกิดขึ้นจะใช้เป็นพลังงานของปฏิกิริยาการเปลี่ยน luciferin ไปเป็น oxyluciferin โดยใช้เอนไซม์ luciferase เกิดการสร้างแสงไฟตอนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ ATP ที่

เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 17 แสงที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจวัดด้วยเครื่องมือ photomultiplier tube, avalanche photodiode, or charge-coupled device camera



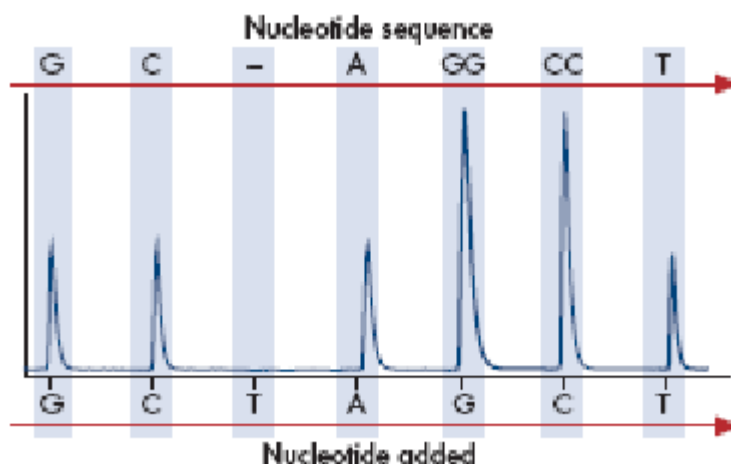
รูปที่ 17 แสดงปฏิกิริยาการเกิดแสงที่ได้จากปฏิกิริยา luciferase ⁽⁶⁰⁾

ขั้นตอนที่ 4 การทำลายนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้เป็นเบสคู่สมและ ATP ส่วนที่เกินซึ่งไม่ได้ถูกนำไปใช้โดยเอนไซม์ apyrase เมื่อมีการทำลายเสร็จสมบูรณ์แล้ว จะเกิดกระบวนการเติมนิวคลีโอไทด์ใหม่ขึ้นและเริ่มปฏิกิริยาค้างต่อไป ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงปฏิกิริยาการทำลายนิวคลีโอไทด์และ ATP โดยเอนไซม์ apyrase ⁽⁶⁰⁾

ขั้นตอนที่ 5 เมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปเรื่อยๆ นิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สม จะถูกนำไปใช้สร้างสายดีเอ็นเอ เกิดเป็นสัญญาณใน pyrogram trace ดังรูปที่ 19



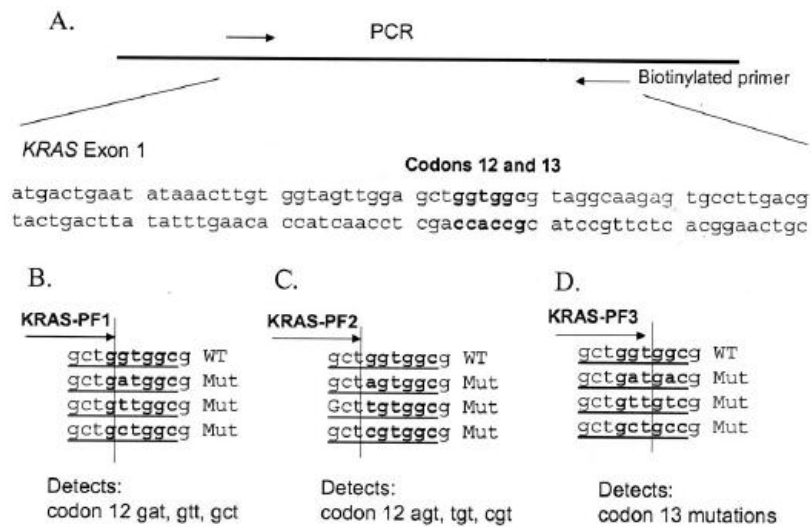
รูปที่ 19 แสดง pyrogram trace โดยความสูงของกราฟ ขึ้นกับปริมาณเบสคู่สมชนิดเดียวกันที่เกิดปฏิกิริยา⁽⁶⁰⁾

5.3 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแบบวิธีของโอกินิ⁽⁶¹⁾

ปัจจุบันองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ยังไม่ได้กำหนดวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่เป็นมาตรฐาน⁽⁶²⁾ ขึ้นกับห้องปฏิบัติการในแต่ละแห่ง

การศึกษาของ Ogino และคณะ⁽⁶¹⁾ ได้เปรียบเทียบวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแบบวิธีแซงเกอร์และวิธีไพโรซีควอนซิ่ง เนื่องจากในมะเร็งส่วนใหญ่ จะประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดทั้งที่เป็นเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง เช่นเซลล์ที่เป็นเนื้อเยื่อปกติ, เซลล์อักเสบ, เซลล์เส้นเลือด รวมทั้งเซลล์ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนก่อมะเร็ง (oncogene) อย่างในยีนเคราส จึงเป็นสิ่งที่ท้าทาย เนื่องจากจะมีส่วนที่เป็นเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ที่จะไม่มีการกลายพันธุ์รวมอยู่ อีกทั้งในเซลล์มะเร็งเอง ก็จะมีส่วนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในอีก allele หนึ่งด้วย และอาจเกิดปัญหานี้ได้มากในชิ้นเนื้อที่มีปริมาณเซลล์มะเร็งปนอยู่ไม่มาก หรือเป็นชิ้นเนื้อขนาดเล็ก

การศึกษานี้ ได้พัฒนาวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราสโดยวิธีไพโรซีควอนซิ่ง และได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในปัจจุบัน โดยเริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ PCR ดังแสดงในรูปที่ 20

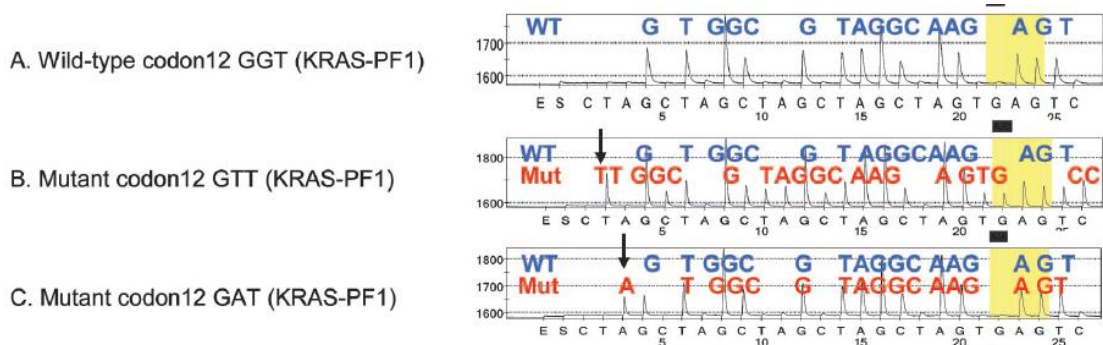


รูปที่ 20 แสดงการสร้างดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการตรวจไวรัสซีเควนซึ่ง

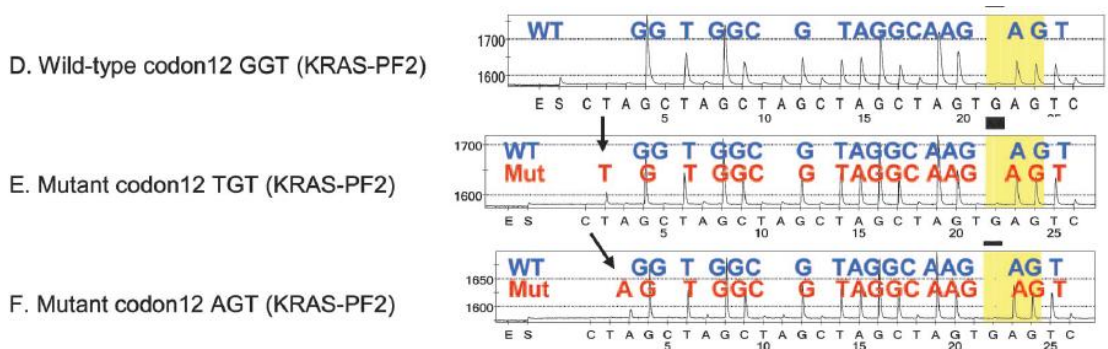
A. แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนแคราสที่ exon 1 ที่จะมีตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 โดยวิธี PCR B. แสดง primer ของ KRAS-PF1 เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่โคดอน 12 ชนิด c.35G>A (GAT), c.35G>T (GTT), และ c.35G>C (GCT) C. แสดง primer ของ KRAS-PF2 เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่โคดอน 12 ชนิดที่เหลือ AGT, TGT และ CGT D. แสดง primer ของ KRAS-PF3 เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่โคดอน 13 ชนิด GAC, GTC และ GCC

การใช้ primer ของ KRAS-PF1 (5'-tgt ggt agt tgg agc tg-3') จะสิ้นสุดที่นิวคลีโอไทด์ตัวแรกของโคดอน 12 ดังนั้นจึงเริ่มค้นหาการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวที่สองของโคดอน 12 สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนจากเบส G เป็น A [c.35G>A (codon 12 GAT)], จากเบส G เป็น T [c.35G>T (codon 12 GTT)] และจากเบส G เป็น C [c.35G>C (codon 12 GCT)] แสดงเป็นไฟโรแกรม ดังรูปที่ 21

ส่วนการใช้ primer KRAS-PF2 (5'-tgt ggt agt tgg agc t-3') จะสิ้นสุดที่นิวคลีโอไทด์ตัวที่สามของโคดอน 11 จึงเริ่มค้นหาการกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ตัวแรกของโคดอน 12 สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนจากเบส G เป็น A [c.34G>A (codon 12 AGT)], จากเบส G เป็น T [c.34G>T (codon 12 TGT)] และจากเบส G เป็น C [c.34G>C (codon 12 CGT)] แสดงเป็นไฟโรแกรม ดังรูปที่ 22

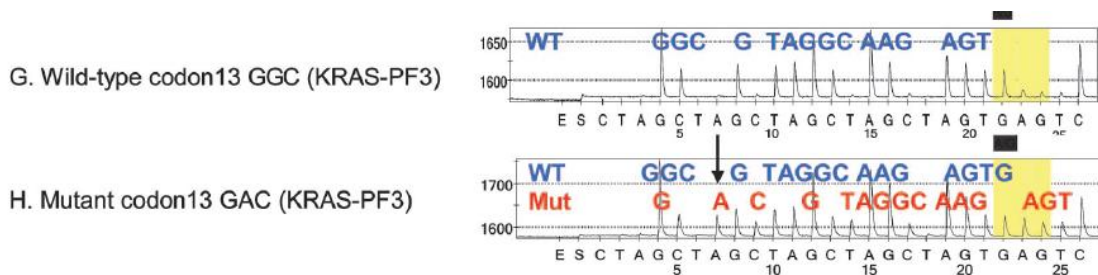


รูปที่ 21 แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF1



รูปที่ 22 แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF2

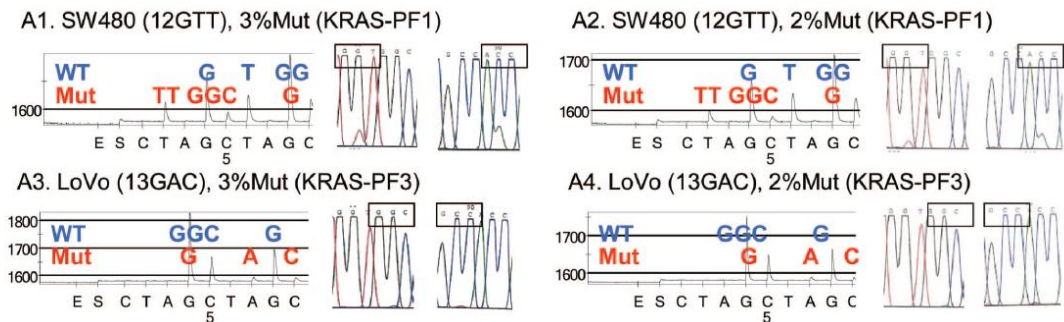
สุดท้ายการใช้ primer KRAS-PF3 (5'-tgg tag ttg gag ctg gt-3') จะสิ้นสุดที่นิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายของโคดอน 12 จึงเป็นการค้นหาการกลายพันธุ์ที่โคดอน 13 โดยเฉพาะการเปลี่ยนจากเบส G เป็น A [c.38G>A (codon 13 GAC)] แสดงเป็นไฟโรแกรมดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงไฟโรแกรมของการใช้ primer ชนิด KRAS-PF3

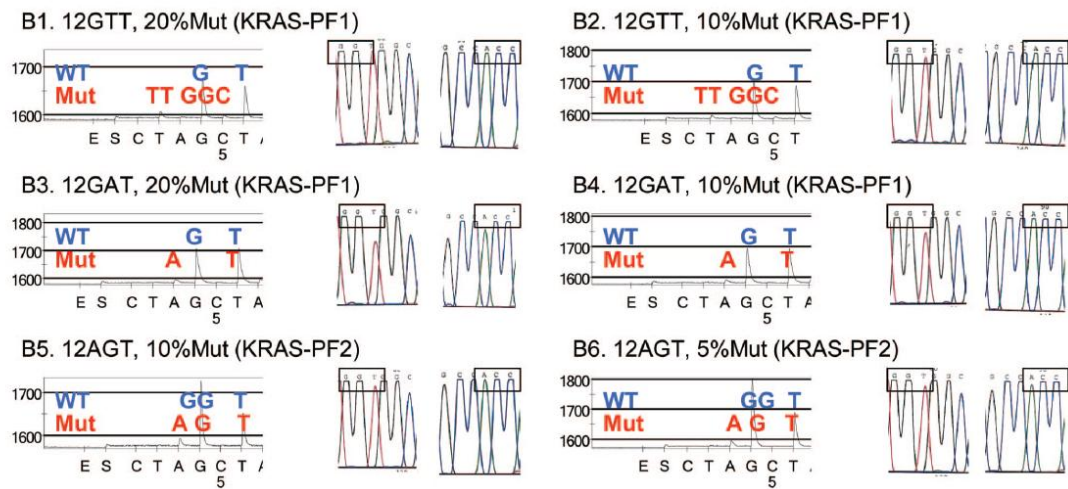
การศึกษานี้ยังได้เปรียบเทียบการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแควาสด้วยวิธีไพโรซีควอนซิงและวิธีของแซงเกอร์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงและชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วยฟอร์มาลิน และฝังไว้ในพาราฟิน ที่มีปริมาณเซลล์ที่ผสมกันระหว่างเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์และ ไม่มีการกลายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25

A. Cell line DNA mix



รูปที่ 24 แสดงการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง A1: การกลายพันธุ์แบบ c.35G>T (codon 12 GTT) ในเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ร้อยละ 3 สามารถตรวจได้ในทั้งสองวิธี (ซ้าย:วิธีไพโรซีควอนซิง, ขวา:วิธีแซงเกอร์) A2: การกลายพันธุ์แบบ c.35G>T (codon 12 GTT) ในเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ ร้อยละ 2 สามารถตรวจได้ง่ายด้วยวิธีไพโรซีควอนซิง แต่ตรวจได้ยากด้วยวิธีแซงเกอร์ A3 และ A4: การกลายพันธุ์แบบ c.38G>A (codon 13 GAC) สามารถตรวจได้ด้วยวิธีไพโรซีควอนซิง แต่ไม่สามารถตรวจได้แบบแซงเกอร์ ทั้งในเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ร้อยละ 3 และ 2

B. Paraffin colon tumor DNA mix



รูปที่ 25 แสดงการศึกษาในชิ้นเนื้อที่ตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟินในมะเร็งลำไส้ใหญ่

B1 และ B2: การกลายพันธุ์แบบ c.35G>T (codon 12 GTT) สามารถตรวจได้ด้วยวิธีไพโรซีควอนซิง แต่ไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีแซงเกอร์ ทั้งในชิ้นเนื้อที่มีการกลายพันธุ์ร้อยละ 20 และ 10 B3 และ B4: การกลายพันธุ์แบบ c.35G>A (codon 12 GAT) B5 และ B6: การกลายพันธุ์แบบ c.34G>A (codon 12 AGT) สามารถตรวจได้ด้วยวิธีไพโรซีควอนซิงเท่านั้น

บทที่ 6

วิธีดำเนินการวิจัย

6.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบย้อนหลัง (Observational Analytic Retrospective Cohort Study)

6.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

6.2.1. ประชากร (Population) และ ตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) หมายถึง ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งแอมพูลารีเรีย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) หมายถึง ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งแอมพูลารีเรียที่ได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ.2549 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ.2555 และมีชิ้นเนื้อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา โดยมีกฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามารับการศึกษาและตัดออกจากการศึกษา ดังนี้

6.2.2. เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

6.2.2.1 เป็นผู้ป่วยมะเร็งแอมพูลารีเรียที่ได้รับการวินิจฉัยในช่วงเวลาดังกล่าวและสามารถตามประวัติเวชระเบียนได้

6.2.2.2 ได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

6.2.2.3 มีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่เพียงพอที่จะสามารถนำมาตรวจเพิ่มเติมเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีนคราสได้ และมีอายุของชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ไม่เกิน 5 ปี

6.2.3. เกณฑ์ในการคัดเลือกรออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

6.2.3.1 โรคทางพันธุกรรมในกลุ่ม Familial polyposis syndrome

6.2.3.2 ประวัติเป็นเนื้องอกของแอมพูลารีเรียมาก่อน

6.2.4. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

เนื่องจากการศึกษาถึงความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรียในผู้ป่วยไทย เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดยนพ.วิวัฒน์ จิตต์ผิงงาม ที่ผ่านมาแทน ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 22

ได้ใช้ค่าดังกล่าวแทน $P = 0.2$, $1-P = Q = 0.8$

กำหนดให้ความเชื่อมั่นที่ 95%

ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ประมาณ $\pm 10\%$ (d)

$$\begin{aligned} \text{คำนวณหาขนาดตัวอย่างจากสูตร } N &= Z_{\alpha}^2 P Q / d^2 \\ &= (1.96)^2 (0.2) (0.8) / (0.1)^2 \\ &= 61 \end{aligned}$$

แต่เนื่องจากอาจมีข้อจำกัดในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแคราสจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่เก็บไว้ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของชิ้นเนื้อ จึงวางแผนเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากที่คำนวณไว้ร้อยละ 25 เป็น 80 ราย

6.2.5 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

6.2.5.1. ตัวแปรการวิจัย

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนแคราส คิดเป็นร้อยละ

6.2.5.2. เครื่องมือที่ใช้ในการวัด

1) ข้อมูลจากเวชระเบียน เก็บข้อมูลของผู้ป่วยด้วยใบบันทึก (Record Form)

2) Mutation analysis: Pyrosequencing method

6.2.6 การเตรียม DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

6.2.6.1. นำชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่ได้รับการทำ Microdissection มาทำการแยกเซลล์

ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml.

6.2.6.2. จากนั้นเติม Lysis buffer II (950:50) 10% Sodium Sulphate 200-400 uL เพื่อเป็นการย่อยสลาย เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) จากนั้นใส่ Proteinase K 5-10 uL และนำไปใส่ไว้ในเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 50 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

6.2.6.3. เติม phenol chloroform ปริมาตร 2 เท่าของชิ้นเนื้อ จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที ปั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูส่วนของที่ใสในหลอดทดลองอีกอันหนึ่ง

6.2.6.4. เติม 3 M Sodium Acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด ร่วมกับ 100% Ethyl Alcohol 500 uL เพื่อเป็นการตกตะกอน DNA จากนั้นใส่ glycogen 1 uL และ นำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ -20 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

6.2.6.5. นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่น (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนบนทิ้ง

6.2.6.6. ใส่ 70% Ethyl alcohol 500uL และนำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

6.2.6.7. เติม Tris EDTA 50 uL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ DNA ของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่พร้อมทำการตรวจ Pyrosequencing ต่อไป

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนแคราสในการศึกษานี้ใช้วิธีการไพโรซีควนซิ่งเทคนิค (Pyrosequencing technique) ในตำแหน่งที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่ามี การกลายพันธุ์ของยีนแคราสคือ ตรวจการกลายพันธุ์ในตำแหน่งโคดอนที่ 12 และ 13 และเข้าสู่ขั้นตอนของ DNA sequencing ต่อไป (สถานที่ทำการตรวจการหาการกลายพันธุ์ หน่วย Gene Pro ตึกอปร.ชั้น 9 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

6.3. การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ขั้นเตรียมการ

6.3.1. ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับมะเร็งชนิด แอมพลูเรีย และความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

6.3.2. ศึกษาระเบียบของการวิจัย และทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการวิจัยด้านผลลัพธ์ทางการแพทย์และวิธีการตรวจด้วยไฟโรซีควอนซิงเทคนิค

6.3.3. เสนอโครงร่างงานวิจัย และขอความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนดำเนินการ

6.3.4. รวบรวมรายชื่อผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งชนิด แอมพลูเรีย ตามรหัสโรค ICD10 ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และสถาบันอื่นๆ ในช่วงระยะเวลาที่กำหนด

6.3.5. รวบรวมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งชนิด แอมพลูเรีย จากข้อมูลของภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และสถาบันอื่นๆ

6.3.6. เก็บข้อมูลจากเวชระเบียน โดยใช้แบบบันทึกข้อมูล (case record form) โดยผู้วิจัยเป็นผู้บันทึก ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย, อาการและอาการแสดง, ภาวะแทรกซ้อนที่พบทั้งก่อนและระหว่างการรักษา, ขนาดและตำแหน่งของก้อนเนื้อออก ความสามารถในการผ่าตัดได้, การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด การตอบสนองต่อการรักษา และระยะเวลารอดชีวิต

6.3.7. ส่งรายชื่อและรวบรวมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาให้แก่พยาธิแพทย์

6.3.8. พยาธิแพทย์ตรวจสอบและกำหนดขอบเขตของชิ้นเนื้อที่มีส่วนของมะเร็งชนิด แอมพลูเรีย ที่มากที่สุดหรือมากกว่าร้อยละ 30 ในสไลด์ที่ย้อมด้วยวิธี H&E หลังจากนั้นส่งตัดชิ้นเนื้อในส่วนที่ทำการตรึงด้วยฟอร์มาลิน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block) จำนวน 5-10 สไลด์เพื่อให้ได้จำนวนของเนื้อเยื่อในส่วนของมะเร็งมากที่สุด

6.3.9. ส่งขึ้นเนื้อที่ผ่านการตัดเป็นสไลด์และส่วนที่กำหนดขอบเขตแล้ว มาเข้าสู่ขั้นตอนของการเตรียม ดีเอ็นเอ

6.3.10. ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนคราสด้วยวิธีไพโรซีควนซึ่งเทคนิคในตำแหน่ง codon ที่ 12 และ 13, แปลผลการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ

6.3.11. ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษาคจะถูกบันทึกลงบนแบบบันทึกข้อมูลและจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยผู้ทำการวิจัยจะเป็นผู้รวบรวม

6.4. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรม SPSS version 17

6.4.1. Primary endpoint ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งแอมพูลารี

6.4.2. Secondary endpoint ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งแอมพูลารีกับการพยากรณ์ของโรค และรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนคราสในมะเร็งแอมพูลารีที่ตำแหน่งโคดอนที่ 12

6.4.3. การสรุปข้อมูล (Summarization of Data)

หากข้อมูลเป็น Categorical data จะสรุปข้อมูลในรูปของ proportion หรือ percent

หากข้อมูลเป็น Continuous data จะสรุปข้อมูลในรูปของ mean และ standard error

6.4.4. การนำเสนอข้อมูล (Data presentation)

ตาราง (Table) และกราฟ (Graph)

6.4.5. การทดสอบสมมติฐาน (Hypothesis testing)

ทดสอบความแตกต่างของความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคราสโดยใช้ Chi-square

ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิด แอมพูลารีรี่ กับ การพยากรณ์ของโรคโดยใช้ univariate survival analyses ด้วยวิธี Kaplan-Meier และ log-rank

6.5. ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

เนื่องจากการศึกษาโดยการนำชิ้นเนื้อมะเร็งชนิด แอมพูลารีรี่ ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาไปแล้วมาทำการตรวจพิเศษทาง molecular genetic ด้วยวิธี ไพโรซีควอนซิ่ง ซึ่งจะไม่มีการกระทบต่อการรักษาที่ผ่านมาแล้วของผู้ป่วยแต่อย่างใด

6.6. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

การวิจัยนี้มีข้อจำกัดในเทคนิคการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เพื่อหาการกลายพันธุ์ของ ยีนเคราส เนื่องจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังกล่าวในประเทศไทย ยังเป็นเพียงการทดลอง ในงานวิจัยเท่านั้น แต่การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสของหน่วย Gene Pro คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีความพร้อมทั้งในเรื่องของห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญเพียงพอในการทำการปฏิบัติการในด้าน mutation analysis รวมถึงมาตรฐานในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

ปัญหาในเรื่องจำนวนผู้ป่วยและชิ้นเนื้อซึ่งนำมาตรวจอาจไม่เพียงพอกับขนาดตัวอย่างที่ ต้องการ (Sample size) เนื่องจากอุบัติการณ์ของมะเร็งชนิด แอมพูลารีรี่ ค่อนข้างน้อย แต่จาก การวิจัยนี้เป็นศึกษาแบบย้อนหลัง และการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส สามารถใช้ชิ้น เนื้อทางพยาธิวิทยาที่ทำการตรึงด้วยฟอร์มาลีน และฝังไว้ในพาราฟิน FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded tissue block) ได้ จึงสามารถใช้ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่เก็บรักษาไว้ใน ภาควิชาพยาธิวิทยา ย้อนหลังได้ประมาณ 3-5 ปี อีกทั้งยังสามารถใช้ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาจาก สถาบันอื่นๆมาศึกษาร่วมด้วยได้

6.7. การบริหารงานวิจัยและตารางปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)

การดำเนินการ	2554		2555												2556			
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. การเตรียมงาน	0	0																
2. เก็บข้อมูล Pyrosequencing study อ่านผล mutation			0	0	0	0	0	0	0	0	0							
				0		0		0		0								
				0		0		0		0								
3. รวบรวมข้อมูล				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4. วิเคราะห์ข้อมูล															0	0		
5. เรียบเรียงการนำเสนอ ข้อมูล																0	0	0

6.8. งบประมาณ (Budget)

แหล่งทุนวิจัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยา เป็นผู้สนับสนุน
ค่าใช้จ่ายในการตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ

ค่า Pyrosequencing (1,000 บาท/ ครั้ง)	80,000	บาท
ค่า Primer	100,000	บาท
ค่าเตรียมเอกสาร	5,000	บาท
รวม	185,000	บาท

บทที่ 7

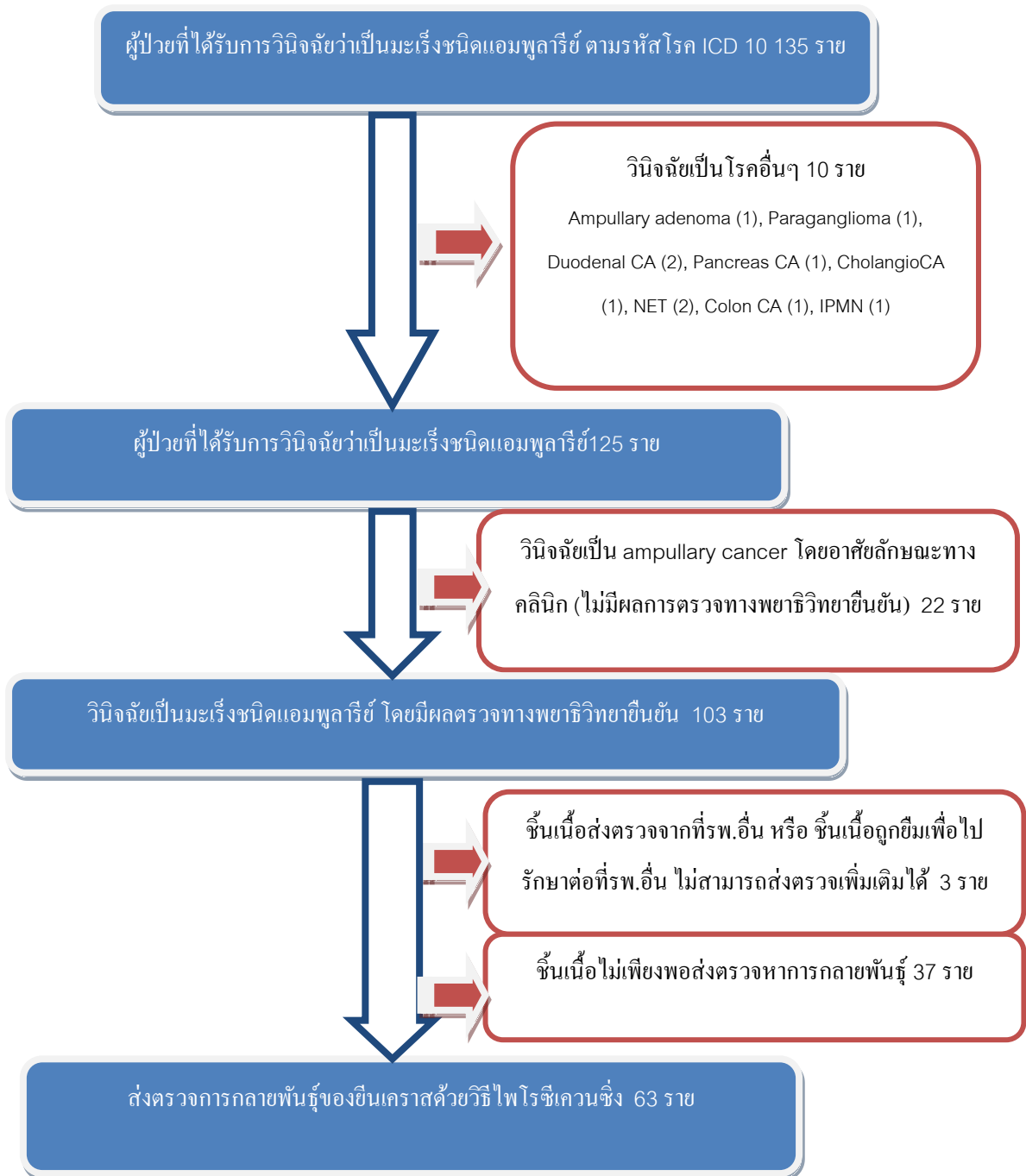
ผลการศึกษา

7.1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา (Baseline patient characteristics)

ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ.2549 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ.2555 และได้รับการวินิจฉัยตามรหัสโรค ICD10 จำนวน 135 ราย แต่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา 63 ราย โดยผู้ป่วยจำนวน 72 ราย ที่คัดออกจากการศึกษาด้วยเหตุผลต่างๆได้แก่ วินิจฉัยเป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่มะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ 10 ราย (1 รายเป็นเนื้องอกของ ampulla, 1 รายเป็นมะเร็งตับอ่อน, 2 รายเป็นมะเร็งของลำไส้เล็กส่วนต้น, 1 รายเป็นมะเร็งของท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลาย, 5 รายเป็นมะเร็งชนิดอื่นๆ), วินิจฉัยมะเร็งชนิด แอมพูลารีรี่ จากลักษณะอาการทางคลินิก โดยที่ไม่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยายืนยัน 22 ราย, ไม่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่สามารถส่งตรวจหาค่าการกลายพันธุ์ต่อได้ 3 ราย, และชิ้นเนื้อไม่เพียงพอที่จะสามารถส่งตรวจหาค่าการกลายพันธุ์ได้ 37 ราย ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา 63 ราย ค่ามัธยฐานอายุ 64 ปี (ค่าพิสัย 35-85 ปี) เพศชาย 31 ราย (ร้อยละ 49.2) เพศหญิง 32 ราย (ร้อยละ 50.8) EGO performance status 0-1 54 ราย (ร้อยละ 85.7) มีโรคประจำตัว 32 ราย (ร้อยละ 50.8) ได้แก่ ความดันโลหิตสูง 20 ราย (ร้อยละ 62.5), เบาหวาน 12 ราย (ร้อยละ 38.7), ไขมันในเลือดสูง 11 ราย (ร้อยละ 35.5) และมีเพียง 1 รายที่มีประวัติเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย (ร้อยละ 3.2) ส่วนใหญ่ไม่มีประวัติโรคมะเร็งในครอบครัว 54 ราย (ร้อยละ 85.7) และไม่มีประวัติ hereditary polyposis syndromes และเนื้องอกของ แอมพูลารีรี่ มาก่อน ส่วนใหญ่มาด้วยอาการตัวตาเหลือง 51 ราย, ปวดท้อง 30 ราย, ติดเชื้อของท่อทางเดินน้ำดี 15 ราย, อาการอื่นๆ ได้แก่ คลื่นไส้อาเจียน 5 ราย, เบื่ออาหารและน้ำหนักลด 38 ราย และไม่มีอาการ 2 ราย ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่มีอาการจนกระทั่งได้รับการวินิจฉัย เท่ากับ 3.15 ± 0.59 เดือน (ค่าพิสัย 0.10-24.64 เดือน) ดังตารางที่ 7

แผนภูมิที่ 2 ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 135 ราย (CONSORT diagram)



ตารางที่ 7 แสดงลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา 63 ราย (Baseline Characteristics)

Baseline Characteristics	Overall population (N = 63)
Median age, years (range)	64 (35-85)
Male, n (%)	31 (49.2)
Female, n (%)	32 (50.8)
ECOG PS 0-1, n (%)	54 (85.7)
ECOG PS 2, n (%)	6 (9.5)
Comorbidities, n (%)	32 (50.8)
•Hypertension, n (%)	20 (62.5)
•Diabetes mellitus, n (%)	12 (38.7)
•Dyslipidemia, n (%)	11 (35.5%)
•Other cancers, n (%)	1 (3.2)
No comorbidities, n (%)	30 (47.6)
No family history of cancer, n (%)	54 (85.7)
Duration of symptoms, mean \pm SE, months (range)	3.15 \pm 0.59 (0.10-24.64)
Smoking, n (%)	12 (19)
Alcohol drinking, n (%)	15 (23.8)
Clinical presentation, n (%)	
•Jaundice	51 (81)
•Abdominal pain	30 (47.6)
•Cholangitis	15 (23.8)
•Anorexia and weight loss	38 (60.3)
•Nausea/ vomiting	5 (7.9)
•Asymptomatic	2 (3.2)
Total bilirubin at diagnosis, mean \pm SE, mg/dl	7.91 \pm 1.22

ผู้ป่วยทุกรายได้รับการผ่าตัดแบบ Whipple's operation โดยมีระยะของโรคตาม TNM staging (AJCC 7th Edition, 2010) ดังนี้ stage IA, IB, IIA, IIB, III และ IV ร้อยละ 11.1, 12.7, 9.5, 28.6, 36.5 และ 1.6 ตามลำดับ ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ 1-2 (ร้อยละ 61.9) ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่า ส่วนใหญ่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 2 เซนติเมตร (ร้อยละ 66.7), histologic

grade แบบ well-moderately differentiated (ร้อยละ 95.2), lymphovascular invasion (ร้อยละ 52.4), negative surgical margin (ร้อยละ 84.1) และตรวจพบมีการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง (ร้อยละ 58.7) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลตรวจทางพยาธิวิทยา

Pathological characteristics	Overall N = 63
Pathological TNM stage, n (%)	
I/II	39 (61.9)
III/IV	24 (38.1)
T size, n (%)	
≤ 2 cm	21 (33.3)
> 2 cm	42 (66.7)
T stage, n (%)	
T1/T2	22 (34.9)
T3/T4	41 (65.1)
Histologic grade, n (%)	
Well/moderate differentiated	60 (95.2)
Poor/undifferentiated	3 (4.8)
Lymphovascular invasion, n (%)	
Absent	30 (47.6)
Present	33 (52.4)
Margin status, n (%)	
Negative	53 (84.1)
Positive	10 (15.9)
Lymph node status, n (%)	
Negative	26 (41.3)
Positive	37 (58.7)

ผู้ป่วยได้รับการรักษาเสริมหลังผ่าตัด (adjuvant treatment) 31 ราย (ร้อยละ 49.2) โดยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 12 ราย (ร้อยละ 38.7), ยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายแสง 18 ราย (ร้อยละ 58.1) และฉายแสงอย่างเดียว 1 ราย (ร้อยละ 3.2) โดยสูตรยาเคมีบำบัดที่ได้รับคือ Fluoropyrimidine 5 ราย และ Gemcitabine 7 ราย ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด (adjuvant treatment)

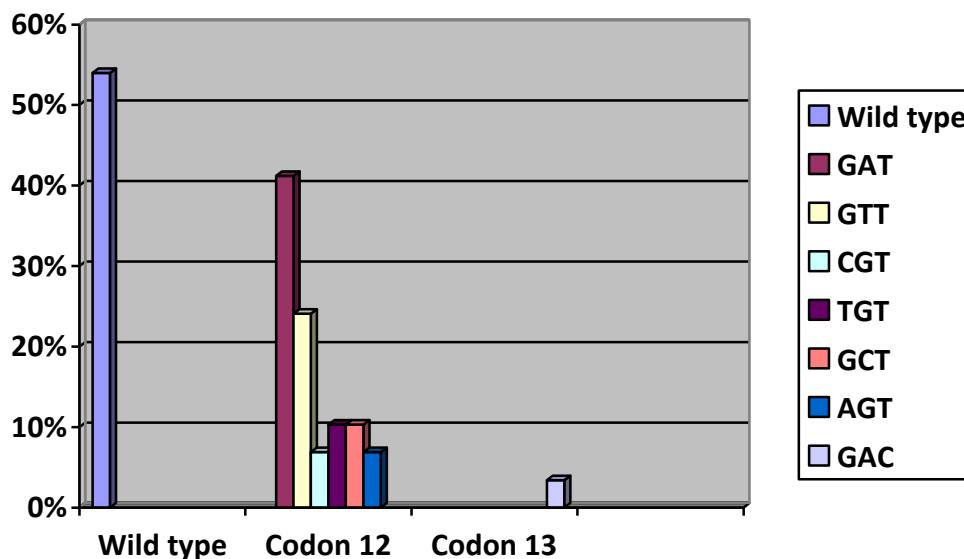
Adjuvant treatment	Overall population (N = 63)
Adjuvant treatment, n (%)	
• Yes	31 (49.2)
• No	32 (50.8)
Adjuvant modality, n (%)	
• Chemotherapy alone	12 (38.7)
• Chemoradiotherapy	18 (58.1)
• Radiotherapy alone	1 (3.2)
Chemotherapy regimen, n	
• Fluoropyrimidines	5
• Gemcitabine	7

7.2 ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลารี

ผู้ป่วยที่ทำการส่งตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 63 ราย พบว่า 34 รายที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras wild type) และ 29 รายที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส (K-ras mutation) คิดเป็นร้อยละ 46 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ นพ.วิวัฒน์ จิตต์พิวงาม ซึ่งตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 2 รายจาก 9 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 22.2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$)

โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 จำนวน 28 ราย (ร้อยละ 96.6) และตำแหน่งโคดอน 13 จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3.4) โดยพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส ดังแผนภูมิที่ 3

แผนภูมิที่ 3 แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13



โดยมีผู้ป่วย 1 รายที่พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 เป็น 2 แบบ คือ เปลี่ยนจาก GGT เป็น TGT และ GTT

ไม่พบความแตกต่างระหว่างลักษณะทางด้านคลินิกและพยาธิวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส จะมี ECOG performance status แย่กว่า, อยู่ในระยะโรคที่ 3-4, มี histologic grade แบบ poorly หรือ undifferentiated มีการกระจายของโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง และการผ่าตัดพบมี positive surgical margin มากกว่า กลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ดังตารางที่ 10 และ 11

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะทางด้านคลินิกของกลุ่มที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ของยีน
 เคราส

Clinical factors	KRAS mutation N = 29	KRAS wild type N = 34	P value
Median age, years (range)	64 (35-85)	64.5 (36-83)	0.63
Male, n (%)	16 (55.2)	15 (44.1)	0.38
Female, n (%)	13 (44.8)	19 (55.9)	
ECOG PS 0-1, n (%)	22 (75.9)	32 (94.1)	0.08
ECOG PS 2, n (%)	4 (13.8)	2 (5.9)	
Comorbidities, n (%)	15 (51.7)	17 (50)	0.78
Duration of symptoms, mean \pm SE, months (range)	2.63 \pm 0.59 (0.39-17.48)	3.57 \pm 0.96 (0.1-24.64)	0.44
Smoking, n (%)	4 (13.8)	8 (23.5)	0.43
Alcohol drinking, n (%)	7 (24.1)	8 (23.5)	0.83
Total bilirubin at diagnosis, mean \pm SE, mg/dl (range)	8.0 \pm 1.63 (0.43-29.32)	8.6 \pm 1.79 (0.23-42.82)	0.81

ตารางที่ 11 แสดงลักษณะทางด้านพยาธิวิทยาของกลุ่มที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน
เคราส

Pathological factors	K ras mutation N = 29	K ras wild type N = 34	P value
Pathological TNM stage, n (%)			0.12
▪ I/II	15 (51.6)	24 (70.6)	
▪ III/IV	14 (48.2)	10 (29.4)	
Tumor size, n (%)			0.21
▪ ≤ 2 cm	12 (41.4)	9 (26.5)	
▪ > 2 cm	17 (58.6)	25 (73.5)	
▪ Mean±SE, cm (range)	2.56±0.20 (1-5.4)	2.72±0.22 (0.5-5.7)	
T stage, n (%)			0.55
▪ T1/T2	9 (31.1)	13 (38.2)	
▪ T3/T4	20 (68.9)	21 (61.8)	
Histologic grade, n (%)			0.58
▪ Well/Moderately differentiated	27 (93.1)	33 (97.1)	
▪ Poorly/Undifferentiated	2 (6.9)	1 (2.9)	
Lymphovascular invasion, n (%)			0.36
▪ Absent	15 (51.7)	15 (44.1)	
▪ Present	14 (48.3)	19 (55.9)	
Margin status, n (%)			0.09
▪ Negative	22 (75.9)	31 (91.2)	
▪ Positive margin	7 (24.1)	3 (8.8)	
Lymph node status, n (%)			0.31
▪ Negative	10 (34.5)	16 (47.1)	
▪ Positive	19 (65.5)	18 (52.9)	

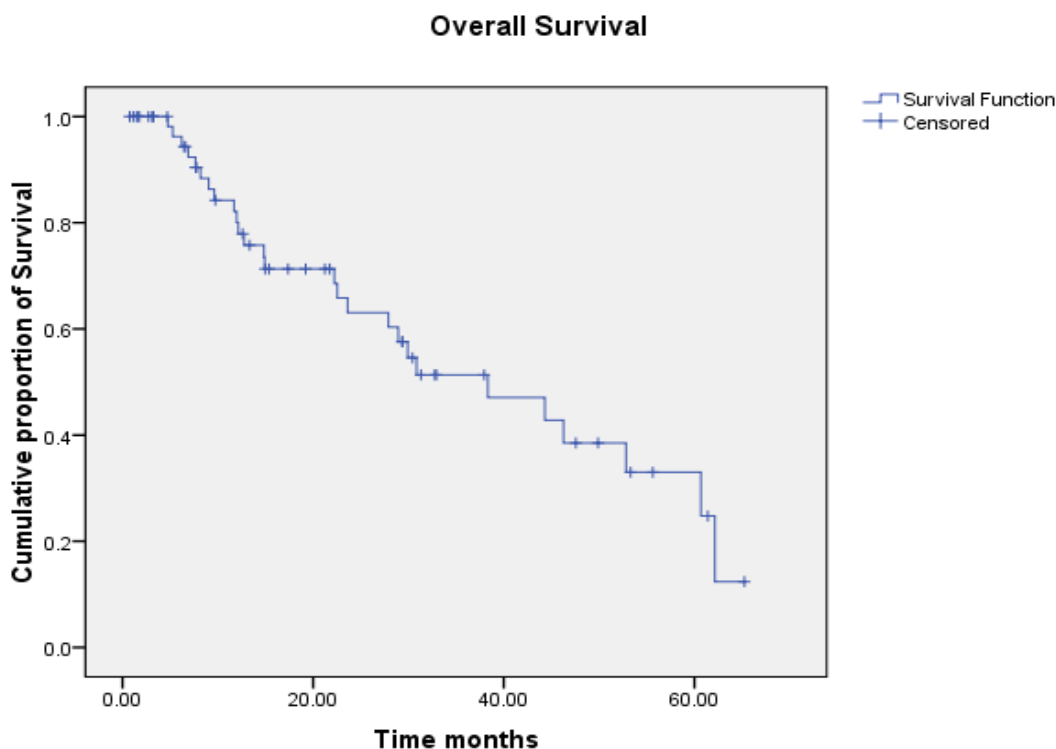
ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางด้านการรักษาเสริมหลังการผ่าตัดกับการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส พบว่า ไม่มีความแตกต่างเช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงการรักษาเสริมหลังการผ่าตัดของกลุ่มที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ของยีนเคราส

Adjuvant treatment	KRAS mutation N = 29	KRAS wild type N = 34	P value
Adjuvant treatment, n (%)			0.25
• Yes	12 (41.3)	19 (55.9)	
• No	17 (58.6)	15 (44.1)	
Adjuvant modality, n (%)			
• Chemotherapy alone	3 (25)	9 (47.4)	
• Chemoradiotherapy	8 (66.7)	10 (52.6)	
• Radiotherapy alone	1 (8.3)	0	
Chemotherapy regimen, n			
• Fluoropyrimidines	1	4	
• Gemcitabine	2	6	

7.3 การกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่กับการพยากรณ์ของโรค

โดยรวม ประชากรที่ศึกษา 63 ราย มีการตรวจติดตาม ที่ค่ามัธยฐานเท่ากับ 14.98 เดือน (ค่าพิสัย 0.76 – 65.25 เดือน) มีผู้ป่วยที่เสียชีวิต 27 ราย, มีผู้ป่วยที่มีโรคกำเริบ 4 ราย และผู้ป่วยที่มีชีวิตอยู่และโรคไม่กำเริบ 32 ราย โดยมีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต 38.34 เดือน (95% confidence interval 21.28 – 55.41) และมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ร้อยละ 24.8 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 4

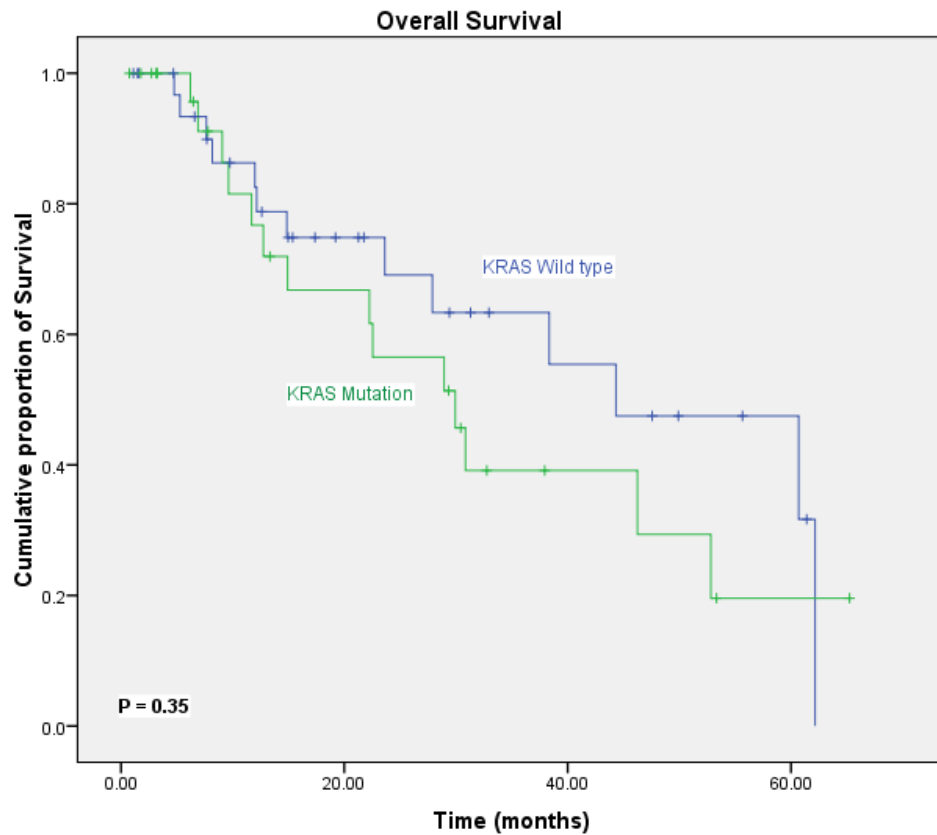


แผนภูมิที่ 4 แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพลารีย์ 63 ราย

ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส เท่ากับ 44.32 เดือน (95% confidence interval 21.50 – 67.14) และมีอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปี เท่ากับร้อยละ 31.7 โดยมีผู้ป่วยในกลุ่มนี้เสียชีวิต 13 ราย และยังมีชีวิตอยู่หรือขาดการติดตามนัด 21 ราย (ค่ามัธยฐานของการตรวจติดตาม อยู่ที่ 16.38 เดือน, ค่าพิสัย 1.12 – 62.16 เดือน)

ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 29.93 เดือน (95% confidence interval 19.36 – 40.49) และมีอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปี เท่ากับร้อยละ 19.6 โดยมีผู้ป่วยเสียชีวิตในกลุ่มนี้ 14 ราย และยังมีชีวิตอยู่หรือขาดการติดตามนัด 15 ราย (ค่ามัธยฐานของการตรวจติดตาม อยู่ที่ 13.34 เดือน, ค่าพิสัย 0.76 – 65.25 เดือน)

การมีชีวิตรอดของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.35$) แต่พบว่ากลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ดังแสดงในแผนภูมิที่ 5



แผนภูมิที่ 5 แสดง Kaplan-Meier survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ที่มีและ
ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส

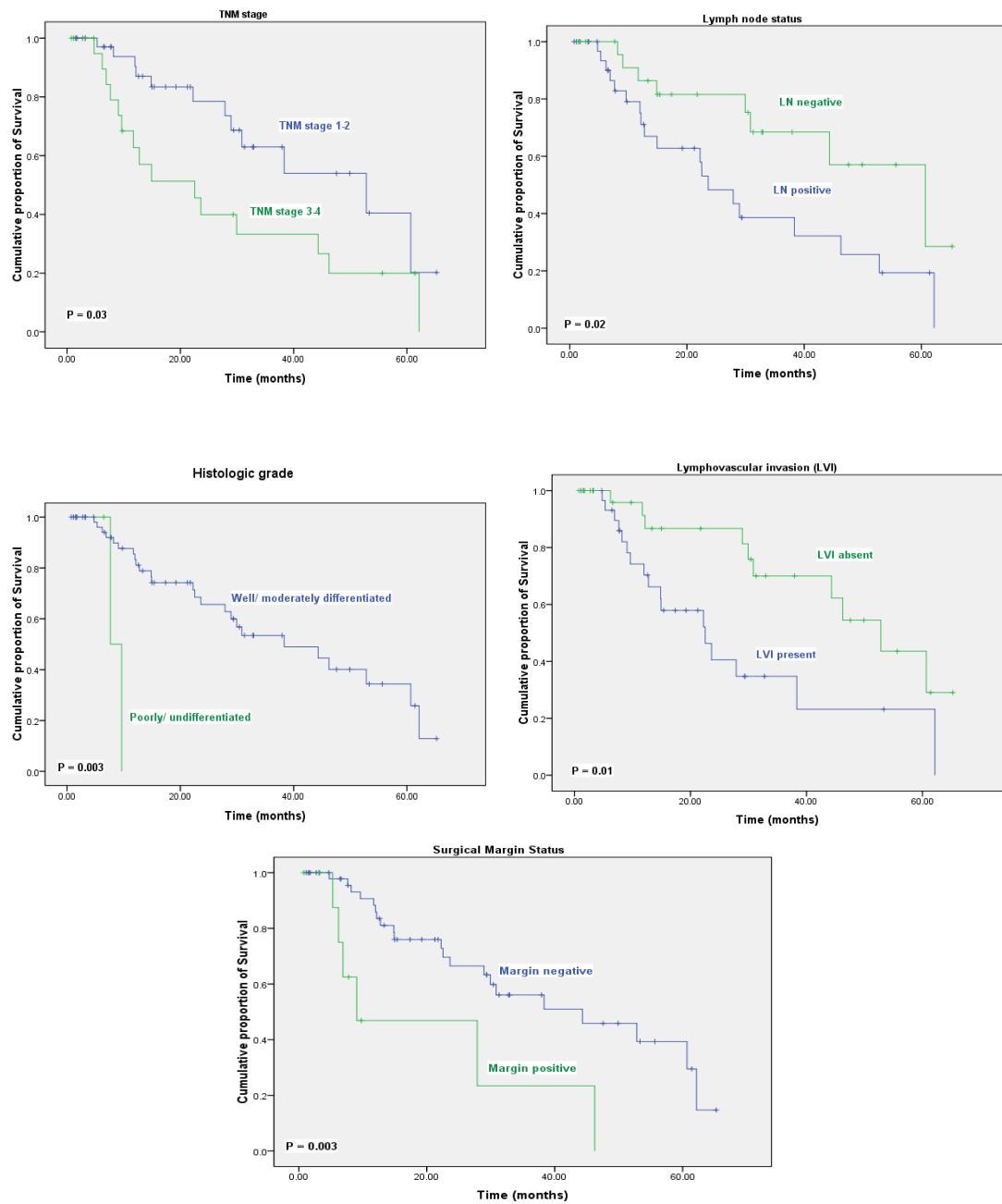
ปัจจัยที่พบว่ามีผลต่อการพยากรณ์โรคของมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ ได้แก่ TNM stage III-IV ($P=0.03$), poorly หรือ undifferentiated histologic grade ($P=0.003$), การกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ($P=0.02$), การมี lymphovascular invasion ($P=0.01$) และ positive surgical margin ($P=0.003$) ดังแสดงในตารางที่ 13 และแผนภูมิที่ 6

ตารางที่ 13 แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีร์ โดย
ใช้การวิเคราะห์แบบตัวแปรเดียว (Univariate analysis)

Parameter	N (%)	Median OS (months)	5-yr OS (%)	Log-Rank P value
Age				0.09
• ≤ 65 years	35 (56)	28.95	8.9	
• > 65 years	28 (44)	62.16	28.3	
Sex				0.34
• Male	31 (49)	29.93	20.1	
• Female	32 (51)	52.83	35.2	
TNM staging				0.03
• I/II	39 (61.9)	52.83	20.2	
• III/IV	24 (38.1)	22.54	20	
Tumor size				0.23
• ≤ 2 cm	21 (33)	52.83	38.7	
• > 2 cm	42 (67)	28.95	20.5	
T stage				0.19
• T1/T2	22 (34.9)	60.68	60.5	
• T3/T4	41 (65.1)	29.93	26.8	
Histologic grade				0.003
• Well/Moderately differentiated	60 (95.2)	38.34	25.8	
• Poorly/Undifferentiated	3 (4.8)	7.66	0	

ตารางที่ 13 (ต่อ) แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ โดยใช้การวิเคราะห์แบบตัวแปรเดียว (Univariate analysis)

Parameter	N (%)	Median OS (months)	5-yr OS (%)	Log-Rank P value
LN status				0.02
• Negative	26 (41.3)	60.68	28.5	
• Positive	37 (58.7)	23.62	19.3	
LVI				0.01
• Absent	30 (47.6)	52.83	29.1	
• Present	33 (52.4)	22.54	23.2	
Margin status				0.003
• Negative	53 (84.1)	44.32	29.5	
• Positive	10 (15.9)	9.07	0	
KRAS status				0.35
• Wild type	34 (53.97)	44.32	31.7	
• Mutation	29 (46.03)	29.93	19.6	



แผนภูมิที่ 6 แสดง Kaplan-Meier survival curve ตามปัจจัยทางด้านพยาธิวิทยาแบบการวิเคราะห์ตัวแปรเดียว (Univariate analysis)

เมื่อทำการวิเคราะห์แบบตัวแปรหลายตัว (Multivariate analysis) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคของมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ ได้แก่ poorly หรือ undifferentiated histologic grade (P=0.03), การมี lymphovascular invasion (P=0.02) และ positive surgical margin (P=0.009) ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารีรี่ โดยใช้การวิเคราะห์แบบตัวแปรเดียว (Univariate analysis) และแบบตัวแปรหลายตัว (Multivariate analysis)

Parameters	Univariate analysis	Multivariate analysis
TNM staging	0.03	0.12
Tumor size	0.23	0.89
Histologic grade	0.003	0.03
LN status	0.02	0.94
LVI	0.01	0.02
Margin status	0.003	0.009
KRAS status	0.35	0.64

นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์อัตราการอยู่รอดโดยปราศจากโรค (progression-free-survival, PFS) ร่วมด้วย และพบว่า ประชากรที่ศึกษาทั้งหมด 63 รายนั้น มีผู้ป่วยที่มีชีวิตอยู่และโรคไม่กำเริบ 32 ราย โดยมีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตโดยปราศจากโรค 17.38 เดือน (95% confidence interval 9.9 – 24.86) และ อัตราการรอดชีวิตโดยปราศจากโรคที่ 5 ปี อยู่ที่ร้อยละ 29

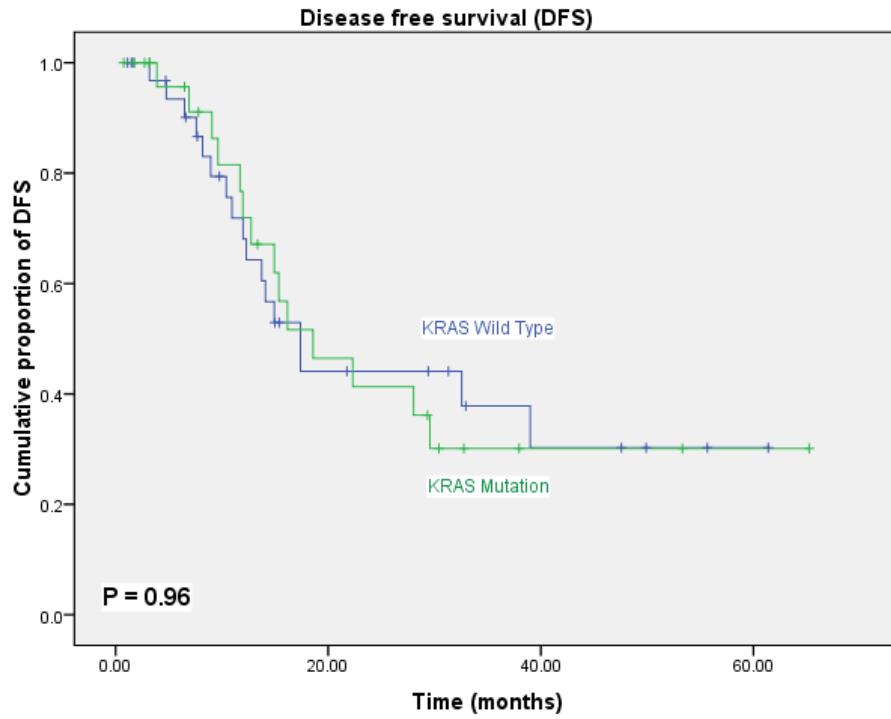
ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตโดยปราศจากโรค ในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส เท่ากับ 17.38 เดือน (95% confidence interval 12.37 – 22.39) และอัตราการรอดชีวิตโดยปราศจากโรคที่ 5 ปี เท่ากับร้อยละ 30.3 โดยมีผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีโรคกำเริบและหรือเสียชีวิต 17 ราย ส่วนใหญ่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ดังตารางที่ 15

ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตโดยปราศจากโรค ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส เท่ากับ 18.56 เดือน (95% confidence interval 8.76 – 28.37) และอัตราการรอดชีวิตโดยปราศจากโรคที่ 5 ปี เท่ากับร้อยละ 30.1 โดยมีผู้ป่วยมีโรคกำเริบ และหรือเสียชีวิตในกลุ่มนี้ 14 ราย ส่วนใหญ่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบกระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงรูปแบบการกลับเป็นซ้ำของโรค

Pattern of failure	Overall N = 63	KRAS mutation N = 29	KRAS wild type N = 34	P value
Loco-regional recurrence	1	1	0	
Distant metastasis	23	10	13	
Both	3	1	2	
Total	27	12	15	0.69

การมีชีวิตรอดโดยปราศจากโรคของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.96$) เช่นกัน ดังแสดงในแผนภูมิที่ 7



แผนภูมิที่ 7 แสดง Kaplan-Meier progression free survival curve ของผู้ป่วยมะเร็งชนิด
แอมพลูเรียที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ของยีนเคราส

บทที่ 8

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

8.1 สรุปผลการวิจัย

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลารีเยในการศึกษานี้ อยู่ที่ร้อยละ 46 ซึ่งสูงปานกลาง มีแนวโน้มว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราส จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกและพยาธิวิทยาที่ไม่ดี แต่การศึกษานี้ ยังไม่สามารถบอกการพยากรณ์โรคของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลารีเยได้ จำเป็นต้องติดตามผู้ป่วยต่อไป

8.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลารีเย ที่มีจำนวนผู้ป่วยมากเป็นอันดับสอง รองจากการศึกษาของ Howe และคณะ⁽⁷⁾ และถือเป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาในผู้ป่วยไทย รวมทั้งเป็นการศึกษาที่ใหญ่ที่สุดในประชากรเอเชียอีกด้วย พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส 29 รายจาก 63 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 46 ซึ่งพบสูงกว่าการศึกษาของ Howe และคณะ รวมทั้งการศึกษาก่อนหน้านี้ของ นพ.วิวัฒน์ จิตต์ผิงงาม ที่พบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ร้อยละ 37 และร้อยละ 22.2 ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) ส่วนการศึกษาอื่น ๆ ที่มีการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลารีเย ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 16 ซึ่งพบความชุกมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละการศึกษา ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 75 แต่การศึกษาล้วนใหญ่มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่น้อยและเทคนิคการตรวจที่แตกต่างกัน

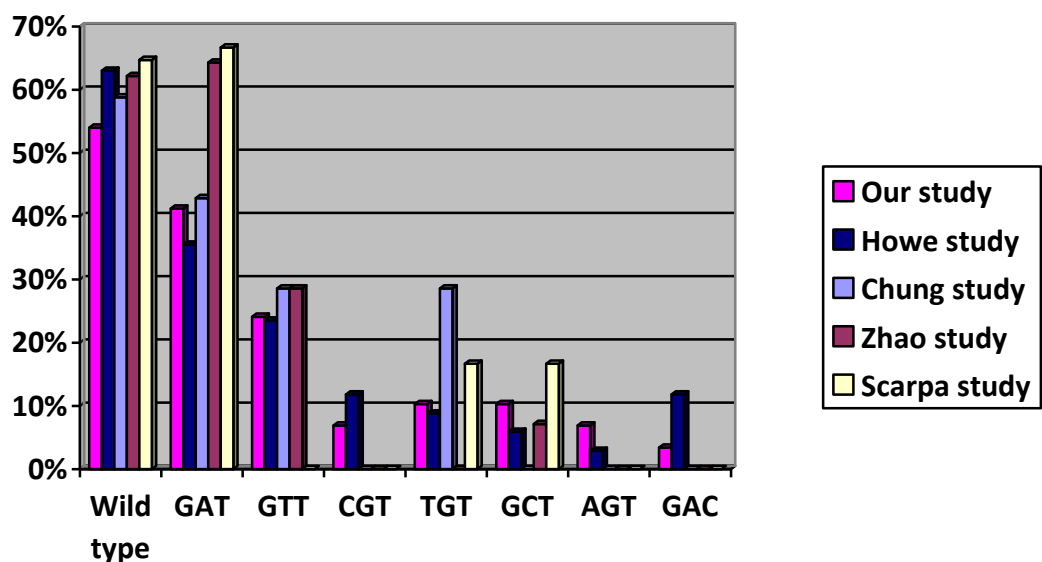
ตารางที่ 16 แสดงการศึกษาต่างๆที่ผ่านมาเกี่ยวกับความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน
 เคราสในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์

Study	No. of tumor	No. of mutation	% Mutations	Method
Motojima ⁽¹¹⁾ Japan	16	3	18.75	Allele specific PCR
Stork ⁽¹²⁾ USA	4	3	75	Allele specific PCR
Scarpa, 1993 ⁽¹³⁾ Italy	11	2	18.2	Direct sequencing
Scarpa, 1994 ⁽¹⁴⁾ Italy	17	6	35.3	Direct sequencing
Howe ⁽⁷⁾ USA	92	34	37	Allele specific PCR
Zhao ⁽¹⁵⁾ Japan	37	14	38	Direct sequencing
Chung ⁽⁶³⁾ Netherlands	17	7	41.2	Allele specific PCR
Rashid ⁽⁶⁴⁾ China	18	11	61.1	Direct sequencing
Wittawat Thailand	9	2	22.2	Pyrosequencing
This study Thailand	63	29	46	Pyrosequencing

เนื่องจากปัจจุบันองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ยังไม่ได้กำหนดวิธีการตรวจหา
 การกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่เป็นมาตรฐาน ⁽⁶²⁾ ขึ้นกับห้องปฏิบัติการในแต่ละแห่ง แต่มีการศึกษา
 ของ Ogino และคณะ ⁽⁶¹⁾ ได้เปรียบเทียบวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแบบวิธีแซงเกอร์

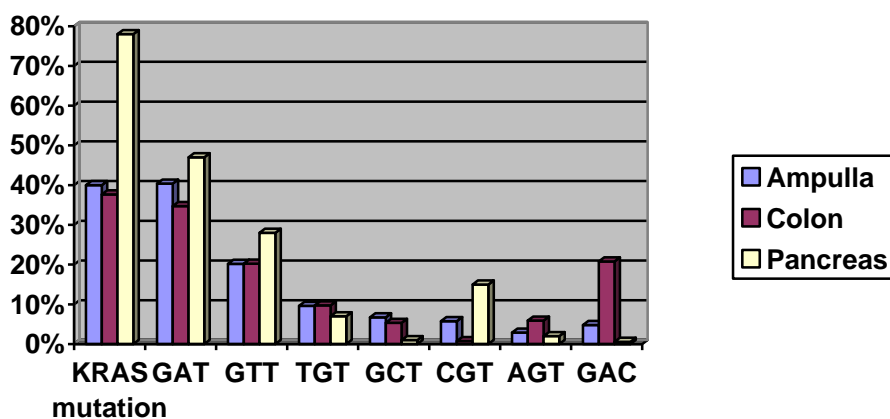
หรือ direct sequencing กับวิธีไพโรซีควอนซิง ในชั้นเนื้อมะเร็งที่มีส่วนที่เป็นเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง ที่ จะไม่มีการกลายพันธุ์และในเซลล์มะเร็งเอง ก็จะมีส่วนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในอีก allele หนึ่งปน อยู่ด้วย พบว่าวิธีไพโรซีควอนซิง สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่มีอยู่ในเซลล์มะเร็ง ร้อยละ 20 และ 10 ได้ทั้งหมด ขณะที่การตรวจด้วยวิธีแซงเกอร์นั้น ตรวจพบได้เพียงร้อยละ 53 และ 40 ในชั้น เนื้อที่มีเซลล์มะเร็งปนอยู่ร้อยละ 20 และ 10 ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจด้วยวิธีไพโรซีควอนซิงที่ใช้ ในการศึกษานี้ จึงมีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ที่อาจถูกเจือจางจากส่วน ของเนื้อเยื่อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ปนอยู่ด้วย

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราส มีความคล้ายคลึงกับความชุกของการกลาย พันธุ์ของยีนนี้ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (ร้อยละ 40-50)⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ และพบน้อยกว่าในมะเร็งตับ อ่อน (ร้อยละ 70-90)⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ ในการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 12 ร้อยละ 96.6 และตำแหน่งโคดอน 13 ร้อยละ 3.4 โดยพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจาก GGT เป็น GAT มากที่สุดคือร้อยละ 41.3 ซึ่งเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในการศึกษาที่ผ่านมา เช่นกัน^(7, 14, 15, 63) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 8



แผนภูมิที่ 8 แสดงการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 และ 13 เปรียบเทียบ กับการศึกษาที่ผ่านมา^(7, 14, 15, 63)

ในภาพรวม รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลารีรี่ มีความคล้ายคลึงกับรูปแบบที่พบในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก^(65, 66, 71, 72) มากกว่ามะเร็งตับอ่อน⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ กล่าวคือ แม้ว่าจะพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ตำแหน่งโคดอน 12 มากกว่าตำแหน่งโคดอน 13 และพบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก GGT เป็น GAT มากที่สุดก็ตาม แต่ในมะเร็งแอมพูลารีรี่และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก จะพบความหลากหลายของรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสมากกว่า รวมทั้งพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่โคดอน 13 ได้บ่อยกว่า ดังแสดงในแผนภูมิที่ 9



แผนภูมิที่ 9 แสดงรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งแอมพูลารีรี่, มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งตับอ่อน^{(65) (71, 73)}

นอกจากนี้ ยังพบลักษณะที่เป็น adenomatous polyps นำมาก่อนในกระบวนการพัฒนาการเกิดของมะเร็งที่เรียกว่า adenoma-carcinoma sequence ในมะเร็งแอมพูลารีรี่และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน^(7, 14, 63, 65, 76)

การศึกษานี้ พบว่าลักษณะทางด้านคลินิกและพยาธิวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ได้แก่ การมี ECOG performance status แย่กว่า, อยู่ในระยะโรคที่ 3-4, มี histologic grade แบบ poorly หรือ undifferentiated มีการกระจายของโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง และการผ่าตัดพบมี positive surgical margin มากกว่า กลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส แม้ว่าความแตกต่างนี้ จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่มีแนวโน้มว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราสจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะของโรคที่มีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

สอดคล้องกับผลการศึกษากการกลายพันธุ์ของยีนเคราสกับการพยากรณ์โรค ที่พบว่ากลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส โดยมีค่ามัธยฐานการรอดชีวิต เท่ากับ 29.93 และ 44.32 เดือน ตามลำดับ และมีอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปีร้อยละ 19.6 และ 31.7 ตามลำดับ แม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ($P = 0.35$) ซึ่งอาจเกิดจากขนาดตัวอย่างที่ไม่มากพอที่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมทั้งในการศึกษานี้ เลือกใช้ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดแบบ Whipple's ทั้งหมด เพื่อที่จะลดปัญหาเรื่องความไม่เพียงพอของสิ่งส่งตรวจในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ทำให้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยในระยะแรกของโรค ที่มีการพยากรณ์โรคดี สืบเนื่องจากมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตไปเพียง 27 ราย ในการศึกษาเท่านั้น รวมทั้งระยะเวลาการตรวจติดตามในการศึกษานี้ มีค่ามัธยฐานเพียง 14.98 เดือน ซึ่งยังไม่เพียงพอที่จะบอกการรอดชีวิตได้ แต่การศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราส ยังไม่สามารถใช้บอกการพยากรณ์ของโรคได้ชัดเจน เช่น การศึกษาของ Howe และคณะ ก็ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส และกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเคราส โดยมีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตที่ 69.7 เดือนและ 47.6 เดือน ตามลำดับ ($P = 0.31$)

ปัจจัยที่พบว่า มีผลต่อการพยากรณ์โรคของมะเร็งชนิดแอมพูลารีอ์ในการศึกษานี้ ได้แก่ TNM stage 3-4 ($P=0.03$), poorly หรือ undifferentiated histologic grade ($P=0.003$), การกระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ($P=0.02$), การมี lymphovascular invasion ($P=0.01$) และ positive surgical margin ($P=0.003$) เมื่อทำการวิเคราะห์แบบตัวแปรหลายตัว พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคของมะเร็งชนิดแอมพูลารีอ์ ได้แก่ poorly หรือ undifferentiated histologic grade ($P=0.03$), การมี lymphovascular invasion ($P=0.02$) และ positive surgical margin ($P=0.009$)

การที่การกลายพันธุ์ของยีนเคราส อาจใช้บอกการพยากรณ์ของโรคได้ไม่ชัดเจนนั้น ใกล้เคียงกับผลการศึกษาในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก^(71, 77-83) และมะเร็งตับอ่อน^{(69, 70, 73, 84-}

⁸⁶⁾ แม้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราสเกิดขึ้นตั้งแต่กระบวนการเกิดมะเร็งในระยะแรกก็ตาม แต่

น่าจะเกิดจากอาจมีการกลายพันธุ์ของยีนอื่นๆเกี่ยวข้องเพื่อพัฒนาการเกิดเป็นมะเร็งในลำดับต่อมาด้วย

8.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาที่สามารถเก็บรวบรวมจำนวนผู้ป่วยได้มากเป็นอันดับสองของการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในผู้ป่วยมะเร็งแอมพูลารีที่มียูทั้งหมดทั่วโลก และเป็นการศึกษาแรกในผู้ป่วยไทย อีกทั้งเป็นการศึกษาที่ใหญ่ที่สุดในประชากรเอเชียอีกด้วย สามารถเก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยได้ตามที่กำหนดไว้ และเป็นการศึกษาหนึ่งที่สามารถบอกความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดนี้ที่น่าเชื่อถือได้ เนื่องจากใช้การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนเคราสที่ได้มาตรฐานในปัจจุบัน และสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์จากชิ้นเนื้อที่มีอยู่ได้ทั้งหมด ข้อจำกัดในการศึกษานี้คือ ยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าการกลายพันธุ์ของยีนเคราส จะบอกถึงการพยากรณ์โรคในมะเร็งแอมพูลารีหรือไม่ เนื่องจากระยะเวลาในการติดตามการรอดชีวิตในผู้ป่วยยังสั้นเกินไป จำเป็นต้องอาศัยการตรวจติดตามผู้ป่วยในการศึกษานี้ต่อไป เพื่อบอกพยากรณ์โรคได้แน่นอน อีกทั้งเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง จึงอาจมีข้อมูลบางส่วนที่ไม่ได้มีการเก็บรวบรวมไว้ และมีปัญหาในกรณีที่ผู้ป่วยบางส่วน ขาดการติดตามไป นอกจากนี้ การที่เลือกใช้ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดแบบ Whipple's ทั้งหมด เพื่อที่จะลดปัญหาเรื่องความไม่เพียงพอของสิ่งส่งตรวจในการตรวจหาการกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่จึงเป็นผู้ป่วยในระยะแรกของโรค อาจทำให้ความชุกของการกลายพันธุ์ของโรคที่พบ ไม่ได้บอกถึงระยะของโรคที่มีทั้งหมดก็เป็นได้

ปัจจุบันการผ่าตัดถือเป็นการรักษาหลักในระยะแรกของโรค และยังไม่มีการรักษาเสริมหลังผ่าตัดที่เหมาะสมในผู้ป่วยมะเร็งชนิดแอมพูลารี เนื่องจากยังไม่มีปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่ชัดเจนในการทำนายว่าผู้ป่วยคนใด จะได้รับประโยชน์จากการรักษา การกลายพันธุ์ของยีนเคราส ที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี อาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่นำมาใช้พิจารณาการรักษาเสริมที่เหมาะสมในผู้ป่วยกลุ่มนี้ก็เป็นได้

รายการอ้างอิง

1. Albores-Saavedra J, Schwartz AM, Batich K, Henson DE. Cancers of the ampulla of vater: demographics, morphology, and survival based on 5,625 cases from the SEER program. **J Surg Oncol.** 2009 Dec 1;100(7):598-605.
2. Goodman MT, Yamamoto J. Descriptive study of gallbladder, extrahepatic bile duct, and ampullary cancers in the United States, 1997-2002. **Cancer Causes Control.** 2007 May;18(4):415-22.
3. Carter JT, Grenert JP, Rubenstein L, Stewart L, Way LW. Tumors of the ampulla of vater: histopathologic classification and predictors of survival. **J Am Coll Surg.** 2008 Aug;207(2):210-8.
4. Morris-Stiff G, Alabraba E, Tan YM, Shapey I, Bhati C, Tanniére P, et al. Assessment of survival advantage in ampullary carcinoma in relation to tumour biology and morphology. **Eur J Surg Oncol.** 2009 Jul;35(7):746-50.
5. Sommerville CA, Limongelli P, Pai M, Ahmad R, Stamp G, Habib NA, et al. Survival analysis after pancreatic resection for ampullary and pancreatic head carcinoma: an analysis of clinicopathological factors. **J Surg Oncol.** 2009 Dec 15;100(8):651-6.
6. Woo SM, Ryu JK, Lee SH, Yoo JW, Park JK, Kim YT, et al. Recurrence and prognostic factors of ampullary carcinoma after radical resection: comparison with distal extrahepatic cholangiocarcinoma. **Ann Surg Oncol.** 2007 Nov;14(11):3195-201.
7. Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C, Paty PB, Park PY, Brennan MF. K-ras mutation in adenomas and carcinomas of the ampulla of vater. **Clin Cancer Res.** 1997 Jan;3(1):129-33.

8. Bouvet M, Gamagami RA, Gilpin EA, Romeo O, Sasson A, Easter DW, et al. Factors influencing survival after resection for periampullary neoplasms. **Am J Surg.** 2000 Jul;180(1):13-7.
9. Chang MC, Chang YT, Tien YW, Sun CT, Wu MS, Lin JT. Distinct chromosomal aberrations of ampulla of Vater and pancreatic head cancers detected by laser capture microdissection and comparative genomic hybridization. **Oncol Rep.** 2005 Oct;14(4):867-72.
10. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer.** 2003 Jun;3(6):459-65.
11. Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, Nagata Y, Urano T, Shiku H. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-ras oncogene. **Ann Surg.** 1991 Dec;214(6):657-62.
12. Stork P, Loda M, Bosari S, Wiley B, Poppenhusen K, Wolfe H. Detection of K-ras mutations in pancreatic and hepatic neoplasms by non-isotopic mismatched polymerase chain reaction. **Oncogene.** 1991 May;6(5):857-62.
13. Scarpa A, Capelli P, Zamboni G, Oda T, Mukai K, Bonetti F, et al. Neoplasia of the ampulla of Vater. Ki-ras and p53 mutations. **Am J Pathol.** 1993 Apr;142(4):1163-72.
14. Scarpa A, Zamboni G, Achille A, Capelli P, Bogina G, Iacono C, et al. ras-family gene mutations in neoplasia of the ampulla of Vater. **Int J Cancer.** 1994 Oct 1;59(1):39-42.
15. Zhao B, Kimura W, Futakawa N, Muto T, Kubota K, Harihara Y, et al. p53 and p21/Waf1 protein expression and K-ras codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater. **Am J Gastroenterol.** 1999 Aug;94(8):2128-34.
16. Kimura W, Futakawa N, Yamagata S, Wada Y, Kuroda A, Muto T, et al. Different clinicopathologic findings in two histologic types of carcinoma of papilla of Vater. **Jpn J Cancer Res.** 1994 Feb;85(2):161-6.

17. Todoroki T, Koike N, Morishita Y, Kawamoto T, Ohkohchi N, Shoda J, et al. Patterns and predictors of failure after curative resections of carcinoma of the ampulla of Vater. **Ann Surg Oncol**. 2003 Dec;10(10):1176-83.
18. Ruemmele P, Dietmaier W, Terracciano L, Tornillo L, Bataille F, Kaiser A, et al. Histopathologic features and microsatellite instability of cancers of the papilla of vater and their precursor lesions. **Am J Surg Pathol**. 2009 May;33(5):691-704.
19. Kadmon M, Tandara A, Herfarth C. Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis coli. A review of the literature and results from the Heidelberg Polyposis Register. **Int J Colorectal Dis**. 2001 Apr;16(2):63-75.
20. Harvey JJ. An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. **Nature**. 1964 Dec 12;204:1104-5.
21. Kirsten WH, Schauf V, McCoy J. Properties of a murine sarcoma virus. **Bibl Haematol**. 1970(36):246-9.
22. Marshall CJ, Hall A, Weiss RA. A transforming gene present in human sarcoma cell lines. **Nature**. 1982 Sep 9;299(5879):171-3.
23. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res**. 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
24. Barbacid M. ras genes. **Annu Rev Biochem**. 1987;56:779-827.
25. Santos E, Nebreda AR. Structural and functional properties of ras proteins. **FASEB J**. 1989 Aug;3(10):2151-63.
26. Talamini MA, Moesinger RC, Pitt HA, Sohn TA, Hruban RH, Lillemoe KD, et al. Adenocarcinoma of the ampulla of Vater. A 28-year experience. **Ann Surg**. 1997 May;225(5):590-9; discussion 9-600.
27. Jagelman DG, DeCosse JJ, Bussey HJ. Upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. **Lancet**. 1988 May 21;1(8595):1149-51.

28. Church J, Simmang C. Practice parameters for the treatment of patients with dominantly inherited colorectal cancer (familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **Dis Colon Rectum**. 2003 Aug;46(8):1001-12.
29. O'Connell JB, Maggard MA, Manunga J, Jr., Tomlinson JS, Reber HA, Ko CY, et al. Survival after resection of ampullary carcinoma: a national population-based study. **Ann Surg Oncol**. 2008 Jul;15(7):1820-7.
30. Nakase A, Matsumoto Y, Uchida K, Honjo I. Surgical treatment of cancer of the pancreas and the periampullary region: cumulative results in 57 institutions in Japan. **Ann Surg**. 1977 Jan;185(1):52-7.
31. Monson JR, Donohue JH, McEntee GP, McIlrath DC, van Heerden JA, Shorter RG, et al. Radical resection for carcinoma of the ampulla of Vater. **Arch Surg**. 1991 Mar;126(3):353-7.
32. Perrone G, Santini D, Zagami M, Vincenzi B, Verzi A, Morini S, et al. COX-2 expression of ampullary carcinoma: correlation with different histotypes and clinicopathological parameters. **Virchows Arch**. 2006 Sep;449(3):334-40.
33. Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Hruban RH, Lillemoe KD, Pitt HA. Periampullary adenocarcinoma: analysis of 5-year survivors. **Ann Surg**. 1998 Jun;227(6):821-31.
34. Hornick JR, Johnston FM, Simon PO, Younkin M, Chamberlin M, Mitchem JB, et al. A single-institution review of 157 patients presenting with benign and malignant tumors of the ampulla of Vater: management and outcomes. **Surgery**. 2011 Aug;150(2):169-76.
35. Winter JM, Cameron JL, O'lino K, Herman JM, de Jong MC, Hruban RH, et al. Clinicopathologic analysis of ampullary neoplasms in 450 patients: implications for surgical strategy and long-term prognosis. **J Gastrointest Surg**. 2010 Feb;14(2):379-87.

36. Camp ER, Vogel SB. Blind Whipple resections for periampullary and pancreatic lesions. *Am Surg*. 2004 Jan;70(1):6-10; discussion 1-2.
37. Qiao QL, Zhao YG, Ye ML, Yang YM, Zhao JX, Huang YT, et al. Carcinoma of the ampulla of Vater: factors influencing long-term survival of 127 patients with resection. *World J Surg*. 2007 Jan;31(1):137-43; discussion 44-6.
38. Rivadeneira DE, Pochapin M, Grobmyer SR, Lieberman MD, Christos PJ, Jacobson I, et al. Comparison of linear array endoscopic ultrasound and helical computed tomography for the staging of periampullary malignancies. *Ann Surg Oncol*. 2003 Oct;10(8):890-7.
39. Domagk D, Wessling J, Reimer P, Hertel L, Poremba C, Senninger N, et al. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, intraductal ultrasonography, and magnetic resonance cholangiopancreatography in bile duct strictures: a prospective comparison of imaging diagnostics with histopathological correlation. *Am J Gastroenterol*. 2004 Sep;99(9):1684-9.
40. Lee JH, Whittington R, Williams NN, Berry MF, Vaughn DJ, Haller DG, et al. Outcome of pancreaticoduodenectomy and impact of adjuvant therapy for ampullary carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Jul 1;47(4):945-53.
41. Bhatia S, Miller RC, Haddock MG, Donohue JH, Krishnan S. Adjuvant therapy for ampullary carcinomas: the Mayo Clinic experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006 Oct 1;66(2):514-9.
42. Mehta VK, Fisher GA, Ford JM, Poen JC, Vierra MA, Oberhelman HA, et al. Adjuvant chemoradiotherapy for "unfavorable" carcinoma of the ampulla of Vater: preliminary report. *Arch Surg*. 2001 Jan;136(1):65-9.
43. Chakravarthy A, Abrams RA, Yeo CJ, Korman LT, Donehower RC, Hruban RH, et al. Intensified adjuvant combined modality therapy for resected periampullary adenocarcinoma: acceptable toxicity and suggestion of improved 1-year

- disease-free survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Nov 1;48(4):1089-96.
44. Krishnan S, Rana V, Evans DB, Varadhachary G, Das P, Bhatia S, et al. Role of adjuvant chemoradiation therapy in adenocarcinomas of the ampulla of Vater. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Mar 1;70(3):735-43.
45. Kim K, Chie EK, Jang JY, Kim SW, Oh DY, Im SA, et al. Role of adjuvant chemoradiotherapy for ampulla of Vater cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Oct 1;75(2):436-41.
46. Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahnoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg*. 1999 Dec;230(6):776-82; discussion 82-4.
47. Neoptolemos JP, Moore MJ, Cox TF, Valle JW, Palmer DH, McDonald AC, et al. Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected periampullary adenocarcinoma: the ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial. *JAMA*. 2012 Jul 11;308(2):147-56.
48. Takada T, Amano H, Yasuda H, Nimura Y, Matsushiro T, Kato H, et al. Is postoperative adjuvant chemotherapy useful for gallbladder carcinoma? A phase III multicenter prospective randomized controlled trial in patients with resected pancreaticobiliary carcinoma. *Cancer*. 2002 Oct 15;95(8):1685-95.
49. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010 Apr 8;362(14):1273-81.
50. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan;3(1):11-22.

51. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. **Virchows Arch.** 2008 Nov;453(5):417-31.
52. 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 Prev.** 2000 Nov;9(11):1193-7.
53. Wang JY, Wang YH, Jao SW, Lu CY, Kuo CH, Hu HM, et al. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. **Oncol Rep.** 2006 Dec;16(6):1245-52.
54. Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. **Biochim Biophys Acta.** 2005 Nov 25;1756(2):115-25.
55. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol.** 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
56. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. **Cancer Res.** 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
57. Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, Japa S, Coppola D. KRAS Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. **Genes Cancer.** 2012 Jul;3(7-8):459-66.
58. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1977 Dec;74(12):5463-7.
59. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat.** 2002 May;19(5):479-85.

60. Lamb N. Pyrosequencing technology in Clinical Genetics Applications. 2010;
Available from: www.pyrosequencing.com.
61. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. **J Mol Diagn.** 2005 Aug;7(3):413-21.
62. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. **J Clin Oncol.** 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
63. Chung CH, Wilentz RE, Polak MM, Ramssoekh TB, Noorduyn LA, Gouma DJ, et al. Clinical significance of K-ras oncogene activation in ampullary neoplasms. **J Clin Pathol.** 1996 Jun;49(6):460-4.
64. Rashid A, Ueki T, Gao YT, Houlihan PS, Wallace C, Wang BS, et al. K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. **Clin Cancer Res.** 2002 Oct;8(10):3156-63.
65. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med.** 1988 Sep 1;319(9):525-32.
66. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. **Cancer.** 1993 Jun 15;71(12):3827-38.
67. Breivik J, Meling GI, Spurkland A, Rognum TO, Gaudernack G. K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. **Br J Cancer.** 1994 Feb;69(2):367-71.

68. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**. 1988 May 20;53(4):549-54.
69. Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. **Jpn J Cancer Res**. 1990 Feb;81(2):135-40.
70. Shibata D, Almoguera C, Forrester K, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove MM, et al. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas. **Cancer Res**. 1990 Feb 15;50(4):1279-83.
71. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. **J Clin Oncol**. 2010 Jan 20;28(3):466-74.
72. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. **Nature**. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):298-303.
73. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. **Am J Pathol**. 1993 Aug;143(2):545-54.
74. Hahn SA, Schmiegel WH. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. **Digestion**. 1998 Aug;59(5):493-501.
75. Howe JR, Conlon KC. The molecular genetics of pancreatic cancer. **Surg Oncol**. 1997;6(1):1-18.

76. Burmer GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2403-7.
77. Preto A, Figueiredo J, Velho S, Ribeiro AS, Soares P, Oliveira C, et al. BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *J Pathol*. 2008 Feb;214(3):320-7.
78. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*. 2005 Sep;54(9):1283-6.
79. Gonzalez-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernandez-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*. 2004 Feb;27(1):39-45.
80. Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg*. 1998 Mar;175(3):198-202.
81. Andersen SN, Lovig T, Breivik J, Lund E, Gaudernack G, Meling GI, et al. K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Jan;32(1):62-9.
82. Zauber NP, Wang C, Lee PS, Redondo TC, Bishop DT, Goel A. Ki-ras gene mutations, LOH of the APC and DCC genes, and microsatellite instability in primary colorectal carcinoma are not associated with micrometastases in pericolic lymph nodes or with patients' survival. *J Clin Pathol*. 2004 Sep;57(9):938-42.
83. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network

correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*. 2008 May 15;122(10):2255-9.

84. Fountzilas G, Bobos M, Kalogera-Fountzila A, Xiros N, Murray S, Linardou H, et al. Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation. *Cancer Invest*. 2008 Oct;26(8):784-93.
85. Finkelstein SD, Przygodzki R, Pricolo VE, Sayegh R, Bakker A, Swalsky PA, et al. K-ras-2 topographic genotyping of pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg*. 1994 Apr;129(4):367-72; discussion 72-3.
86. Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, et al. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 1989 Jun 15;43(6):1037-41.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Case record form) เรื่องความชุกของการกลายพันธุ์
ของยีนเคราสในมะเร็งชนิด AMPULLARY ในผู้ป่วยไทย

ID No.

Baseline characteristics

1. Ageyrs Birthdates .../...../....
2. Gender 1. Male 2. Female
3. ภูมิลำเนา
4. Performance status 0 1 2 3 4
5. Co-morbid DM HTN DLP CVD
- Other.....
6. Family history of cancer Yes..... No
7. History of hereditary polyposis syndromes (FAP and HNPCC)
 Yes No
8. History of premalignant ampullary adenomas
 Yes No
9. สิทธิการรักษา ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ 30 บาท
ประกันสังคม เงินสด
10. Smoking pack-year
 Quit.....years
 Never smoking
11. Alcohol status drinks/day
 Quit.....years
 Never alcohol drinking

Diagnosis

12. Clinical presentation abdominal pain abdominal mass
(more than 1) jaundice nausea/vomiting

LN involved/LN dissected/.....

18.4 Presence of lymphatic, neural, vascular invasion yes no NA

18.5 Margin status R0 R1 R2

Staging

19. TNM staging by AJCC Cancer Staging, 7th Edition (2010) (circle around TNM)

Primary tumor (T)

- T0 No evidence of primary tumor
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor limited to the ampulla of Vater or sphincter of Oddi
- T2 Tumor invades duodenal wall
- T3 Tumor invades pancreas
- T4 Tumor invades peripancreatic soft tissues or other adjacent organs or structures other than pancreas (please classified)

Large bowel Adrenal gland Kidney

Others.....

Regional lymph nodes (N)

- N0 No regional lymph node metastasis
- N1 Regional lymph node metastasis

Distant metastasis (M)

- M0 No distant metastasis
- M1 Distant metastasis (please classified)

Liver Peritoneum Lung Bone
 Distant LN Brain

Others.....

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0

Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stage III	T4	Any N	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

20. Resectability Resectable Unresectable Metastasis

Site of Invasion (only unresectable)

SMA SMV Portal vein IVC Aorta

Celiac axis

Treatment

21. Aim Curative Palliative Best supportive care

22. Surgery Whipple's operation Distal pancreatectomy

Palliative surgery Other.....

Date of surgery/...../.....

23. Adjuvant Rx RT alone Chemotherapy alone

Concurrent CRT Sequential CRT

23.1 RT Total doseGyFractionsWeeks

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

23.2 Chemotherapy Fluoropyrimidine Gemcitabine

Dosemg/m2Cycles

Dose reduction yes due to no

Dose delay yes due to no

Discontinue yes due to no

Date: Start/...../..... Finish/...../.....

24. Palliative Rx RT alone Chemotherapy alone Both

24.1 RT due to Bone metastasis Brain metastasis

Spinal cord compression Pain

Other.....

24.2 1st line Chemotherapy Fluoropyrimidine Gemcitabine

Gem + Platinum

Gem + Fluoropyrimidines

Gem + Others

Dosemg/m2Cycles

Dose reduction yes due to no

Dose delay yes due to no

Discontinue yes due to no

Date: Start/...../..... Finish/...../.....

Response rate by RECIST Complete response Partial

response Stable disease Progressive

disease

24.3 2nd line Chemotherapy Fluoropyrimidine Gemcitabine

Others

Dosemg/m2Cycles

Dose reduction yes due to no

Dose delay yes due to no

Discontinue yes due to no

Date: Start/...../..... Finish/...../.....

Response rate by RECIST Complete response Partial

response Stable disease Progressive

disease

25. Complications Obstructive jaundice Perforation

(more than 1) Cholangitis/Infection Gut obstruction

Abdominal pain Ascites

Thromboembolic disease

ภาคผนวก ข

เอกสารข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสีในมะเร็งชนิดแอมพูลลารีย์ในผู้ป่วยไทย
ผู้สนับสนุนการวิจัย วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพทย์ผู้ทำวิจัย ชื่อ แพทย์หญิงปิยะดา สิทธิเดชไพบูลย์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

ที่อยู่ หน่วยโรคมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตึกอำนวยการ ชั้น 4 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-2564533, 081-8178198

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นมะเร็งชนิดแอมพูลลารีย์ที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

มะเร็งชนิดแอมพูลลารีย์ เป็นส่วนหนึ่งของมะเร็งกลุ่มที่เรียกว่า periampullary อันประกอบไปด้วยมะเร็งของตับอ่อนส่วนหัว, มะเร็งของท่อทางเดินน้ำดีส่วนปลาย, มะเร็งของลำไส้เล็กส่วนต้น และมะเร็งชนิดแอมพูลลารีย์ พบประมาณร้อยละ 6 ถึง 20 ของมะเร็งชนิด periampullary ทั้งหมด และถือว่าเป็นมะเร็งชนิดที่มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่ามะเร็งชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มมะเร็ง periampullary ด้วยกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสามารถวินิจฉัยมะเร็งชนิดนี้ได้ตั้งแต่วัยแรกของโรค จากการที่มีอาการและอาการแสดงของการอุดตันของทางเดินน้ำดีที่เกิดขึ้นเร็ว อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าอาจมีความแตกต่างในระดับการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้มะเร็งชนิด

แอมพลูเรีย มีพยาธิกรรมโรคที่แตกต่างจากมะเร็งตับอ่อน ซึ่งหนึ่งในการกลายพันธุ์ของยีนที่พบใน มะเร็งชนิดนี้ก็คือ การกลายพันธุ์ของยีนเคราส แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาการกลายพันธุ์ ดังกล่าวอย่างชัดเจน อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาลักษณะนี้มากนักในประชากรเอเชีย ซึ่งอาจมีความ ชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสแตกต่างจากประชากรในประเทศแถบตะวันตก การศึกษาวิจัยนี้จึง ต้องการทราบถึงการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยไทยโดยการตรวจหาการกลายพันธุ์จากชิ้นเนื้อ เพิ่มเติม จากชิ้นเนื้อที่มีอยู่เดิม ซึ่งจะไม่มีผลกระทบต่อการรักษาที่ผ่านมาแล้วของผู้ป่วยแต่อย่าง ใด และการทราบถึงข้อมูลของการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยไทย จะเป็นประโยชน์ต่อการ วางแผนการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อพัฒนาวิธีการรักษาและ/หรือยาที่ใช้ในการรักษา

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสในมะเร็งชนิดแอมพลูเรียในผู้ป่วยไทย
วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ทางผู้วิจัยขอ ความร่วมมือในการตรวจชิ้นเนื้อเพิ่มเติมทางด้านการศึกษาการกลายพันธุ์ ร่วมกับทบทวนข้อมูลจากเวช ระเบียนผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ในการตรวจชิ้นเนื้อเพิ่มเติมทางด้านการศึกษาการกลายพันธุ์ ทางผู้วิจัยจะทำการส่งตรวจจากชิ้น เนื้อที่มีอยู่เดิมของผู้ป่วย โดยไม่มีผลกระทบต่อผู้ป่วยแต่อย่างใด

ค่าใช้จ่ายสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการโมเลกุล ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

แหล่งทุนวิจัย หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ เป็นผู้สนับสนุน

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านอาจจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้ จะเป็นประโยชน์สำหรับแพทย์ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในโรคมะเร็งชนิดนี้ และอาจนำไปสู่การ พัฒนาการรักษาและการใช้ยาในอนาคตได้

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่ สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่ เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไป
ตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่าน
ต้องการยกเลิกการให้สิทธิดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม
โดยส่งไปที่ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4
ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูล
ส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อ
ประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูล
ของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่
เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้ง
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
5. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
6. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจาก

การใช้สิทธิพลบบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการ
วิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการ
วิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการตึกชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน
กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ภาคผนวก ค

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนเคราสีในมะเร็งชนิดแอมพูลารีย์ในผู้ป่วยไทย
วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว

ที่อยู่..... โทรศัพท์.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมา และข้าพเจ้า
ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลง
นาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ
ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา
ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้ง
ประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและ
โอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ
ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการ
การรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย (โดยได้รับการสนับสนุนค่าใช้จ่ายจากผู้วิจัย)

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้ง
เหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้า
จะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับ
อนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อ
ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำ
ยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

..... ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

..... ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ เดือน..... พ.ศ.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ แพทย์หญิงปิยะดา สิริเดชไพบูลย์

วัน เดือน ปีเกิด 30 มีนาคม 2523

สถานที่เกิด จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

2541-2546 นิสิตคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2547 แพทย์ฝึกหัด (Internship), โรงพยาบาลพระปกเกล้า, จันทบุรี

2548 แพทย์ใช้ทุน, โรงพยาบาลเขาคิชฌกูฏ, จันทบุรี

2549 แพทย์ใช้ทุน, โรงพยาบาลพุนพิน, สุราษฎร์ธานี

2550-2552 แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2553-2554 Research Fellow, สาขาอายุรศาสตร์, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2554-ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาวิชามะเร็งวิทยา

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

2544 วิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2546 แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2552 วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม

สาขาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย