ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

นางสาว ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF RETINOBLASTOMA PROTEIN LOSS BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER

Miss Prakongboon Sungkasubun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ
โดย	นางสาว ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ แพทย์หญิง นภา ปริญญานิติกูล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธนินทร์ อัศววิเชียรจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์แพทย์หญิง นภา ปริญญานิติกูล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายแพทย์ ทรงคุณ วิญญูวรรธน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์ : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ (PREVALENCE OF RETINOBLASTOMA PROTEIN LOSS BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.พญ. นภา ปริญญานิติกุล, 111 หน้า

ที่มา มะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเป็นมะเร็งเต้านมชนิดที่มีความรุนแรงมาก โดยมักเกิดการเป็นซ้ำหรือลุกลามในระยะเวลารวดเร็วและมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ แต่กลับตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดีกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่น มีข้อมูลจากการศึกษาในอดีตพบว่าการขาดหายไปของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาซึ่งพบมากในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟอาจมีบทบาทสำคัญในแง่ของการพยากรณ์โรค และการตอบสนองต่อการรักษา จึงทำการศึกษานี้ขึ้นเพื่อหาความชุกของการขาดหายไปของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาความชุกของของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ และมีวัตถุประสงค์รองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมากับการดำเนินโรค

ประชากรและวิธีการ ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมซึ่งได้รับการรักษาที่รพ.จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2553 โดยตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วย 72 รายที่มีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน น้อยกว่าร้อยละ 10 ร่วมกับไม่มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณเฮอร์ทู จากการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ หรือผลทดสอบด้วยวิธี FISH เป็นลบ ที่ถูกเตรียมด้วยวิธีไมโครแอเรย์โดยใช้แอนติบอดี โคลน 1F8 ต่อเรติโนบลาสโตมา และมีการติดตามการดำเนินโรคต่อ

ผลการวิจัย ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ 46 ราย ที่ไม่มีการแสงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาคิดเป็นร้อยละ 64 ซึ่งมีลักษณะที่บ่งบอกว่าโรครุนแรงกว่า คือ อายุเฉลี่ยน้อยกว่า, ชิ้นเนื้อเกรด 3 และระดับการแบ่งเซลล์มากกว่า เมื่อสิ้นสุดการศึกษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีการแสงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีค่าประมาณการมีชีวิตรอดโดยปลอดโรคยาวกว่า คือ ยังไม่สามารถประมาณได้ เทียบกับ 10 เดือน ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ($p = 0.13$ และ 0.03 ที่ 2 และ 3 ปี ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด พบว่ารอยโรคหายไปจนหมด ในอัตราส่วนที่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา คือ ร้อยละ 33 เทียบกับร้อยละ 20 ในผู้ป่วยที่มีการแสงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ($p=0.604$)

สรุปผลการวิจัย พบความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมากกว่าการศึกษาอื่น ๆ และมีแนวโน้มว่าการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจะเป็นปัจจัยที่ใช้ทำนายการดำเนินโรคและการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ การเพิ่มจำนวนผู้ป่วยที่ศึกษาและติดตามการดำเนินโรคต่อในระยะยาวจะช่วยยืนยันผลการศึกษาและแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ที่จะได้รับได้ชัดเจนขึ้น

ภาควิชา .....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต .....ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์.....

สาขาวิชา .....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา .....2553..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5274785830 : MAJOR MEDICINE (ONCOLOGY)
KEYWORDS : RETINOBLASTOMA PROTEIN / TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER / IMMUNOHISTOCHEMISTRY

PRAKONGBOON SUNGKASUBUN : PREVALENCE OF RETINOBLASTOMA PROTEIN LOSS BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER. ADVISOR: ASSIST.PROF.VIROTE SRIURANPONG, M.D., CO-ADVISOR : NAPA PARINYANITIKUL, MD., 111 PP.

Background: Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype of breast cancer with a high rate of recurrence and poor survival. However, the response to treatment with chemotherapy is generally high comparing to the other breast cancer subtypes. Previous study has showed that loss of retinoblastoma protein (pRB) expression in tumor tissue may play an important role in determining the prognosis and response to treatment of breast cancer including TNBC. In this study we characterized the expression rate of pRB in Thai TNBC patients.

Objectives: Our primary objective is to determine the prevalence of loss of expression of retinoblastoma protein in TNBC tumor tissue. The secondary objective is to find an association between the loss of pRB and clinical parameters.

Patients and methods: Breast cancer patients who had been treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital during 2006-2010 were enrolled. Tumor tissue from 72 patients whose tumor cells had expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) less than 10% and negative amplification of Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2 (HER-2) by immunohistochemistry (IHC) or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) were collected to manually construct tissue microarray (TMA). Expression of pRB was performed by IHC on TMA with anti-RB monoclonal antibody clone 1F8. All clinical parameters were reviewed and collected from available medical records.

Results: Of the 72 TNBC tumor tissues analyzed, there were 46 samples (64%) showed no expression of pRB. There were more high risk features; i.e. younger age, histological grade 3 and higher proliferative index, in the patients whose tumor tissues showed undetectable pRB. At the study cut off, the patients with loss of pRB had a longer estimated disease or progression free survival (DFS or PFS), not reached, compared with 10 months of patients with presence of pRB expression ($p = 0.13$ and 0.03 at 2 and 3 years respectively). In patients who received preoperative chemotherapy, there were higher rate of pathological complete response in patients lacking of pRB than the patients expressing pRB, 33% and 20% respectively ($p=0.604$).

Conclusion: The prevalence of pRB loss in Thai TNBC patients is significantly higher than the previously reported in other population. Loss of pRB may serve a potential predictive and prognostic biomarker among TNBC patients. A larger population and longer follow up cohort are highly warranted.

Department : .....Medicine.....Student's signature .....Prakongboon Sungkasubun.....
Field of Study : .....Medicine.....Advisor's signature.....Virote.....
Academic Year : .....2010.....Co-advisor's signature.....Napa.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. อาจารย์แพทย์หญิงชนิดา วินะยานุวัติคุณ ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
2. นายแพทย์ณัฐพงศ์ โตพิบูลพงศ์ ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
3. คุณชวลิต แซ่ล้อ พนักงานวิจัย ช่วยประสานงานและติดตามผู้ป่วย

และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรนุช ธนากิจ ช่วยตรวจพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

Chulalongkorn International Clinical Research Centre

5. คุณนิรันดร์ อินทรัตน์ ผู้ให้คำปรึกษาเรื่องการวิเคราะห์สถิติ

รวมทั้งบิดา, มารดา และครอบครัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ
บทที่
1.บทนำ.....1
2.มะเร็งเต้านมและมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ.....10
3.โปรตีนเรติโนบลาสโตมา.....22
4.อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้.....32
5.วัสดุและวิธีการ.....43
6.วิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ที่ใช้ในการศึกษานี้.....46
7.ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....49
8.อภิปรายผลการวิจัย.....70
9.สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....78
รายการอ้างอิง.....81
ภาคผนวก.....90
ภาคผนวก ก.....91
ภาคผนวก ข.....97
ภาคผนวก ค.....100
ภาคผนวก ง.....103

หน้า

ภาคผนวก จ……104

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะของมะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟ, basal-like tumor และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 เทียบกับมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ.....15

ตารางที่ 2.2 แสดงอัตราการรอดชีวิต (overall survival rate)หลังได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเทียบกับชนิดอื่นๆ…..…..19

ตารางที่ 7.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ…….51

ตารางที่ 7.2 แสดงการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่ได้ก่อนผ่าตัด……..…57

ตารางที่ 7.3 เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง..…58

ตารางที่ 7.4 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา.....61

ตารางที่ 7.5 แสดงระยะเวลาที่ยังไม่มีการกลับเป็นซ้ำที่ 2 และ 3 ปี.....66

ตารางที่ 7.6 แสดงสถานภาพของผู้ป่วยหลังติดตามอาการไป 2 และ 3 ปี หลังได้รับการรักษา…….……..……68

ตารางที่ 7.7 แสดงการตอบสนองต่อการได้ยาเคมีบำบัดก่อนผ่าตัด.....69

ตารางที่ 8.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเปรียบเทียบแต่ละการศึกษา.....71

ตารางที่ 8.2 เปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ.....76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย……...……5

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟกับ Basal-like tumor…....…13

รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ , Basal-like tumor และมะเร็งเต้านมที่เกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน BRCA1.....……16

รูป 2.3 แสดงสัดส่วนการมีชีวิตอยู่ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ.....18

รูป 2.4 แสดงการกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เป็นและไม่เป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ.....18

รูปที่ 3.1 โครโมโซมที่ 13……...…22

รูปที่ 3.2 Two-hit Hypothesis ของยีนเรติโนบลาสโตมา.....23

รูปที่ 3.3 วัฏจักรเซลล์…….……25

รูปที่ 3.4 แสดง check points ในวัฏจักรเซลล์.....26

รูปที่ 3.5 แสดงการควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 phase.....27

รูปที่ 3.6 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาผ่านตัวรับต่างๆ.....28

รูปที่ 4.1 แสดงการยึดเกาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี.....33

รูปที่ 4.2 Direct method.....34

รูปที่ 4.3 Indirect method.....34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

รูปที่ 4.4 PAP method.....35

รูปที่ 4.5 Avidin-biotin complex (ABC) method.....36

รูปที่ 6.1 เทคนิคไมโครแอเรย์.....47

รูปที่ 6.2 บล็อกชิ้นเนื้อจากการเตรียมด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์.....47

รูปที่ 7.1 แสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเพื่อนำมาศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้.....50

รูปที่ 7.2 แสดงการติดสีของโปรตีนเรติโรบลาสโตมาในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเต้านม.....51

รูปที่ 7.3 กราฟแสดงการมีชีวิตโดยปลอดโรคหรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้น…...…56

รูปที่ 7.4 กราฟแสดงการมีชีวิตรอดโดยรวม…….…….…….56

รูปที่ 7.5 กราฟแสดงระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปลอดโรคหรือปลอดการลุกลามของโรคที่ 2 ปี.....67

รูปที่ 7.6 กราฟแสดงระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปลอดโรคหรือปลอดการลุกลามของโรคที่ 3 ปี.....67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับต้นๆในสตรีและมีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมามีการพัฒนาทางการแพทย์หลายด้าน ทั้งในด้านการวินิจฉัยในระยะเริ่มต้น การรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทั้งในเรื่องของวิธีการผ่าตัด การรักษาเสริมทางเคมีบำบัด การใช้ฮอร์โมน และการรักษาด้วยยาแบบมุ่งเป้า (Targeted therapy)

อย่างไรก็ตาม มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่มีความหลากหลายทั้งในการตอบสนองต่อการรักษา การดำเนินโรค และการทำนายโรค การแบ่งกลุ่มด้วยลักษณะสำคัญทางพยาธิวิทยาสามารถแบ่งผู้ป่วยมะเร็งเต้านมได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ชนิดที่มีการแสดงของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen receptor, ER) หรือโปรเจสเตอโรน (Progesterone receptor, PR) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 75-80 , มะเร็งเต้านมที่มีการแสดงของตัวรับสัญญาณเฮอร์ทู (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2, HER-2) มีประมาณร้อยละ 15-20 และประมาณ ร้อยละ 10-15 ที่เหลืออยู่ในกลุ่มที่เป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ (Triple-negative breast cancer, TNBC) โดยวินิจฉัยได้จากการตรวจไม่พบการแสดงตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน, โปรเจสเตอโรน และ HER-2 ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา จากข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า มะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่รุนแรงและการทำนายโรคที่ไม่ดี ได้แก่ มักพบในผู้ป่วยอายุน้อยกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่น มักมีการแพร่กระจายไปอวัยวะสำคัญ เช่น ปอด สมอง ได้รวดเร็วกว่า เกิดกลับเป็นซ้ำในระยะเวลาสั้น ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน และยังไม่มียารักษาแบบมุ่งเป้าที่เฉพาะต่อโรค ผลลัพธ์คือทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 3-5 ปีแรกภายหลังได้รับการวินิจฉัย

มีการศึกษามากมายในต่างประเทศเกี่ยวกับกลไกการเจริญเติบโตของตัวมะเร็ง เพื่อหาแนวทางในการรักษาแบบมุ่งเป้าที่มีความจำเพาะ สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานความชุกของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ทั้งในเรื่องของอาการ อาการแสดง การดำเนินโรค ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา การตอบสนองต่อการรักษาด้วยฮอร์โมน เคมีบำบัด การกลับเป็นซ้ำของโรค และอัตราการรอดชีวิต แม้ว่ามะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟจะมีความรุนแรงมากกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ แต่ในช่วงแรกกลับตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัดทำให้มีการยุบลงของก้อนมะเร็งโดยรวมทั้งก่อนและหลังผ่าตัด (Neoadjuvant and Adjuvant chemotherapy) ได้ดีที่สุด แต่ก็กลับมาดื้อยาเร็วที่สุด (1-2)

ข้อมูลเกี่ยวกับแนวทางการรักษามะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในปัจจุบันนี้ ยังมีค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับชนิดอื่นๆ แม้ว่าจะตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดี แต่ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนว่ายาเคมีบำบัดสูตรใดจะเหมาะสมมากที่สุด อีกทั้งมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ มีความรุนแรงมากกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น การหาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด จึงน่าจะเป็นสิ่งที่มีประโยชน์มากในการวางแผนการรักษา

โปรตีนเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma protein or pRB) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Tumor suppressor protein) โดยทำหน้าที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติในระยะการแบ่งเซล G1 (3) การที่โปรตีนเรติโนบลาสโตมา ไม่สามารถทำงานได้จึงทำให้เกิดการแบ่งเซลล์มากผิดปกติ และมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด (4) มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟกับ การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมีสัดส่วนของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มากกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (5)

หน้าที่ในการยับยั้งแบ่งเซลล์ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา เกิดขึ้นได้จากการที่โปรตีนชนิดนี้สามารถควบคุมกลุ่มของ E2F ซึ่งช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์โดยจะทำงานในช่วง G1 และ S-phase ในวัฏจักรของเซลล์ (6-7) ในภาวะที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในปริมาณที่เหมาะสม (Hypophosphorylation) โปรตีนเรติโน บลาสโตมาจะถูกกระตุ้นให้จับและยับยั้งการทำงานของ E2F ในทางกลับกันถ้ามีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

มากเกินไป (Hyperphosphorylation) โปรตีนเรติโนบลาสโตมาจะไม่สามารถจับกับ E2F ได้ ทำให้ E2F เป็นอิสระและสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ ซึ่งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยโปรตีน Cyclin D จับกับ Cyclin D-cyclin dependent kinase (CDK)-4 และ -6 ซึ่งการทำงานของ CDK-4 และ CDK-6 จะถูกควบคุมจากหลายปัจจัย โปรตีนเหล่านี้จะควบคุมให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินไปตามปกติ หากโปรตีนเหล่านี้ทำงานไม่สมบูรณ์หรือโปรตีน เรติโนบลาสโตมาไม่ทำงานจะทำให้ไม่สามารถควบ คุมการแบ่งเซลล์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งให้เกิดมะเร็ง (8)

แม้ว่าจะมีโปรตีนเรติโนบลาสโตมาลดลง จนไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้ตามปกติและเกิดมะเร็งขึ้น แต่มะเร็งเหล่านี้มักจะไวต่อการให้ยาเคมีบำบัด (9) เนื่องจากยาเคมีบำบัดจะมีผลในช่วงที่เซลล์แบ่งตัว ดังนั้น เซลล์ที่แบ่งตัวเร็วหรือมีอัตราการแบ่งตัวมาก เช่น เซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา จึงได้รับผลจากยาเคมีบำบัดมากกว่าเซลล์ที่แบ่งตัวช้า และเชื่อว่าเซลล์เหล่านี้ไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจากยาเคมีบำบัดได้ ทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด (1, 10-13)

2. คำถามการวิจัย (Research questions)

<u>คำถามหลัก (Primary research question)</u>

ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในผู้ป่วยไทยมีความแตกต่างจากรายงานในต่างประเทศหรือไม่

<u>คำถามรอง (Secondary research question)</u>

1) การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีผลต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด ซึ่งในการศึกษานี้หมายถึง Anthracycline-based regimens, Taxane-based regimens และ CMF (Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-FU) regimen ในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟหรือไม่

2) การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีผลต่อการดำเนินโรค โดยวัดจากระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปราศจากการกลับเป็นซ้ำ (Disease free survival or DFS) หรือระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปราศจากการลุกลามมากขึ้น (Progression free survival or PFS)ในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟหรือไม่

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1) เพื่อหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ

2) เพื่อศึกษาผลของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งสตรีที่เป็นเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

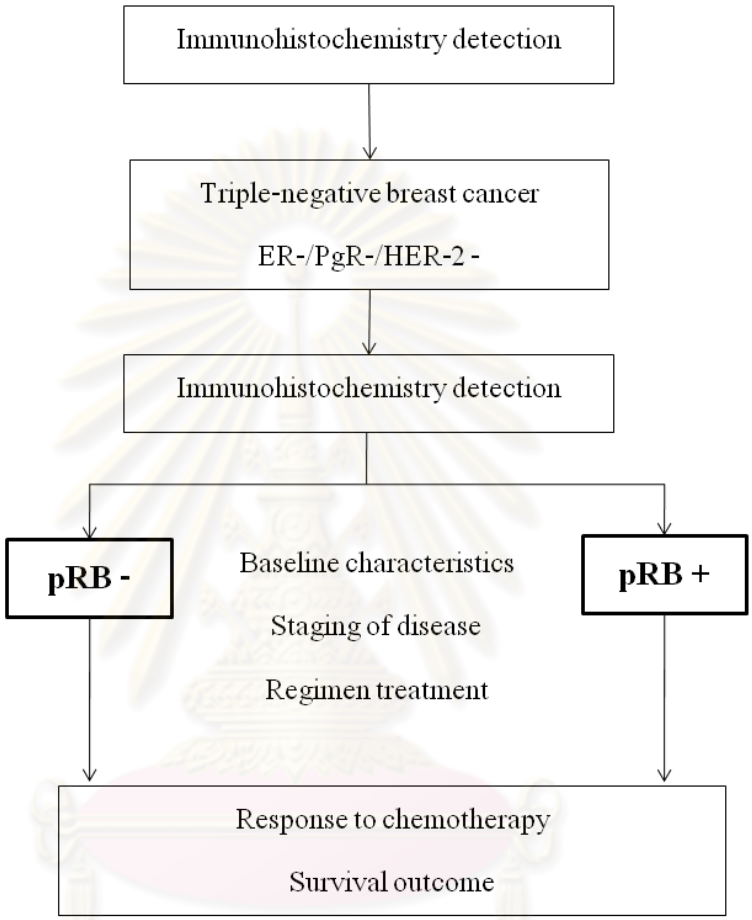
3) เพื่อศึกษาผลของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาต่อการดำเนินโรคในผู้ป่วยมะเร็งสตรีที่เป็นเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

4. สมมติฐาน (Hypothesis)

H0 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ เท่ากับร้อยละ 37 (5)

H1 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟไม่เท่ากับร้อยละ 37

5. กรอบความคิดการวิจัย (Conceptual framework)



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

■ มะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ (Triple-negative Breast Cancer)

มะเร็งของเต้านมชนิดหนึ่งที่สามารถวินิจฉัยได้จากการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อและการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (ER, PR, HER-2 status) โดยพบว่ามีเซลล์มะเร็งเต้านมที่

มีการติดสีของ ตัวรับสัญญาณฮอร์โมน (ER และ PR) ดังกล่าวน้อยกว่าร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด ร่วมกับการติดสีของ HER–2 เป็น 0 ถึง 1+ หรือได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธี FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) ว่าไม่มีการแสดงออกของ HER-2 มากผิดปกติในกรณีที่ HER-2 2+

■ <u>การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน, โปรเจสเตอโรน, HER-2</u>

คือ การย้อมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา พบการติดสี ER, PR ตั้งแต่ร้อยละ 10 ขึ้นไป และย้อมติด HER-2 เป็น 3+ หรือได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธี FISH ว่ามีการแสดงออกของ HER-2 มากผิดปกติในกรณีที่ HER-2 2+

■ <u>การรักษาเสริม (Adjuvant therapy)</u>

คือ การรักษาที่ได้เพิ่มเติมหลังจากการรักษามาตรฐานซึ่งหมายถึง การผ่าตัด ในมะเร็งเต้านมมี 2 ชนิด คือ การให้ยาเคมีบำบัด และการรักษาด้วยฮอร์โมน การเลือกใช้การรักษาวิธีใดขึ้นกับการพยากรณ์โรคและโอกาสกลับเป็นซ้ำ โดยอาศัยข้อมูลทั้งหมดของผู้ป่วยในแต่ละราย และวิเคราะห์ตาม St. Gallen 2009 Guideline และ NCCN 2010 Guideline

■ <u>การประเมินการตอบสนองต่อการรักษา</u>

ใช้เกณฑ์ตาม RECIST criteria (Response Evaluation Criteria Solid Tumors) ปี 2000

■ <u>Performance status</u>

ใช้หลักเกณฑ์ตาม Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ได้แก่

0 คือ สามารถทำงานและออกแรงได้ตามปกติ ไม่ต่างจากตอนก่อนเป็นมะเร็งเต้านม

1 คือ ทำงานหนักไม่ได้ แต่ยังสามารถเคลื่อนไหวและทำงานเบาๆ รวมทั้งกิจวัตรประจำวันต่างๆ หรืองานบ้านเบาๆได้ เช่น งานสำนักงาน, กวาดพื้น ดูดฝุ่น ปัดฝุ่น ล้างจาน เป็นต้น

2 คือ เคลื่อนไหวได้ ทำกิจวัตรประจำวันต่างๆได้ แต่ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและ นอนติดเตียงน้อยกว่าร้อยละ 50

3 คือ ช่วยเหลือตนเองได้บ้าง ส่วนใหญ่ต้องอาศัยคนช่วยและนอนติดเตียงมากกว่าร้อยละ 50

4 คือ นอนติดเตียงตลอดเวลา

7. รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง และมีการเก็บข้อมูลต่อไปข้างหน้า (Retrospective-Prospective cohort study)

8. ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

1) การศึกษานี้ได้ส่งให้คณะกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพื่อขอความเห็นชอบก่อน

2) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา รวมถึงประวัติที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย จะถูกเก็บรักษาเป็นความลับ โดยคำนึงถึงสิทธิของผู้ป่วยเป็นสำคัญ

3) การนำเสนอผลการศึกษา จะเป็นภาพรวมของการศึกษาทั้งหมด ไม่ได้เป็นข้อมูลรายบุคคล

9. ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

1) การย้อมสีในการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากมีผลโดยตรงกับการแปลผล หากมีการติดสีไม่สม่ำเสมอ อาจทำให้ได้ผลบวกต่อการย้อมด้วยวิธีนี้น้อยลงกว่าเดิม

2) การตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัด วัดจากระยะเวลาปลอดโรค ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันบ้างขึ้นกับเกณฑ์ของผู้วินิจฉัยแต่ละคน

3) ไม่สามารถคาดได้ว่าชิ้นเนื้อที่ถูกเก็บไว้นาน จะมีผลต่อการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้อย่างไรบ้าง

4) การสรุปผลของการรักษาในขั้นตอนสุดท้ายอาจไม่สามารถระบุได้แน่ชัดหากมีผู้ป่วยขาดการติดตามอาการ

5) เนื่องจากงานวิจัยนี้มีระยะเวลาในการเก็บข้อมูลที่จำกัด แต่การดำเนินโรคของมะเร็งเต้านมระยะเริ่มต้นที่ได้รับการรักษาจนไม่เหลือรอยโรคอยู่แล้วเป็นไปอย่างช้าๆ ข้อมูลที่ได้เมื่อถึงระยะสิ้นสุดการวิจัย อาจไม่พียงพอที่จะสรุปผลให้ชัดเจน

6) เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง จึงไม่สามารถควบคุมตัวแปรต่างๆระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาได้ ร่วมกับบางส่วนของข้อมูลนำมาจากเวชระเบียน ซึ่งอาจบันทึกข้อมูลได้ไม่สมบูรณ์ และอาจมีผู้ป่วยบางส่วนที่รักษาหลายโรงพยาบาลทำให้ข้อมูลในเวชระเบียนไม่ครบถ้วน

10. ผลหรือประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย (Expected benefits and Application)

1) หากการตรวจโปรตีนเรติโนบลาสโตมา หรือสิ่งบ่งชี้ใหม่ๆ (Tumor markers) มีความไวหรือความจำเพาะในการทำนายการตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัดในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมากกว่าสิ่งบ่งชี้เดิม (ได้แก่ p53 ซึ่งควบคุมการเจริญของเซลล์ และ Ki-67 ซึ่งบอกถึงความสามารถในการแบ่งตัว) อาจสามารถนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจให้การรักษาในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว โดยเฉพาะในกรณีที่ข้อบ่งชี้ในการให้ยาเคมีบำบัดไม่ชัดเจน

2) ทราบถึงลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วย และการดำเนินโรคของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟของไทย

11. อุปสรรคที่อาจจะเกิดขึ้น และ มาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem)

1) มีบางส่วนของข้อมูลที่เอามาจากเวชระเบียน ซึ่งอาจบันทึกข้อมูลได้ไม่สมบูรณ์ และอาจมีผู้ป่วยบางส่วนที่รักษาหลายโรงพยาบาลทำให้ข้อมูลในเวชระเบียนไม่ครบถ้วน แนว

ทางการแก้ไข คือ ใช้การสัมภาษณ์เพื่อให้ได้ข้อมูลการรักษาที่อาจเกิดขึ้นนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ร่วมกับขอความร่วมมือของผู้ป่วยในการขอประวัติการรักษาทั้งหมดที่เกิดขึ้นนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตลอดช่วงที่ทำการวิจัย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนมากที่สุด

2) การอ่านผลทางพยาธิวิทยา มีความแตกต่างกันระหว่างพยาธิแพทย์แต่ละคน และวิธีการย้อมของนักเทคนิคแต่ละคน แนวทางแก้ไขคือ ให้นักเทคนิคเพียงคนเดียวในการย้อมและพยาธิแพทย์เพียงคนเดียวในการอ่านผล และเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่เก็บข้อมูลทางพยาธิวิทยา เผื่อกรณีที่การย้อมติดสีคุณภาพไม่ดีพอที่จะนำมาวิเคราะห์ผลได้

3) การติดตามผู้ป่วย อาจมีบางส่วนที่ไม่สามารถติดต่อได้ หรือไม่ทราบการดำเนินโรคอย่างแท้จริง แนวทางแก้ไขคือ คิดเผื่อจำนวนผู้ป่วยที่อาจขาดหายไปร่วมด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

มะเร็งเต้านม และมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

<u>มะเร็งเต้านม (Breast cancer)</u>

เป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับต้นๆในเพศหญิง อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมประมาณ 50-60 ปี อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเต้านมกลับลดลง เนื่องมาจากวิธีการวินิจฉัยที่แม่นยำมากขึ้น ความก้าวหน้าทางการแพทย์ รวมถึงวิธีการรักษาที่มีการพัฒนาขึ้นเรื่อยๆ

มะเร็งเต้านมเองนั้นมีความหลากหลายในด้าน ชนิด การดำเนินโรค การรักษา และผลการตอบสนองต่อการรักษาทั้งเคมีบำบัดและฮอร์โมน ซึ่งเกิดจากการที่พบว่าพยาธิวิทยาจากการย้อมพิเศษ (Breast markers) โดยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ มีความแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. *กลุ่มที่มีการแสดงของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen receptor) หรือฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone receptor) (ER, PR +ve, HER-2 –ve/+ve)* เป็นกลุ่มที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุด มักตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน

2. *กลุ่มที่มีแสดงของตัวรับสัญญาณ HER-2 (ER, PR –ve but HER-2 +ve)* พบได้ประมาณ 1 ใน 4 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด ซึ่งการรักษาที่ดีคือ การรักษาเฉพาะ (Targeted therapy) ต่อต้านตัวรับสัญญาณ HER-2 (Anti-HER-2 : Trastuzumab) และยาเคมีบำบัด กลุ่มนี้มีการดำเนินโรคที่รุนแรง และมักไม่ค่อยตอบสนองต่อฮอร์โมน แต่มีการศึกษามากมายในช่วง10 ปีที่ผ่านมาเกี่ยวกับการรักษามะเร็งเต้านมกลุ่มดังกล่าว พบว่าการรักษาเฉพาะต่อตัวรับสัญญาณ HER-2 ทำให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นในกลุ่มมะเร็งเต้านมในระยะลุกลามที่มีการแสดงของตัวรับสัญญาณ HER-2 โดยใช้ยาเคมีบำบัดและ Trastuzumab ร่วมกัน นอกจากนี้ในการนำ Trastuzumab มาใช้ในมะเร็งเต้านมระยะแรกที่เป็น HER-2 positive tumor หลาย

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการให้ยาร่วมกับการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัดทั้งที่ให้พร้อม หรือตามหลังการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดแล้ว มี ระยะเวลาปลอดจากโรค (Disease free interval) และอัตราการกลับเป็นซ้ำดีกว่าการใช้ยาเคมีบำบัดอย่างเดียว (14-18)

3. *กลุ่มที่เป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ (ER, PR, HER-2 –ve)* ถึงแม้ว่าจะพบน้อยที่สุด คือ ประมาณร้อยละ 10-15 แล้วแต่การศึกษา แต่มีความสำคัญเนื่องจากมักพบในผู้ป่วยอายุน้อย มีการดำเนินโรครุนแรง โอกาสกลับเป็นซ้ำหลังการรักษาเสริมสูงโดยเฉพาะใน 1-3 ปีแรก มีอัตราการรอดชีวิตสั้นกว่า โดยส่วนใหญ่มักเสียชีวิตในช่วง 5 ปีแรก และไม่มีการรักษาเฉพาะจะใช้การรักษาตามแนวทางของมะเร็งเต้านมทั่วไป คือ การให้ยาเคมีบำบัด

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา อาการ อาการแสดง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ การดำเนินโรค และการพยากรณ์โรคของมะเร็งเต้านมเฉพาะชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

<u>มะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ (Triple-negative breast cancer)</u>

มะเร็งเต้านมทริปเปิลเนกาทีฟเป็นมะเร็งเต้านมที่มีต้นกำเนิดมาจาก Basal epithelial cell หรือ Myoepithelial ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ด้านนอกของท่อน้ำนม ทำให้บางครั้งจะเรียกมะเร็งกลุ่มนี้ว่า Basal-like tumors แตกต่างจากกลุ่มที่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมน (Hormonal receptor positive tumor) ซึ่งเกิดจาก Luminal epithelial cell เซลล์ที่อยู่ที่ด้านในของท่อน้ำนม ทำให้ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาต่างกัน โดยกลุ่มนี้จะไม่พบการย้อมติดสีของตัวรับสัญญาณฮอร์โมน (ER, PR) และ HER-2 โดยวิธีทางอิมมูฮิสโตเคมีสตรี้ซึ่งใช้ ย้อมโปรตีนที่แสดงภายในเซลล์และในนิวเคลียส ซึ่งอุบัติการณ์ที่แตกต่างกันในแต่ละการศึกษาขึ้นกับ แอนติบอดี ที่ใช้ และความชำนาญของพยาธิแพทย์ แต่จะพบว่ามีการแสดงของ Myoepithelium ตัวอื่นๆ เช่น Cytokeratin 5/6 และ 17 (CK5, CK6, CK17) สำหรับในทางพยาธิวิทยาพบว่ามีลักษณะ High proliferative rate , High grade, High mitotic count, Scant stromal content, Central necrosis,

Pushing border of invasion,พบ Apoptotic cells บ่อยและมี Stromal lymphocytic responses (19)

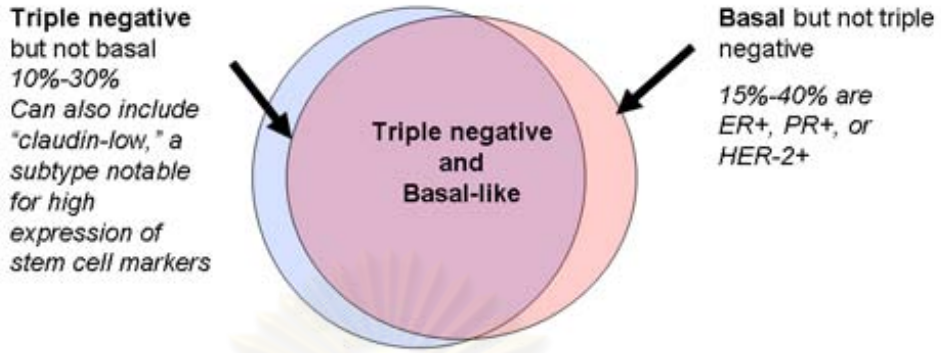
ในผู้ป่วยบางคนพบว่าชิ้นเนื้อที่ตรวจมีการแสดงทั้ง Basal-like tumors และ Luminal tumors จึงเป็นที่มาของความคิดที่ว่ามะเร็งเต้านมเกิดจาก Breast cancer stem cells เดียวกัน

การศึกษาก่อนนี้พบว่า Basal-like tumors มี การแสดงของ p53 protein ในชิ้นเนื้อที่สูง โดยสัมพันธ์กับการมีการกลายพันธุ์ของยีน p53 (p53 mutation) ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 82 ($p < 0.001$) เทียบกับ Luminal tumors ที่พบเพียงร้อยละ 13 (20-21) ซึ่ง ยีน p53 นี้ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ วัฏจักรเซลล์ให้มีการตอบสนองต่อภาวะที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังช่วยซ่อมแซมดีเอ็นเอ และนำเซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตาย (Apoptosis), นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงของ EGFR (Endothelial Growth Factor Receptor) และ C-KIT สูงกว่า Luminal tumors (22-23)

ปัจจุบันมีการจัดกลุ่มมะเร็งเต้านมโดยใช้การเรียงตัวของยีนที่พบในชิ้นเนื้อ (Gene expression profiling) แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ Luminal A และ B, HER-2 positive tumor, Basal-like tumors และ Normal-like tumors ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ส่วนมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ จะคล้ายคลึงกับ Basal-like tumors คือ ไม่พบว่ามีการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมน (ER and PR) และHER-2 แต่บางรายงานพบว่า มีประมาณร้อยละ 5-10 ของ Basal-like tumor ที่มีการแสดงของตัวรับฮอร์โมนได้

มีการศึกษาพบว่าส่วนใหญ่ของ Basal-like tumor เป็นมะเร็งชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ และส่วนใหญ่ (ประมาณร้อยละ 80) ของมะเร็งชนิดทริปเปิลเนกาทีฟก็เป็น Basal-like tumor(24) ดังนั้น ในช่วงแรกจึงมีการใช้ 2 คำนี้ในความหมายเดียวกัน (25-26)

แต่อย่างไรก็ตามจากลักษณะทางคลินิก, ผลจากการตรวจทางอิมมูฮิสโตเคมีสตรี้เพิ่มเติม และข้อมูลจากการตรวจด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์ (Microarray) ทำให้มะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor ไม่ถูกจัดให้เป็นกลุ่มเดียวกัน ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะหลายๆ อย่างใกล้เคียงกัน



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟกับ Basal-like tumor

มะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ และมะเร็งชนิด Basal-like tumors พบประมาณร้อยละ 15 ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด และมักพบว่ามี High histologic grade มะเร็งกลุ่มนี้พบมากในสตรีผิวดำอายุน้อย และยังพบว่ามากกว่าร้อยละ 75 ของมะเร็งเต้านมในสตรีที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 เป็นมะเร็งชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟหรือ Basal-like tumor (2, 27)

เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆแล้ว พบว่ามะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ และมะเร็งชนิด Basal-like tumors มักเกิดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีประจำเดือนเร็ว, น้ำหนักมากในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์, มีบุตรหลายคน และระยะเวลาให้นมบุตรสั้น ซึ่งปัจจัยเสี่ยงบางอย่างกลับตรงกันข้ามกับปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งเต้านมชนิด Luminal tumors โดยเฉพาะ Luminal A ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การเกิดมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ และมะเร็งชนิด Basal-like tumors ที่พบมากในสตรีผิวดำ เป็นผลมาจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและสภาพสังคม (28)

จากข้อมูลการวิเคราะห์การเรียงตัวของยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการแสดงของยีนที่ควบคุมเกี่ยวกับวัฏจักรเซลล์ สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

<u>กลุ่มที่ 1</u> จะมีการแสดงออกของ Matrix metalloproteinase 7, Topoisomerase IIα, mitotic MAD2L1, CDC2 และ Proliferation cell nuclear Antigen ในระดับสูง

กลุ่มที่ 2 มีการแสดงออกของ c-fos, c-jun, fos B, activating transcription factor3, caveolin 1 and 2 , hepatocyte growth factor และ TGF β receptor II ในระดับสูง

สำหรับลักษณะต่างๆของทั้ง 2 กลุ่มย่อยอยู่ในการศึกษาต่อไป (29)

การกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 และมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ และ Basal-like tumor

ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งก่อนอายุ 50 ปี พบว่ามีลักษณะหลายอย่างจากการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้และการแสดงออกทางพันธุกรรมที่ปรากฏให้เห็น (Phenotype) คล้ายคลึงกับมะเร็งเต้านมชนิด Basal-like tumor มาก (30-31)

ลักษณะจากการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ที่เหมือนกันระหว่างกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 และกลุ่ม Basal-like tumor ได้แก่ การแสดงออกของ High molecular weight cytokeratins (CK5,CK14,CK17) ซึ่งมีผลต่อวัฏจักรเซลล์ การมีระดับของ p27 ต่ำ และการมีระดับของ S-phase kinase associated protein 2 (SKP2), cyclin-E, fascin, caveolin 1 และ 2, osteonectin และ caspase 3 ในระดับที่สูงกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ (32-33) มีการศึกษาหนึ่งพบว่าลักษณะอย่างหนึ่งที่พบทั้งในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 และกลุ่ม Basal-like tumor คือ การที่โครโมโซม X ตัวหนึ่งไม่ทำงาน (X-chromosome inactivation) จากการศึกษานี้จึงสรุปว่าการเกิด Chromatin modification น่าจะเป็นลักษณะร่วมที่สำคัญระหว่างมะเร็งเต้านม 2 กลุ่มนี้ (34) ในการศึกษาอื่นๆพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมกลุ่ม Basal-like tumor ที่มีการแสดงออกของยีน BRCA1 ในระดับต่ำ จะมี ID4 (Inhibitor of DNA binding 4) และ BRCA1 silencer ในระดับสูง (32, 35)

จากการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้พบว่า ถึงแม้จะไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 แต่การทำงานของ BRCA1 อาจเปลี่ยนแปลงไปได้เองในกลุ่ม Basal-like tumor (32) โดยที่ระดับของโปรตีน BRCA1 อาจต่ำได้ใน Grade 3 tumor ซึ่งไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนและมีการแสดงออกทางพันธุกรรมที่ปรากฏให้เห็นเหมือนกลุ่ม Basal-like tumor มากที่สุด (36)

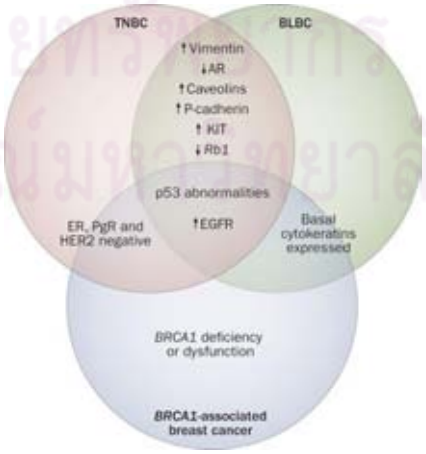
อธิบายได้จากกลไกทาง Epigenetic (คือ ความผิดปกติแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ควบคุมการสร้างโปรตีนนั้นโดยตรง แต่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนอีกทีหนึ่ง) ทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามกลไกนี้เกิดน้อยกว่าการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 มาก จนอาจสรุปได้ว่า มะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 (30-31)

Characteristics	TNBCs	Basal-like	BRCA1 mutation	Others
ทางพยาธิวิทยา				
-ชนิดเซลล์	Ductal carcinoma	Ductal carcinoma	Ductal carcinoma	Variable
-เกรด	ส่วนใหญ่เกรด 3 บางส่วนเกรด 2	ส่วนใหญ่เกรด 3	ส่วนใหญ่เกรด 3	Variable
-Medullary or atypical medullary	พบบางครั้ง	พบบางครั้ง	พบประมาณ 1/8	น้อยมาก
ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้				
-ER	ไม่มี	มักจะไม่มี	มักจะไม่มี	มักจะมี
-PR	ไม่มี	ส่วนใหญ่จะไม่มี	มักจะไม่มี	มักจะมี
-HER-2	ไม่มี	มักจะไม่มี	มักจะไม่มี	มักจะไม่มี
-EGFR	มักจะมี	มักจะมี	มักจะมี	มักจะไม่มี
-CK5 หรือ CK17	มักจะมี	ส่วนใหญ่จะมี	มักจะมี	มักจะไม่มี
-Cyclin-E	มักจะมี	มักจะมี	มักจะมี	มักจะไม่มี

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะของมะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟ, basal-like tumor และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 เทียบกับมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ (37)

Characteristics	TNBCs	Basal-like	BRCA1 mutation	Others
การตรวจทางโมเลกุล				
-p53 mutation	มีบ้าง	พบได้บ่อย	มีเกือบทั้งหมด	พบไม่บ่อย
-ระดับ aneuploidy	สูง	สูง	สูงมาก	Variable
-การเรียงตัวของยีน	มักจะเป็น Basal-like บางครั้งอาจเป็น claudin-low	Basal-like	มักจะเป็น Basal-like	ไม่ใช่ Basal-like
การพยากรณ์โรค				
-ช่วง 5 ปีแรก	ปานกลาง	ไม่ดี	ไม่ดี	ดี
-การกลับเป็นซ้ำในช่วง 10 ปี	น้อย	น้อยมาก	น้อย แต่มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งชนิดอื่นๆ	Variable

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงลักษณะของมะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟ, basal-like tumor และกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 เทียบกับมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ (37)



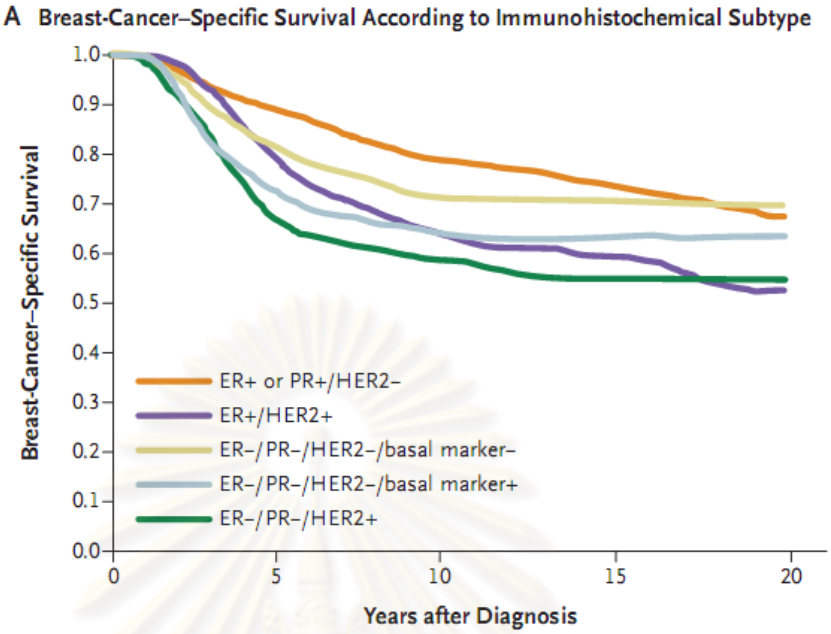
รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ, basal-like tumor และมะเร็งเต้านมที่เกี่ยวข้องกับกลายพันธุ์ของยีน BRCA1

การดำเนินโรค

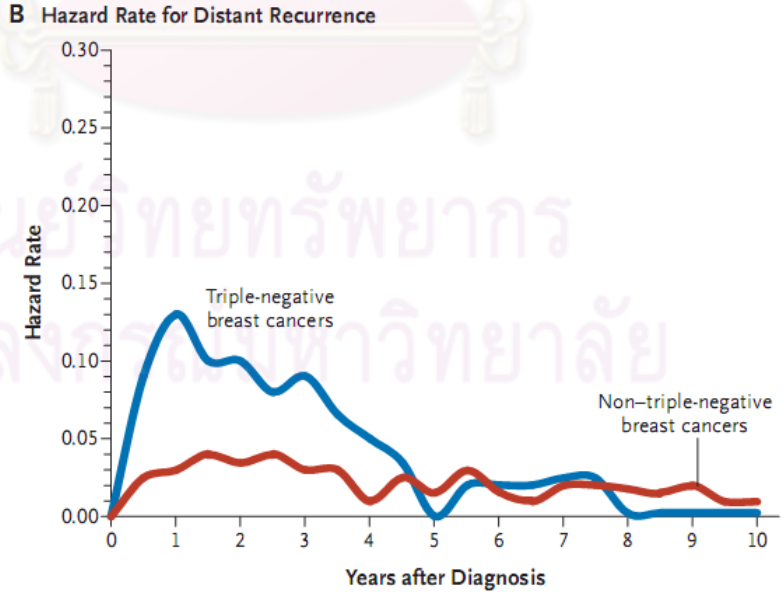
มะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor มีแนวโน้มว่าจะมีขนาดก้อนที่ใหญ่ High grade ละเป็นชนิด Invasive ductal carcinoma มากกว่าเมื่อเทียบกับมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ มีการศึกษาขนาดใหญ่หนึ่งพบว่ามีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองน้อยกว่าชนิดอื่นๆด้วย (38) และยังพบว่าการที่ก้อนมีขนาดใหญ่นี้ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงเช่นเดียวกับมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ (39-40) นอกจากนี้ขนาดก้อนมะเร็งชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมักโตเร็ว ร่วมกับมักเกิดในสตรีอายุน้อย ทำให้การตรวจด้วยเอกซเรย์เต้านมหรือแมมโมแกรมเจอได้ยาก แม้จะตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดได้ดี แต่มีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูงและมีระยะเวลาปลอดโรคหรือปลอดการลุกลามของโรคสั้น

อาการ และ อาการแสดงของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ และ Basal-like tumor รุนแรงกว่า กลุ่มที่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมน มีบางการศึกษาพบว่ามีการดำเนินโรคที่แย่กว่ากลุ่มที่มีตัวรับสัญญาณ HER-2 ด้วย นอกจากนี้พบว่ามีอุบัติการณ์ของการกลับเป็นซ้ำที่อวัยวะสำคัญ (Visceral organs) เช่น ตับ มากกว่า ที่กระดูก , มีการกระจายไปที่สมองมาก, มีการกลับเป็นซ้ำที่ตำแหน่งเดิม (Local relapse) ที่สูงและเร็วกว่ากลุ่มอื่น (41-43)

ลักษณะการดำเนินโรคของมะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ คือ ระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยจะลดลง และอัตราการกลับเป็นซ้ำจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 ปีแรก แต่ในช่วงหลังจาก 5 ปีแล้ว พบว่าเกิดการกลับเป็นซ้ำน้อยกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ (38, 40, 42, 44) และหลังจาก 10 ปีไปแล้วการดำเนินโรคจะคล้ายกับกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER-) ตามภาพ A และ B ซึ่งแสดงการรอดชีวิตและการกลับเป็นซ้ำของโรคตามลำดับ



รูป 2.3 แสดงสัดส่วนการมีชีวิตอยู่ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดต่างๆ



รูป 2.4 แสดงการกลับเป็นซ้ำในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่เป็นและไม่เป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

การรักษา

การรักษาด้วยยาต้านฮอร์โมน (Endocrine therapy) หรือการรักษาเฉพาะต่อต้านตัวรับสัญญาณ HER-2 (Trastuzumab) ไม่ได้ประโยชน์ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังนั้น Systemic treatment ก็ยังคงเป็นการให้ยาเคมีบำบัด แม้ว่าการพยากรณ์โรคจะไม่ดี และการดำเนินโรคเมื่อรักษาด้วยยาเคมีบำบัดจะแย่กว่ามะเร็งเต้านมกลุ่มอื่นๆ (42, 45) แต่ยังพบว่ามะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor มีอัตราการตอบสนองที่สูงต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อตัวรับสัญญาณฮอร์โมน โอกาสที่โรคจะหายไปหมด (Pathologic complete response) หลังได้ยาเคมีบำบัด (Neoadjuvant chemotherapy) เกิดร้อยละ 30-50 เทียบกับร้อยละ 6-10 ในกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อตัวรับสัญญาณฮอร์โมนตามลำดับ

ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟและ Basal-like tumor ที่โรคจะหายไปหมด หลังได้ยาเคมีบำบัดมีการดำเนินและการพยากรณ์โรคที่ดีมากใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อตัวรับสัญญาณฮอร์โมน แต่ในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการให้ยาเคมีตั้งแต่แรกพบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่ากลุ่มอื่น (42) เพราะถ้าการรักษาด้วยยาสูตรแรกไม่ได้ผล โอกาสใช้ยาสูตรอื่นๆก็จะได้ผลน้อยลงด้วย ร่วมกับยังไม่มีการรักษาเฉพาะสำหรับกลุ่มนี้ ซึ่งคงต้องรอการศึกษาต่อไป

ชนิดของมะเร็ง	ทริปเปิลเนกาทีฟ	อื่นๆ	p-value
โรคหายไปหมด (pCR)	22%	11%	0.03
การรอดชีวิตที่ 3 ปีถ้าโรคหายไปหมด	94%	98%	0.24
การรอดชีวิตที่ 3 ปีถ้าโรคไม่หายหมด	68%	88%	0.001

ตารางที่ 2.2 แสดงอัตราการรอดชีวิต (overall survival rate)หลังได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเทียบกับชนิดอื่นๆ (42)

การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด

แบ่งตามลักษณะทางพยาธิวิทยา

การศึกษาข้อมูลย้อนหลังของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด (Neoadjuvant chemotherapy) พบว่าผู้ป่วยที่มีมะเร็งเต้านมชนิด Invasive lobular carcinoma จะพบว่าโรคหายไปหมด (Pathological complete response or pCR) จากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดได้น้อยกว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด Invasive ductal carcinoma (ร้อยละ 3 เทียบกับ ร้อยละ 15, $p<0.001$) แต่ทั้งนี้พบว่าผู้ป่วย Invasive lobular carcinoma มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER-positive) ได้มากกว่า Invasive ductal carcinoma (ร้อยละ 92 เทียบกับร้อยละ 62, $p<0.001$) และเมื่อวิเคราะห์โดยจำแนกเอาปัจจัยของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนออกไปแล้วยังคงพบว่า Invasive lobular carcinoma เป็นปัจจัยการพยากรณ์อิสระต่อการตอบสนองต่อการรักษา (46)

พบว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาอื่นๆ เช่น Poor differentiation, High nuclear grade, High proliferative index ก็เป็นตัวพยากรณ์ว่าจะการตอบสนองต่อการรักษาได้ดี (47)

แบ่งตามลักษณะทางโมเลกุล (Molecular subtype)

การศึกษาของ Sorlie และ Perou (48-49) ได้จำแนกมะเร็งเต้านมตามการเรียงตัวของยีน (Gene expression profile) ออกเป็น 5 ชนิดย่อย ได้แก่ Luminal A, Luminal B, Basal-like, Normal-like และ HER-2 positive subtype โดยพบว่าผู้ป่วยที่ จำแนกตามลักษณะทางโมเลกุลนี้มีการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกันชัดเจน โดยกลุ่มที่มี Basal-like subtype ซึ่งมักจะเป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ และกลุ่มที่มีแสดงของตัวรับสัญญาณ HER-2 (HER-2 positive subtype) ซึ่งมักจะไม่มีตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน จะเป็น 2 กลุ่มที่มีพยากรณ์โรคที่แย่ที่สุด โดยมีระยะเวลาปลอดจากการกลับเป็นซ้ำ (Relapse-free survival) และระยะเวลาการมีชีวิต (Overall survival) ที่สั้นที่สุด ในขณะที่กลุ่ม Luminal-type มีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า

มีการศึกษาถึงลักษณะทางโมเลกุลชนิดต่างๆกับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด (50) โดยทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนในผู้ป่วย 82 รายที่ได้รับการรักษาด้วย Paclitaxel ตามด้วย FAC ก่อนการผ่าตัด ผลการศึกษาพบว่าโรคหายไปหมด (pCR) ได้สูงสุด คือ ร้อยละ 45 ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น Basal-like subtype และกลุ่มที่มีแสดงของตัวรับสัญญาณ HER-2 ส่วนผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมที่เป็น Luminal subtype พบโรคหายไปหมดจากการรักษาดังกล่าวได้เพียงร้อยละ 6 ผลการศึกษานี้ช่วยยืนยันว่าผู้ป่วยที่ไม่มีตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (ER-negative) ซึ่งมักจะพบกับกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น Basal-like และกลุ่มที่มีแสดงของตัวรับสัญญาณ HER-2 จะไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมากกว่าแต่การพยากรณ์โรคโดยรวมในระยะยาวกลับแย่กว่า

ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมด้วยการให้ยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด (Neoadjuvant chemotherapy) เป็นโอกาสที่จะได้ชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็งเพื่อมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน, ตัวบ่งทางชีวภาพ (Biomarkers) ต่างๆ ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร และสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาได้อย่างไร

จากการศึกษาระยะแรกพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเรียงตัวของยีนทั้งหมด (Global gene expression) หลังจากการรักษา (51) และมีการศึกษาที่รายงานต่อมาที่พยายามหาความสัมพันธ์ของลักษณะของยีนที่จำเพาะ(Specific gene profile) กับการตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการใหม่ที่จะนำมาเป็นตัวพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่าปัจจัยอื่นที่มีใช้มาก่อน (52-55) แต่เนื่องจากศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยจำนวนน้อย จึงต้องการการศึกษาเพิ่มเติม ในผู้ป่วยที่มีจำนวนมากพอเพื่อจะได้ผลเป็นที่ประจักษ์และน่าเชื่อถือที่จะนำมาใช้ในทางปฏิบัติได้

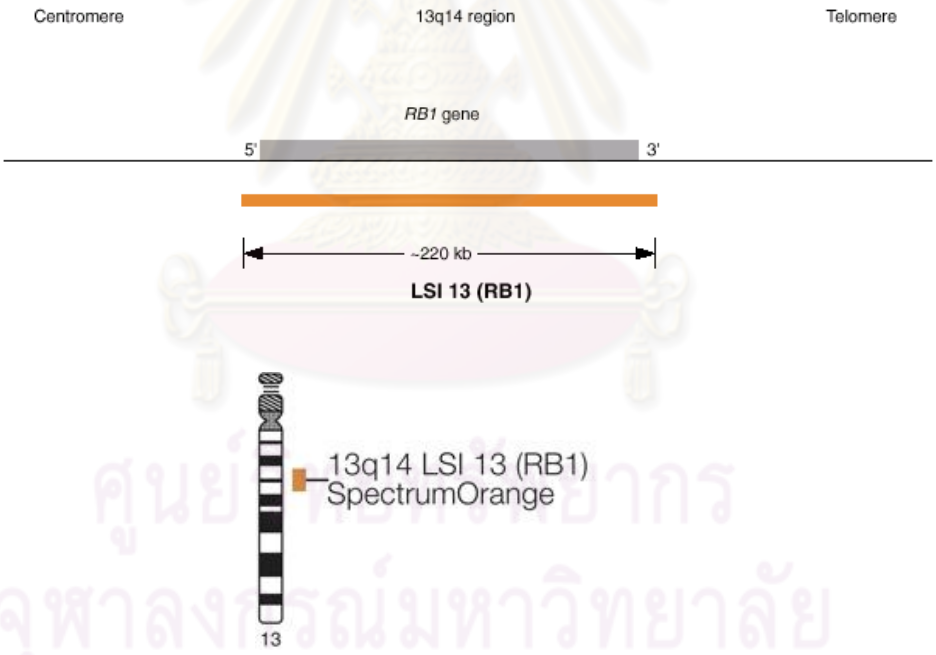
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

โปรตีนเรติโนบลาสโตมา

โปรตีนเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma protein, pRB)

เป็นฟอสโฟโปรตีน (Phosphoprotein) ชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน (Amino acid) 928 ตัว สร้างจากยีน RB1 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่13 ตำแหน่ง 13q14.1-q14.2 ดังรูปที่ 3.1

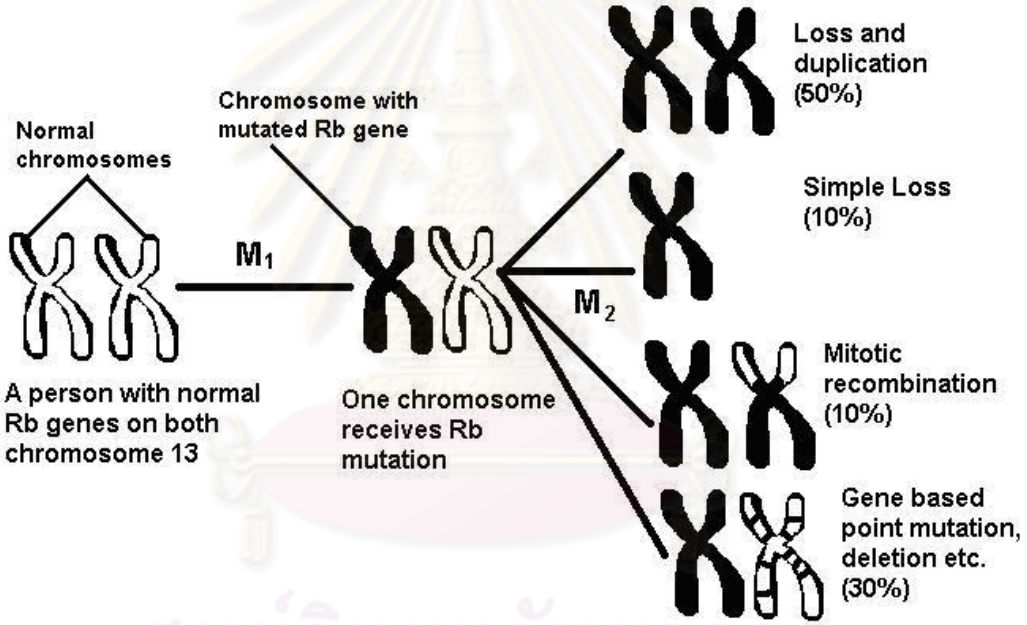


รูปที่ 3.1 โครโมโซมที่ 13

ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) หรือขาดหายไป (Deletion) ขึ้นที่ตำแหน่งนี้ของทั้ง 2 ยีน (Biallellic mutation) จะทำให้ไม่เกิดการสร้างโปรตีนเรติโนบลาสโตมาหรือเกิดการสร้างที่ผิดปกติ

ความผิดปกตินี้พบได้ทั้งจากการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ (Hereditary) และเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเองภายหลัง (Sporadic) ในกรณีที่เกิดจากการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ จะเกิดมะเร็งได้เร็วกว่าเนื่องจากมียีนตัวหนึ่งซึ่งมีความผิดปกติอยู่แล้วตั้งแต่แรก เมื่ออีกยีนเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นภายหลังก็สามารถทำให้เกิดโรคได้เลย

ในทางตรงกันข้ามถ้าโรคเกิดจากการกลายพันธุ์ภายหลัง จะใช้เวลานานกว่า เนื่องจากจะต้องเกิดกับทั้ง 2 ยีน จึงทำให้เกิดโรคหรือความผิดปกติให้เห็น (Knudson 's Hypothesis or Two-hit Hypothesis) (56)



รูปที่ 3.2 Two-hit Hypothesis ของยีนเรติโนบลาสโตมา (57-58)

เซลล์ภายในร่างกายแต่ละเซลล์นั้นมีอายุที่แตกต่างกัน จึงมีอัตราการสร้างเซลล์ใหม่มากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ บางเซลล์ไม่มีการสร้างใหม่เลย เช่น เซลล์ประสาท, เซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งในกลุ่มนี้เซลล์จะอยู่ที่ระยะ G1 เสมอ

วัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) แบงออกเปน 2 ระยะคือ

1. Interphase

เปนระยะที่ไมมีการแบงตัว แบงออกเปน 3 ระยะยอย คือ

1.1 G1 (Gap1) เปนจุดที่สำคัญที่สุดของวัฏจักรเซลล์เนื่องจาก เปนจุดเริ่มตนของการเตรียมพรอมเพื่อการแบงเซลล ดังนั้นเซลลจะตองมีความพรอมที่จะแบงตัว และจะตองไมมีความผิดปกติของยีนในเซลลระยะนี้ เปนระยะพัก เซลลไมมีการทำงานใดๆ ถาหากเซลลมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากถูกกระตุน หรือเหนี่ยวนำ เซลลจะเขาสูระยะ G1 และการเปลี่ยนแปลงนี้จะแตกตางกัน ตามชนิดของเซลล

1.2 S phase (Synthesis) เมื่อเซลลมีสัญญาณที่จะแบงตัว จะเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อให้ เพิ่มจำนวนขึ้น และมีการเตรียมสารต่างๆภายในเซลล์ไว ในระยะนี้จำนวนสารต่างๆภายในดีเอ็นเอจะมากเปน 2 เทาของปกติ สามารถศึกษาไดจาก การย้อมเพื่อหาปริมาณสารในดีเอ็นเอ

1.3 G2 phase เปนระยะภายหลังจากการสร้างดีเอ็นเอ มีการเพิ่มสารประกอบหลักของดีเอ็นเอ เพื่อให้มีความพร้อมมากขึ้นในการแบ่งตัวต่อไป

ระยะ Interphase นี้เปนระยะที่นานที่สุด สำหรับวัฏจักรเซลล์ โครมาตินจะมีลักษณะติดสีจาง (Heterochromatin)

2. M phase

เปนชวงระยะเวลาสั้นๆ ที่เซลลมีการแบงตัว (Mitosis/ Meiosis) ระยะนี้โครมาตินจะจับตัวกันแน่นมากและไมมีการสร้างอาร์เอ็นเอ เนื่องจากโครมาตินจับตัวกันแน่นมาก จนเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) เขาทำงานไมได้

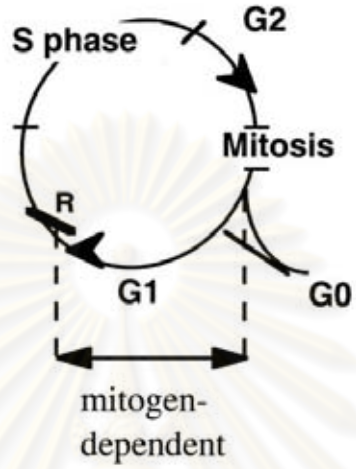
จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาในแตละ Phase จะแตกต่างกัน ดังนี้

G1 ใชเวลา 5 ชม.

S phase ใช้เวลา 7 ชม.

G2 ใชเวลา 3 ชม.

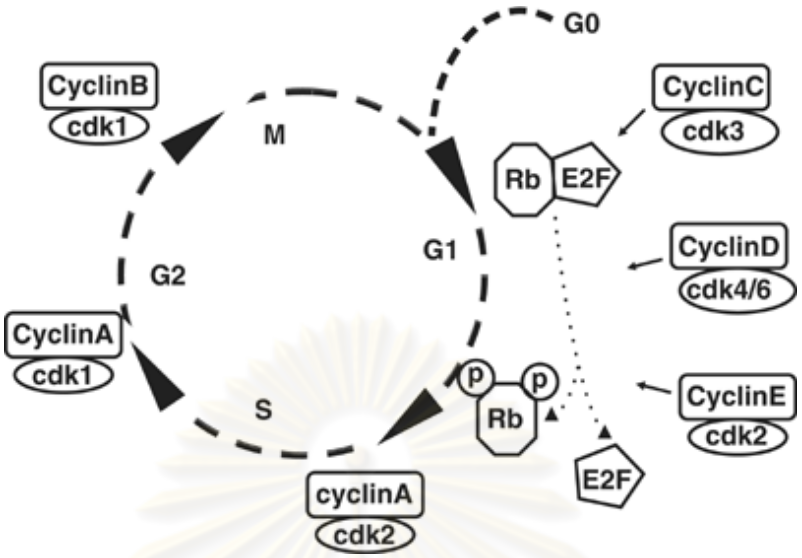
M phase ใชเวลา 1 ชม.



รูปที่ 3.3 วัฏจักรเซลล์

การควบคุมการเขาสูวัฏจักรเซลล์นั้นเราเรียกวา Restriction point (59) เปนการตรวจสอบเซลลใหพรอมกอนการแบงตัวของเซลล และในขั้นตอน G1, G2 และ M phase ของวัฏจักรเซลล์ ก็มีการตรวจสอบเชนกัน เรียกว่า Cell cycle checkpoints โดยมีโปรตีนหลายชนิดที่ควบคุมอยู

โปรตีนเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma protein or pRB) เป็นโปรตีนหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมในตำแหน่งใน G1 checkpoint ของวัฏจักรเซลล์ ทำหนาที่ในการยับยั้ง เซลลที่ผิดปกติไม่ให้เขาสู S phase แลว ทำใหเซลลตาย (Apoptosis) ดังนั้นโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจึงทำหนาที่ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์, การเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (Cell differentiation) และการตายของเซลล์ (Cell apopotosis)

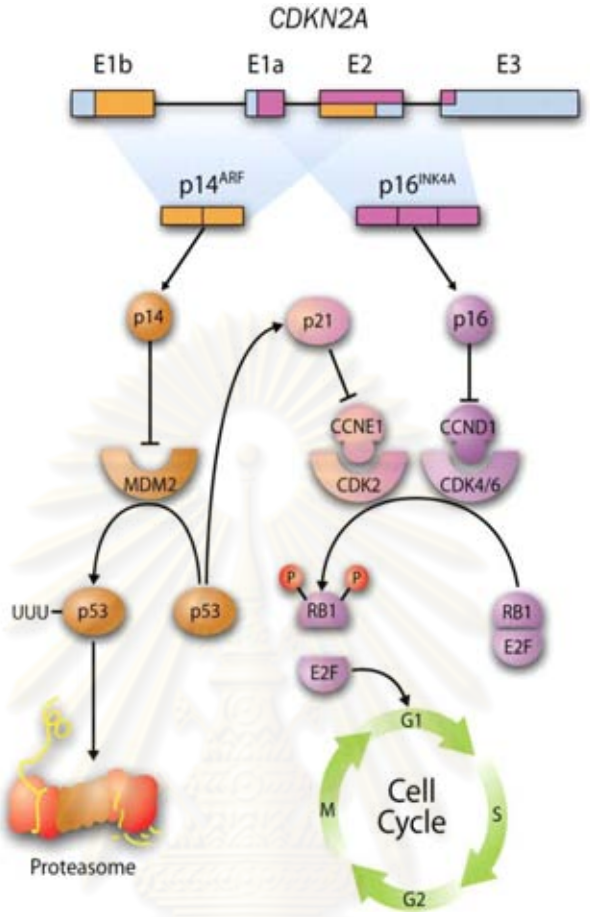


รูปที่ 3.4 แสดง check points ในวัฏจักรเซลล์

ในช่วง G0 และช่วงต้นของ G1 phase โปรตีนกลุ่ม E2F ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการดำเนินต่อไปของวัฏจักรเซลล์และทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ขึ้น จะถูกจับไว้ด้วยโปรตีนเรติโนบลาสโตมาภายในนิวเคลียส ทำให้โปรตีน E2F ไม่เป็นอิสระ และไม่สามารถทำงานได้ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) ให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ทำให้อยู่ในรูปของ Phosphorylated retinoblastoma protein ซึ่งจะปล่อยโปรตีน E2F ให้เป็นอิสระ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ต่อไป

ขั้นตอนการเติมหมู่ฟอสเฟตนี้จะต้องอาศัยโปรตีน Cyclin D จับกับ Cyclin D-cyclin dependent kinase (CDK)-4 และ -6 ซึ่งการทำงานของ CDK-4 และ CDK-6 จะถูกควบคุมจากหลายปัจจัย ได้แก่ ตัวยับยั้ง CDK-4 (INK4) เช่น โปรตีน p15, p16, p21, p57 เป็นต้น โปรตีนเหล่านี้จะควบคุมให้วัฏจักรของเซลล์ดำเนินไปตามปกติ หากโปรตีนเหล่านี้ทำงานไม่สมบูรณ์จะทำให้ไม่สามารถควบ คุมการแบ่งเซลล์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งให้เกิดมะเร็ง (8)

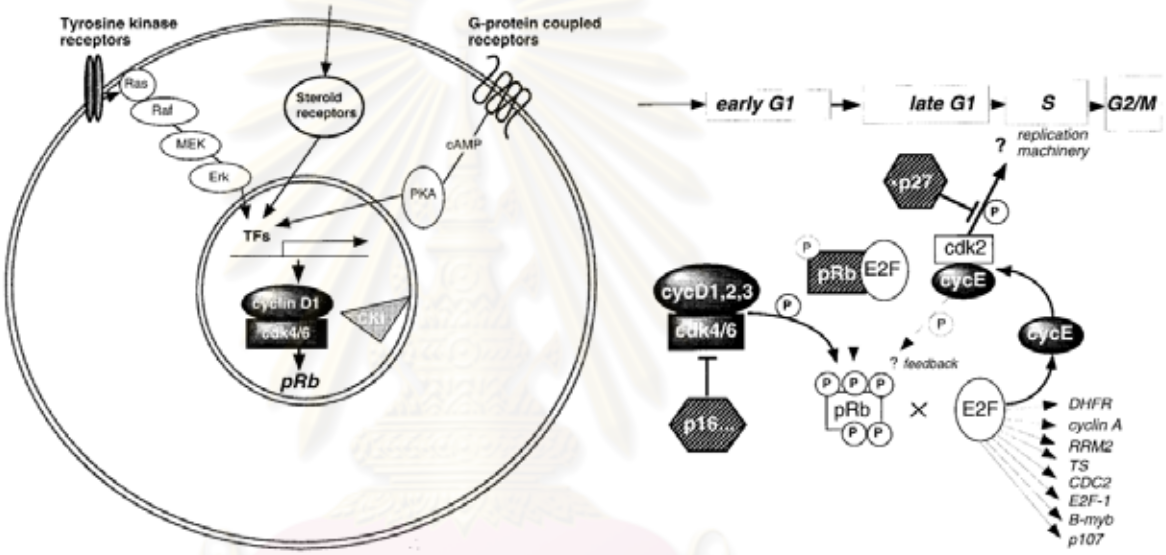
มีข้อมูลจากการศึกษาในอดีตพบว่าการขาดหายไป หรือความผิดปกติของยีน INK4 และยีน RB1 ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนเรติโนบลาสโตมา หรือมีการแสดงออกของยีน Cyclin-D1 หรือ CDK-4 มากเกินไป (60) จะส่งผลให้การสร้างโปรตีนเรติโนบลาสโตมาลดลง ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นคือ ไม่สามารถควบ คุมการแบ่งเซลล์ได้



รูปที่ 3.5 แสดงการควบคุมวัฏจักรเซลล์ในระยะ G1 phase

บทบาทของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา นอกเหนือจากการยับยั้งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม E2F ดังได้กล่าวมาแล้ว ยังสามารถยับยั้งการทำงานของยีนที่สร้าง Cyclin-E ซึ่งช่วยเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมา โดยการเพิ่มระดับของปัจจัยต่างๆที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครมาติน (Chromatin remodeling factors) เช่น เอ็นไซม์ Histone deacetylase 1 (HDAC1) (61) และเอ็นไซม์ Histone methyl transferase (62) ซึ่งทำงานในตำแหน่งที่โปรตีนกลุ่ม E2F จับกับโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (Pocket domain) และในกรณีนี้หน้าที่ของโปรตีน E2F จะกลายเป็นยับยั้งการแบ่งเซลล์แทนที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ตามปกติ (63)

มีหลายการศึกษาที่ให้ผลสอดคล้องกันว่าการทำงานของโปรตีนเรติโนบลาสโตมานั้นเป็นผลมาจากสัญญาณกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Upstream cellular mitogenic signals or Growth-promoting signals) ผ่านตัวรับ (Receptors) 3 ชนิด คือ Membrane tyrosine kinase receptors, Nuclear steroid receptors และ G-protein coupled receptors (64-67)



รูปที่ 3.6 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาผ่านตัวรับต่างๆ

ในทางตรงกันข้าม การทำงานของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาก็ยังถูกควบคุมโดยสัญญาณที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์ (Proliferation inhibitory cascades) เช่น p15 CDK inhibitor จาก TGF-beta (68) และ การลดลงของ Cyclin-D1 จาก cAMP elevating agents (69)

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเรติโนบลาสโตมาและการเกิดมะเร็ง

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์มะเร็ง คือ ความสามารถในการแบ่งตัวภายใต้สภาวะที่เซลล์ปกติไม่สามารถทำได้ ซึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียการควบคุมในวัฏจักรเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ G1 phase และระยะ G1 ต่อ S phase

สาเหตุของการสูญเสียความสามารถในการควบคุมในขั้นตอนดังกล่าว อาจเกิดจากการทำหน้าที่มากเกินไปของยีนสร้างมะเร็ง (Protooncogene) ได้แก่ Cyclin-D, CDK4/6 และ Cyclin-E หรือการทำหน้าที่น้อยเกินไปของยีนยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ได้แก่ p15, p16, p27, p57, CDK inhibitors และ RB1 ซึ่งทำให้มีโปรตีนเรติโนบลาสโตมาลดลงหรือขาดไป

มีมะเร็งหลายชนิดที่สัมพันธ์กับการทำงานลดลงของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา เช่น มะเร็งลูกตาชนิดเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma), มะเร็งของกระดูก (Osteosarcoma) และมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer) เป็นต้น

ในมะเร็งลูกตาชนิดเรติโนบลาสโตมา พบว่าการทำงานน้อยลงของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาเกิดจากการกลายพันธุ์ หรือการขาดยีน RB1 (70)

การติดเชื้อไวรัสบางอย่างมีผลกับการทำงานของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา โดยดีเอ็นเอของไวรัสจะไปจับกับโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในตำแหน่ง Pocker domain ทำให้โปรตีนเรติโนบลาสโตมาไม่สามารถไปจับและยับยั้งการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม E2F ส่งผลให้มีการแบ่งเซลล์ที่มากผิดปกติ เนื่องมาจากไม่มีการควบคุมวัฏจักรเซลล์ และทำให้เกิดมะเร็งขึ้น ตัวอย่างของการเกิดมะเร็งกลุ่มนี้ เช่น การติดเชื้อไวรัสชนิดฮิวเมนแพพิลโลมา (Human papilloma virus) ซึ่งสร้างโปรตีนกระตุ้นการเกิดมะเร็งชนิด E7 (E7 oncoprotein) ที่จะไปจับกับ Pocket domain ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก (71-72) หรือการเกิดมะเร็งปากมดลูก, มะเร็งของเยื่อหุ้มปอด (Mesothelioma) และมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Burkitt (Burkitt's lymphoma) ในผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV virus) (73-76)

การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนเรติโนบลาสโตมาที่มากผิดปกติ จากการทำงานมากเกินไปของ Cyclin-D1 มีความสัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิด เช่น เนื้องอกของต่อมพาราไทรอยด์

(Parathyroid adenoma), มะเร็งต่อมน้ำเหลืองของ B-cell (B-cell lymphomas) และมะเร็งของเยื่อบุผิว (Squamous cell carcinomas) (77)

การสร้าง Cyclin-D1 และ CDK4 ที่มากผิดปกติ (78), การขาดหายไปของตัวยับยั้ง Cyclin-D/CDK (Cyclin-D/CDK inhibitor) และ p16/INK4A ยังพบได้ในมะเร็งเต้านม, มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) รวมทั้งมะเร็งปอดบางชนิด โดยเฉพาะชนิดเซลล์เล็ก (79-80) นอกจากนั้นยังพบการขาดและการกลายพันธุ์ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งหลังโพรงจมูก (Nasopharyngeal carcinoma) อีกด้วย (81)

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าหน้าที่ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา คือ ควบคุมวัฏจักรเซลล์, การแบ่งตัวของเซลล์ และรวมถึงการเจริญของมะเร็ง

มะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟและการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

แม้ว่าจะมีโปรตีนเรติโนบลาสโตมาลดลง จนไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ และเกิดมะเร็งขึ้น แต่มะเร็งเหล่านี้มักจะไวต่อการให้ยาเคมีบำบัด (Chemosensitive tumors) (9) เชื่อว่าเกิดจากการที่ไม่สามารถซ่อมแซม ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจากยาเคมีบำบัดได้ ทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด (1, 10-13)

จากการทบทวนวรรณกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องพบว่า ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต้นที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด CMF (Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-FU) มีเพียงปัจจัยเดียวที่สามารถทำนายการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด คือ การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (Loss of Retinoblastoma protein) ส่วนปัจจัยอื่นๆที่นำมาวิเคราะห์ร่วมด้วย ได้แก่ ขนาดของก้อน (Tumor size), ความรุนแรงของความผิดปกติของชิ้นเนื้อ (Histologic grading), การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง (Nodal involvement), Estrogen receptor status, Progesterone receptor status, ระดับของ p53 ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการเจริญของมะเร็ง, ระดับของ Ki-67 ซึ่งบอกถึงอัตราการแบ่งเซลล์ และ HER-2 status นั้นกลับไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเลย (1)

จากข้อมูลที่มีอยู่ คือ ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมีการดำเนินโรคที่รุนแรง มีการพยากรณ์โรคไม่ดี และตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดีกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้เหมือนกับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา จึงมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมทุกชนิด (5) โดยมีสมมติฐานว่าความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจะพบในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟมากกว่าชนิดอื่นๆ จากการศึกษานี้พบว่าการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาพบมากที่สุดในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ โดยพบถึงร้อยละ 37.7 เมื่อเทียบกับร้อยละ 2.3 ในมะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ ($p<0.001$) และในทางกลับกัน ในกลุ่มมะเร็งเต้านมที่ขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาทั้งหมด พบว่าเป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟถึงร้อยละ 64.5 เทียบกับชนิดอื่นๆรวมกันร้อยละ 35.6 (Luminal A ร้อยละ 6.5, Luminal B ร้อยละ 6.5, ER-/PR-/HER2+ ร้อยละ 22.6) ซึ่งมีสัดส่วนที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p = 0.001$) นอกจากนั้นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมายังตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดได้ดีและมีระยะ เวลาปลอดโรค (Disease free survival) ที่ยาวนานกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโน บลาสโตมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p = 0.008$)

เนื่องจากการวิเคราะห์หายีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเรติโนบลาสโตมาค่อนข้างซับซ้อนและอาจต้องใช้ระยะเวลานาน ในการศึกษานี้ จึงหาโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้แทน ซึ่งทำได้ง่ายกว่าและเหมาะสมกับการนำไปใช้ในสิ่งส่งตรวจจริง โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในการตรวจโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

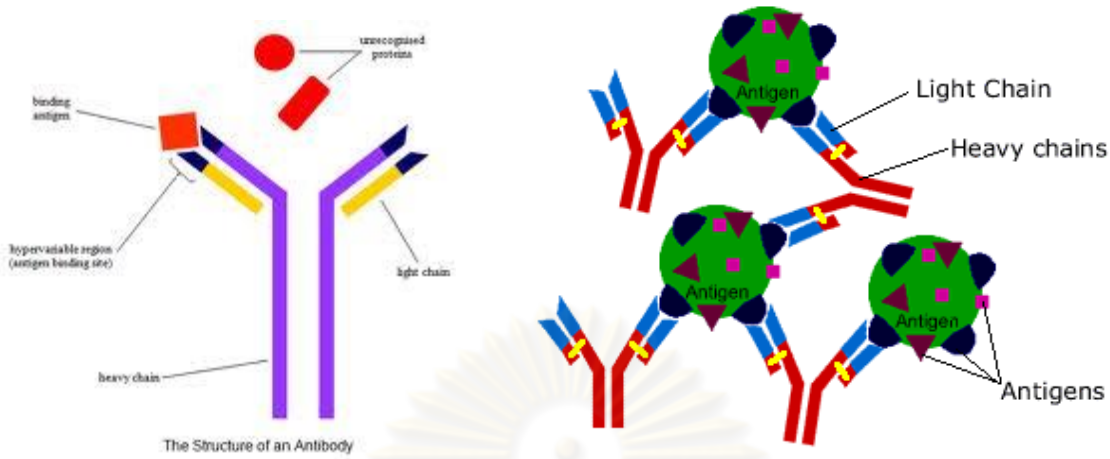
โดยทั่วไป การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา จะย้อมสีฮีมาโตซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin-H&E) ในบางครั้งจำเป็นต้องย้อมสีพิเศษต่างๆ ช่วยในการวินิจฉัย เช่น ย้อม Iron เพื่อศึกษาเหล็กในเนื้อเยื่อ, ย้อม AFB เพื่อศึกษาเชื้อไมโคแบคทีเรียที่ทนกรดได้ดี (Acid fast mycobacteria), ย้อม (Gomori's methenamine silver -GMS) เพื่อศึกษาเชื้อรา แต่จะมีเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอน เช่น ในโรคติดเชื้อ และมะเร็งหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งตำแหน่งและโครงสร้างของเซลล์ ถ้ามีการแพร่กระจายหรือรูปร่างเปลี่ยนไปก็จะทำให้แปรผลได้ยาก จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry) เพื่อตรวจหาแอนติเจน (Antigen) ต่างๆ ทั้งที่อยู่บนผิวเซลล์, ภายในเซลล์ และภายในนิวเคลียส ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ในการวินิจฉัยโรคอย่างแพร่หลาย สามารถตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็ง (Tumour markers), ฮอร์โมน, เอ็นไซม์, โปรตีน, แบคทีเรีย และไวรัส ช่วยพยาธิแพทย์ในการบ่งชี้และแบ่งแยกเซลล์เนื้องอกว่าเป็นเนื้องอกธรรมดา หรือ ชนิดร้ายแรง

อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry) คือ วิธีการตรวจหาแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่อยู่ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยอาศัยหลักของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Antibody) (82)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

แอนติบอดีจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดเกาะกับแอนติเจนอย่างน้อย 2 ด้าน (Antigen binding sites or bivalent) ส่วนแอนติบอดีจะมีตำแหน่งที่สามารถยึดเกาะกับแอนติบอดีได้หลายด้าน (Epitope)



รูปที่ 4.1 แสดงการยึดเกาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี

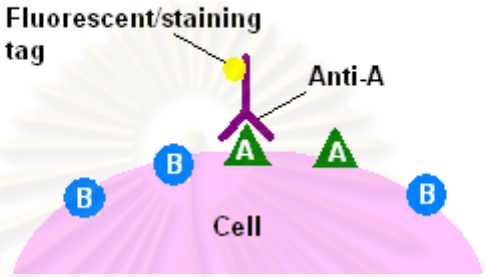
แอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะและแสดงลักษณะของปฏิกิริยารูปต่างๆ ออกมา บางกรณีสามารถก่อให้เกิดผลที่มองเห็นได้ เช่น เป็นตะกอน หรือมีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนขึ้น และบางกรณีจะต้องมีการติดฉลากที่แอนติเจน หรือแอนติบอดีด้วยสารบางชนิดที่ทำให้เห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจนขึ้น (83-84)

ระยะแรก การศึกษาทางอิมมูโนสำหรับชิ้นเนื้อมีเฉพาะวิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเป็นการใช้สารเรืองแสง (Fluorescein) ติดกับแอนติบอดี วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เนื้อสด, ต้องตัดด้วยเครื่อง cryostat และต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เท่านั้น นอกจากนี้ สารเรืองแสงจะเสื่อมสภาพเมื่อถูกแสงสว่าง ต้องเก็บสไลด์ในตู้เย็น และเก็บได้ไม่นาน จะเก็บได้เฉพาะรูปถ่ายเท่านั้น

ในระยะต่อมา มีการค้นคว้านำเอ็นไซม์มาเชื่อมติดกับแอนติบอดีเพื่อใช้แทนสารเรืองแสง ซึ่งเมื่อเอ็นไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น(Substrate) คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เมื่อหยดสารที่ทำให้เกิดสี (Chromogen) จะปรากฏสีตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีแอนติบอดีไปจับอยู่กับแอนติเจน วิธีนี้สามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และศึกษาจาก Paraffin section ได้ และสามารถเก็บสไลด์เป็นสไลด์ถาวรได้

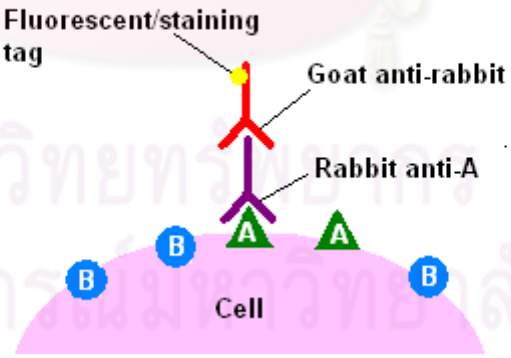
วิธีนี้แบ่งเป็น 2 แบบ ใหญ่ๆ ได้แก่

1. Direct method ทำโดยการใช้ แอนติบอดีที่เชื่อมกับเอ็นไซม์ (horse radish peroxidase หรือ alkaline phosphatase) มาจับกับแอนติเจน แล้วทำให้เกิดสี วิธีการนี้จะมีความไว (sensitivity) น้อย



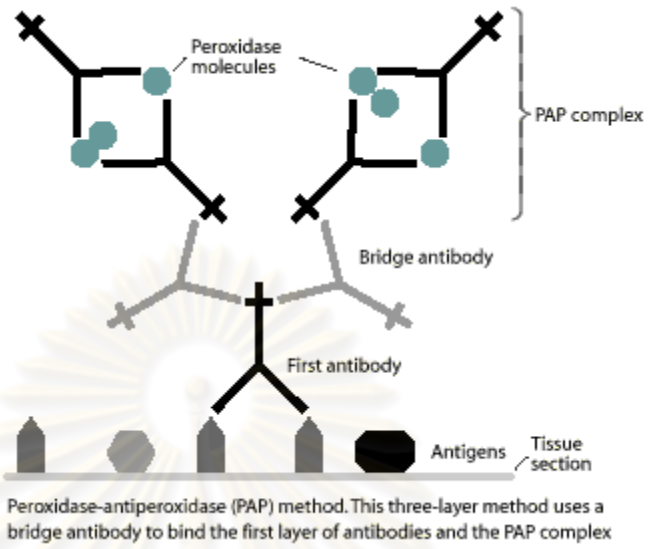
รูปที่ 4.2 Direct method

2. Indirect method ใช้แอนติบอดี สองชนิด ชนิดแรก (Primary antibody) จะมีความจำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการจะตรวจหานั้นๆ โดยแอนติบอดีชนิดที่สอง (Secondary antibody) จะเชื่อมกับเอ็นไซม์ไว้แล้ว วิธีการนี้ทำให้ความไวดีขึ้น



รูปที่ 4.3 Indirect method

2.1 Unlabelled antibody method เป็นการใช้แอนติบอดีชนิดที่สองเป็นสะพานเชื่อมระหว่างแอนติบอดีชนิดที่แรกกับแอนติบอดีชนิดที่สามที่มีกลุ่มของเอ็นไซม์เชื่อมอยู่ วิธีการนี้ได้แก่ Peroxidase antiperoxidase complex (PAP), Alkaline phosphatase angti-alkaline phosphatase complex (APAAP)



รูปที่ 4.4 PAP method

2.2 (Strept)avidin-biotin technology เป็นวิธีการที่อาศัยคุณสมบัติในการจับตัวกันของอวิดิน(avidin) และไบโอติน (biotin) ที่จะยึดตัวกันอย่างแน่นหนาและจำเพาะเจาะจง

อวิดินเป็นส่วนประกอบของไข่ขาว มีโครงสร้างเป็นรูปสี่เหลี่ยมมี 4 หน่วยย่อย ที่จะให้ไบโอตินเกาะได้

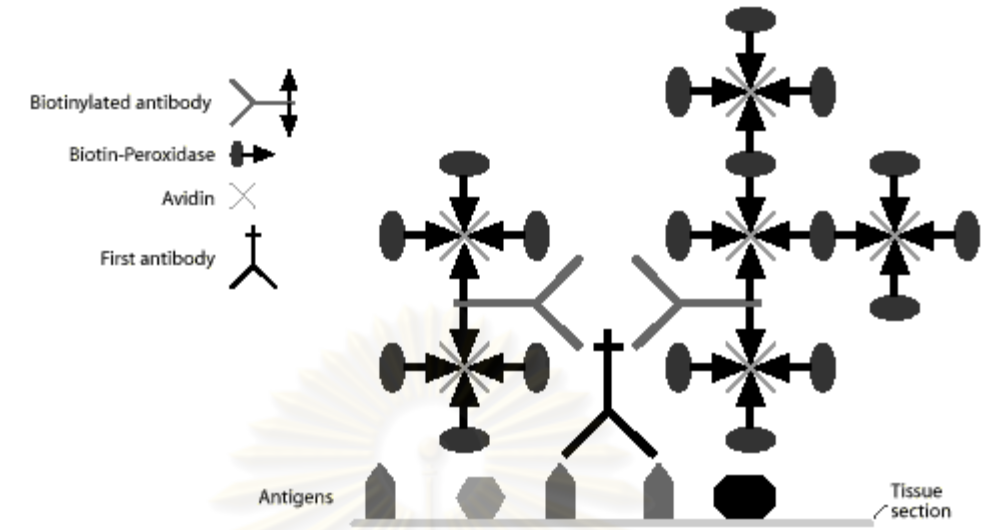
ไบโอติน เป็นวิตามินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Low molecular weight vitamin) ซึ่งสามารถเชื่อมกับแอนติบอดีและเอ็นไซม์ได้ง่าย จึงทำให้สามารถใช้ไบโอตินเชื่อมกับแอนติบอดีตัวที่สองและสร้าง Avidin biotin enzyme complex เพื่อใช้แทน PAP หรือ APAAP complex

ตัวอวิดินจะมีน้ำตาลโมเลกุลเล็ก(Oligosaccharide residue) ของไข่ขาวติดมาด้วย สารตัวนี้มักจะไปจับกับเลซิทิน(lecithin)บนเนื้อเยื่อได้ ทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะ จึงมีการทดแทน อวิดิน ด้วยสารสเตรปตาวิดิน(Streptavidin)ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* สารตัวนี้ไม่มีน้ำตาลโมเลกุลเล็กและสามารถจับกับไบโอตินเช่นเดียวกับอวิดิน

วิธีการนี้ ได้แก่ - Avidin-biotin complex (ABC) method

- Labeled avidin-biotin (LAB) method

- Labeled streptavidin-biotin (LSAB) method



Avidin-biotin complex (ABC) method. The binding of the second layer of antibodies (biotinylated antibodies) to the avidin-biotin-peroxidase complex relies on the strong affinity between avidin and biotin

รูปที่ 4.5 Avidin-biotin complex (ABC) method

2.3 Chain polymer-conjugate Technology เป็นเทคนิคที่ใช้เอ็นไซม์, แอนติบอดีตัวแรกและตัวที่สอง มาติดบนโมเลกุลของเด็กซแทรน(Dextran) โดยที่ 1 โมเลกุลของเด็กซแทรน สามารถติดเอ็นไซม์ได้อย่างน้อย 70 โมเลกุล พร้อมกับแอนติบอดีอีก 10 โมเลกุล ด้วยเหตุนี้ เทคนิคนี้จึงช่วยเพิ่มความไว ลดเวลาและขั้นตอนในการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ได้

เนื่องจากเทคนิคนี้ไม่มีการใช้อวิดินและไบโอตินจึงไม่ทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะจากไบโอตินภายในเซลล์เอง

<u>สิ่งส่งตรวจ</u>

สิ่งส่งตรวจที่สามารถนำมาตรวจด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้มีหลายชนิด ดังนี้

- Fresh frozen sections
- Cytological preparations
- Formalin-fixed, paraffin-embedding specimens
- Fine-needle aspiration (FNA) specimens

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (การเตรียมชิ้นเนื้อจาก Paraffin Sections)

1. การตรึงชิ้นเนื้อ (Fixation and Embedding)

ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องผ่านการเตรียมชิ้นเนื้อที่ดี จะต้องรักษาคุณสมบัติของแอนติเจนในตัวอย่างนั้นไว้

การตรึงชิ้นเนื้อ (Fixation) เป็นการรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งรักษาสภาพของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาให้อยู่ในสภาพเดิม หรือหลีกเลี่ยงการทำลายต่อสิ่งจำเพาะที่กำหนดความเป็นแอนติเจน (Antigen determinant) หรือ Epitope ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติของแอนติเจนนั้นๆ บางชนิดอาจทนกับ Fixative ชนิดหนึ่ง แต่อาจจะไม่ทนต่อชนิดอื่นๆ หรือแอนติเจนหลายๆ ตัวอาจถูกทำลายโดย Fixative ทุกชนิด เมื่อต้องการศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้จะต้องย้อมจากเนื้อเยื่อที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ อีกทั้งเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ผ่านการตรึง แอนติเจนอาจจะหายไปหรือกระจายไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือเนื้อเยื่อที่ถูกตรึงนานเกินไปอาจจะเกิด Cross-linking ทำให้แอนติเจนถูกปิดบัง (Masking) หรืออาจถูกทำลาย เป็นบางส่วน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ Fixative และระยะเวลาการตรึงชิ้นเนื้อ ปัจจุบันยังไม่มี Fixative ชนิดใดที่เหมาะสำหรับแอนติเจนทุกชนิด

ฟอร์มาลินร้อยละ10 หรือ 10% neutral buffer formalin เป็น Fixative ซึ่งใช้กันแพร่หลาย ระยะเวลาในการตรึงเนื้อเยื่อโดยสมบูรณ์จะประมาณ 18-24 ชั่วโมง Fixative ขนาดของชิ้นเนื้อที่เหมาะสมคือ 10x10x3 มิลลิเมตร ใช้เวลา 6-8 ชั่วโมง ผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติโดยผ่านน้ำยาเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์(Alcohol), อะซิโตน(Acetone), ไซลีน (Xylene), พาราฟิน(Paraffin) และนำชิ้นเนื้อนั้นมา ยึดด้วยพาราฟิน ซึ่งอุณหภูมิไม่ควรเกิน 56 องศาเซลเซียส

2. การตัดชิ้นเนื้อ (Sectioning of tissue)

ตัด Paraffin section ด้วยเครื่อง Microtome หนา 3 ไมครอนลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิประมาณ 43 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุด รอให้ section แห้งสนิทแล้ว นำเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3. การล้างพาราฟินออก (Deparaffinization and Rehydration)

คือ การล้างพาราฟิน ที่เคลือบชิ้นเนื้อที่ตัดด้วยไซลีนแล้วผ่านไปยังแอลกอฮอล์ จากเปอร์เซ็นต์สูงไปต่ำแล้วแช่ในน้ำกลั่น ไม่ควรปล่อยให้สไลด์แห้ง

หากมีความจำเป็น สามารถเก็บสไลด์ชิ้นเนื้อนี้ ที่ 2-8 องศาเซลเซียส ในBuffer ได้นานถึง 18 ชั่วโมง โดยก่อนใช้ให้นำมาวางที่อุณหภูมิห้อง 20-25 องศาเซลเซียส ก่อนการย้อมต่อไป โดยไม่รบกวนผลการย้อม

4. การยับยั้งเอ็นไซม์อื่นๆ (Blocking Endogenous Enzyme)

เอ็นไซม์ที่มีอยู่ในสไลด์ชิ้นเนื้อ จะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่จำเพาะ คือไม่ได้เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ต้องยับยั้งก่อนทุกครั้ง มิฉะนั้น จะทำให้เกิดผลบวกผิดพลาด หรือ Background staining เอ็นไซม์ส่วนใหญ่พบในเม็ดเลือดขาว, เม็ดเลือดแดง และเซลล์ตับ ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดยใช้สารตั้งต้น(Substrate) ของมันคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 ในน้ำ หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.5 ในเมทานอล (Methanol) 10-30 นาที แล้วแต่ชนิดของชิ้นเนื้อ

5. การคืนสภาพแอนติเจน (Antigen Retrieval Technique)

เป็นการคืนสภาพแอนติเจนหรือเพิ่มความเป็นแอนติเจนของเนื้อเยื่อต่างๆ เนื้อเยื่อซึ่งตรึงด้วยฟอร์มาลินซึ่งเป็น Cross-linking fixative จะทำให้เกิดการจับตัวกัน (Bridging) ระหว่างกรดอะมิโนภายในโมเลกุลเดียวกันและจับตัวกับโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง ขบวนการนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญที่เชื่อว่าเป็นตัวการในการยับยั้งไม่ให้แอนติบอดีเข้าไปจับกับแอนติเจนได้ ขบวนการนี้เรียกว่า Masking of antigen

ในการทำอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้จึงจำเป็นที่จะต้องแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ การคืนสภาพแอนติเจนจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการ De-masking protein ที่ Antigenic determinant ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อนั้นๆ มาย้อมโดยวิธีอิมมูพยาธิวิทยาทำให้การย้อมติดสีดีขึ้น

วิธีการคืนสภาพแอนติเจน สามารถทำได้ หลายวิธี ได้แก่

5.1 ***โดยใช้เอนไซม์(Enzymatic unmasking technique)***

เนื่องจากการตรึงชิ้นเนื้อด้วยฟอร์มาลินจะทำให้เกิดพันธะระหว่างโปรตีน (Aldehyde linkage หรือ Methylene bridge) เกิดการเชื่อมกันของโปรตีน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงหรือปิดบังตำแหน่งที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนของโปรตีนบางชนิด การใช้เอ็นไซม์ย่อยพันธะดังกล่าวจะช่วยคืนสภาพของแอนติเจนหลายชนิด ทำให้การย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ติดสีดีขึ้น แต่ก็ไม่สามารถใช้ได้ดีกับแอนติเจนทุกชนิดได้ เพราะแอนติเจนบางชนิดไม่สามารถคืนสภาพได้ด้วยการใช้เอ็นไซม์ย่อย โดยเฉพาะชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินเป็นเวลานาน โดยใช้เอ็นไซม์ที่นิยมใช้คือ โปรตีเอส (Protease), ทริปซิน(Trypsin), เปปซิน(Pepsin), โปรตีเนสเค(Proteinase K), โปรเนส(Pronase)

5.2 ***โดยวิธีการทางฟิสิกส์ (Physical methods)***

คือการใช้ความร้อน (Heat induced antigen retrieval - technique) โดยการทำให้เดือดในสารละลายโลหะหนัก ซึ่งมีผลทำให้แอนติเจนหลายชนิดซึ่งย้อมได้ยาก หรือย้อมไม่ได้เลยในชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินสามารถย้อมติดสีได้ ต่อมามีการนำความร้อนจากแหล่งต่างๆ เช่น ไมโครเวฟ, หม้ออัดแรงดัน, เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค, ตู้อบ, เตาไฟฟ้า

5.3 ***โดยใช้ทั้งเอ็นไซม์และความร้อนร่วมกัน***

ใช้สำหรับแอนติบอดีบางชนิด

นอกจากนี้ แอนติบอดีหลายชนิดซึ่งเดิมจำเป็นต้องใช้กับชิ้นเนื้อสดเท่านั้น เมื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธีนี้ สามารถนำแอนติบอดีนั้นมาใช้กับพาราฟินบล็อกได้ด้วย

การเลือกใช้วิธีคืนสภาพแอนติเจน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ต้องการศึกษา และ ขึ้นกับเครื่องมือที่มีใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ ไม่ว่าจะเลือกใช้วิธีใด สิ่งที่สำคัญคือจะต้องปรับเวลาที่ใช้ในการคืนสภาพ, ชนิด และความขอเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ให้เหมาะสม

6. การยับยั้งปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (Blocking of nonspecific reaction)

การจับการอย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยา Hydrophobic bonding ระหว่างอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) กับโปรตีนในเนื้อเยื่อ ทำให้แอนติบอดีตัวแรก และบางส่วนของแอนติบอดีตัวที่สองจับกับเนื้อเยื่อโดยตรง ได้ดีพอๆ กับแอนติเจนเป้าหมาย แก้ไขโดยใช้โปรตีนยับยั้ง(blocking protein) ซึ่งอาจทำโดยเติมลงในแอนติบอดี หรือ แยกขั้นตอนออกไป โดยใช้ซีรั่มของสัตว์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมแอนติบอดีตัวที่สองหรือ 2-5% Bovine serum albumin (BSA) ปัจจุบัน นิยมใช้ซีรั่มที่ไม่มีโปรตีนยับยั้ง(Serum free protein block) มากกว่าการเติมอิมมูโนโกลบูลินเข้าไป

7. การใช้แอนติบอดีตัวแรก (Primary Antibody)

มีทั้งโพลีโคลนอล (Polyclonal) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies) ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนและความไวของวิธีการย้อมที่ใช้ ไม่สามารถกำหนดให้เป็นมาตรฐานตายตัวไปได้ว่าจะใช้ความเข้มข้นเท่าใด ต้องทดสอบกับตัวควบคุมที่เป็นบวก (Positive control) ซึ่งควรเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้ผลการย้อมติดสีชัดเจนและติดพื้นหลังน้อยที่สุด หรือไม่มีเลย

8. การใช้แอนติบอดีตัวที่สอง (Secondary Antibody or Linking Antibody)

แอนติบอดีตัวที่สองต้องมีคุณสมบัติที่จะจับกับแอนติบอดีตัวแรก และสารประกอบของเอ็นไซม์กับแอนติบอดี(Enzyme Immune Complex) เป็น Peroxidase-conjugated antibody โดยเตรียมจากสัตว์ชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมแอนติบอดีตัวแรก

9. วิธีการตรวจหา (Detection System)

คือการตรวจหาสารประกอบของแอนติเจนและแอนติบอดี (Antigen-antibody complexes) ที่เกิดขึ้น วิธีที่ใช้ได้แก่ Soluble Enzyme Immune Complex Method

Peroxidase-antiperoxidase Complex (PAP) วิธีนี้อาจเรียกว่า Unlabelled antibody method โดยใช้ Enzyme-antienzyme immune complex ที่ละลายน้ำได้ ประกอบไปด้วยเอ็นไซม์

เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase Enzyme) 3 โมเลกุล และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 โมเลกุล

ลำดับขั้นตอนการย้อมได้แก่ แอนติบอดีตัวแรกที่ยังไม่ถูกเชื่อมต่อ (Unconjugated primary antibody), แอนติบอดีตัวที่สอง (Secondary antibody), Soluble enzyme-antienzyme complex และสารละลายของตัวตั้งต้น (Substrate solution) ทั้งนี้ แอนติบอดีตัวแรกและแอนติบอดีในสารประกอบของเอ็นไซม์กับแอนติบอดี (Enzyme Immune Complex) จะต้องเตรียมมาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน ทำให้แอนติบอดีตัวที่สองสามารถเชื่อมติดกับทั้งสองส่วน จึงมักเรียกแอนติบอดีตัวที่สองว่าเป็น Link antibody ซึ่งจะต้องจำเพาะกับอิมมูโนโกลบูลิน ของสัตว์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้เตรียม แอนติบอดีตัวแรกและสารประกอบของเอ็นไซม์กับแอนติบอดี อีกทั้งแอนติบอดีตัวที่สองจะต้องใส่ลงไปในปริมาณที่เกินไว้เพื่อให้ Fab sites จับกับ แอนติบอดีตัวแรกและ Fab site อิสระ ก็จะจับกับแอนติบอดีในสารประกอบของเอ็นไซม์กับแอนติบอดี

10. สารตั้งต้นและสารที่ทำให้เกิดสี (Substrate and Chromogen)

สารตั้งต้นที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพื่อให้ได้สีต่างๆ สำหรับเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide or H_2O_2)

สารที่ทำให้เกิดสีที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น

- 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) สีน้ำตาล ไม่ละลายน้ำ, แอลกอฮอล์ และไซลีน การติดสีคงทนถาวร

- 3 Amino-9-ethyl carbazole (AEC) ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายสีแดง ละลายในแอลกอฮอล์ และไซลีนโดย สีแดงของ AEC จะจางลงเมื่อโดนแสงสว่างหรือไว้นาน ฉะนั้นจึงต้องเก็บเป็นรูปถ่ายไว้

- Phenylene diamine dihydrochloride/pyrocathechol (Hanker Yates reagent) ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายสีน้ำเงินดำ ไม่ละลายในน้ำ, แอลกอฮอล์ หรือไซลีน

- 4-Chloro-1-naphthol(CN) ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายสีน้ำเงินดำ ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์

11. การย้อมสีเพื่อให้เห็นชัดเจนขึ้น (Counterstain)

เป็นการย้อมเนื้อเยื่อที่ไม่ติดสีจากปฏิกิริยาอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี Counterstain ทำให้เห็นโครงสร้างเนื้อเยื่อชัดเจนและเปรียบเทียบกับส่วนที่ติดสีจากปฏิกิริยาอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ สี Counterstain ที่นิยมใช้ เช่น Hematoxylin, Methyl green, Nuclear fast red เป็นต้น

12. สารที่ใช้ในการเก็บรักษา (Mounting Media)

การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ทำให้เกิดสี

12.1 สารที่ทำให้เกิดสีซึ่งละลายในแอลกอฮอล์ใช้ตัวกลางที่มีน้ำเป็นพื้นฐาน (Aqueous base medium) เช่น Glycerol, Gelatin

12.2 สารที่ทำให้เกิดสีซึ่งไม่ละลายในแอลกอฮอล์ใช้ตัวกลางที่มีตัวทำละลายเป็นพื้นฐาน (Solvent base medium) เช่น Permount

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วัสดุและวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) หมายถึง ผู้ป่วยสตรีชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population) หมายถึง ผู้ป่วยสตรีชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟของหน่วยมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปีพ.ศ.2549-2553

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

เป็นผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ จากการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ด้วยวิธี Core needle biopsy, การดูดชิ้นเนื้อมาตรวจด้วยเข็มเล็ก (Fine Needle Biopsy or FNA) หรือชิ้นเนื้อที่ได้ภายหลังจากการผ่าตัด และมีการย้อมพิเศษวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ไม่สามารถหาชิ้นเนื้อเดิมมาตรวจเพิ่มเติมได้
2. ชิ้นเนื้อที่มีอยู่ไม่สามารถนำมาตรวจอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ได้

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ใช้วิธีคำนวณขนาดตัวอย่างโดยสูตรหาขนาดตัวอย่างสำหรับการประมาณค่าสัดส่วนหรือร้อยละของกลุ่ม เมื่อไม่ทราบจำนวนประชากร หรือประชากรมีขนาดใหญ่

$$n_0 = \frac{Z^2 p(1-p)}{e^2}$$

เมื่อ n_0 = ขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้

z = ค่าที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐาน(standard normal distribution) ถ้าใช้ระดับความเชื่อมั่น 90% ชนิด 2 หางแล้ว Z= 1.64

p = ค่าสัดส่วนที่ประมาณไว้

e = ค่าความคลาดเคลื่อนที่จะยอมรับได้ (allowable error) กำหนดเป็น 0.10

จากการทบทวนวรรณกรรม ข้อมูลจากการศึกษาพบว่าความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ คือ 0.37 (5)

$$n_0 = \frac{(1.64)^2 \text{x } 0.37(1\text{-}0.37)}{(0.10)^2}$$

เมื่อกำหนดค่า α= 0.10 , Power ที่ 90% จะได้ค่า n = 63 คน

แต่เนื่องจากการศึกษามีความเสี่ยงต่อการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ที่มีคุณภาพไม่ดีพอจะนำไปวิเคราะห์ผล จึงกำหนด n เพิ่มอีก 10% ดังนั้นจึงใช้ n = 70

วิธีการศึกษา

1. บันทึกข้อมูลอายุ ประวัติการรักษา ผลชิ้นเนื้อ รวมทั้ง ผลการย้อมชิ้นเนื้อทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่างๆ
2. ส่งชิ้นเนื้อเดิมจากการผ่าตัด ย้อมหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้
3. การแปลผลการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยพยาธิแพทย์คนเดียวกันทุกตัวอย่างที่ส่งตรวจ

   3.1 ***Positive*** : มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาเกรด 1+ ถึง 4+

   3.2 ***Negative*** : ไม่มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (เกรด 0)
4. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

1. เก็บข้อมูลจากหน่วยมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยข้อมูลทั้งหมดจะได้รับการบันทึกลงในแบบเก็บข้อมูลดังภาคผนวก
    - ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย
    - ข้อมูลของโรค
    - การรักษาที่ได้รับ
    - ผลการรักษา และการดำเนินโรค
2. ผู้เก็บข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย
3. ผู้บันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ความแตกต่างของตัวแปรแต่ละอย่าง จะนำมาคำนวณทางสถิติโดยใช้ Chi-square test
2. คำนวณระยะเวลาปลอดโรค (Disease Free Survival) หรือปลอดการลุกลามของโรค (Progression Free Survival) ด้วยวิธี Kaplan–Meier และเปรียบเทียบ DFS/PFS curves ด้วย Log-rank test
3. คำนวณค่าทางสถิติทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS statistical software package version 16.0 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL)
4. ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ p <0.05

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

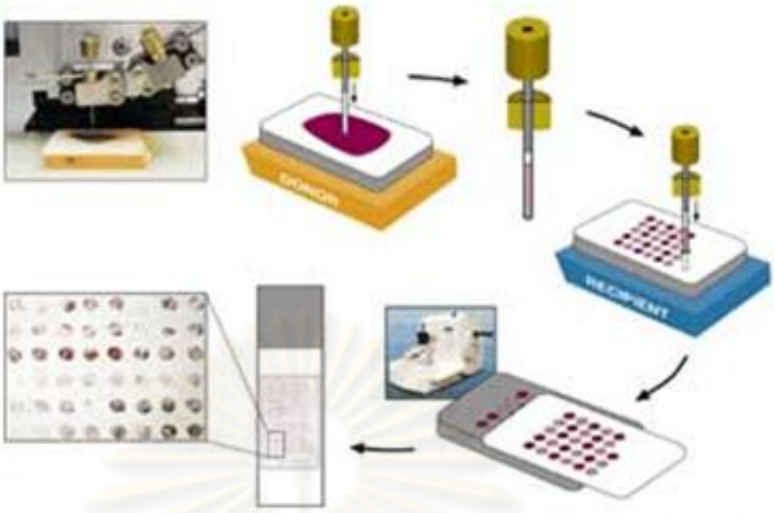
วิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ที่ใช้ในการศึกษานี้

ตัวอยางที่นำมาศึกษาได้มาจากบล็อกชิ้นเนื้อและสไลดของผูปวย 72 รายซึ่งส่งตรวจที่ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และไดรับการวินิจฉัยวาเปนมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

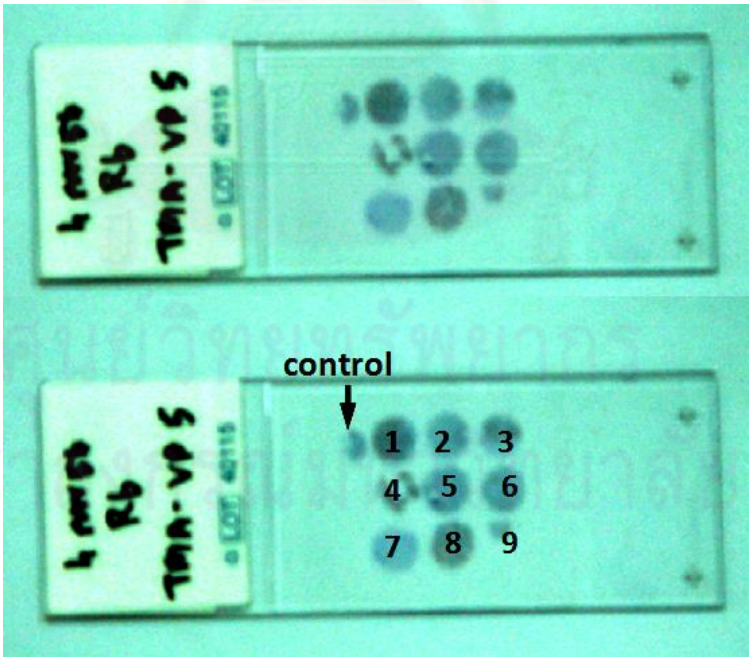
การศึกษานี้เตรียมสไลด์ด้วยเทคนิคไมโครแอเรย (Tissue microarray technique or TMA) ซึ่งทำได้โดยการเจาะบล็อกชิ้นเนื้อสวนที่เปนเนื้องอก (Core) แลวนำไปฝงไวในบล็อกชิ้นเนื้อเปลาที่เจาะชองไว ซึ่งในการศึกษานี้ 1 บล็อกเปลาจะฝงได 10 ชองโดย 9 ชองจะเปนเนื้อเยื่อที่ใชในการศึกษา 1 ชองตอ 1 ราย สวนช่องสุดท้ายจะเปนเนื้อเยื่อเต้านมปกติ ซึ่งเปน Positive control และเป็นจุดอ้างอิงในการอ่านชิ้นเนื้อ ดังรูปที่ 6.2

ในการศึกษานี้บล็อกชิ้นเนื้อจากการเตรียมด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์ จะถูกตัดเพื่อยอมสีฮีมาโตซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin-H&E) และตรวจยืนยันทางกลองจุลทรรศนวามีเนื้องอกอยูในทุกช่องที่ตัดมาแลวจึงนำไปศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry)

บล็อกชิ้นเนื้อจากการเตรียมด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์ จะมีการจัดเรียงเนื้อเยื่อเป็นแถวเป็นจำนวนมากพร้อมกัน ดังรูปที่ 6.1 (85) ซึ่งทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้นและสามารถตรวจสอบซ้ำได้หลายครั้ง เนื่องจากความต้องการปริมาณตัวอย่างจำนวนน้อย



รูปที่ 6.1 เทคนิคไมโครแอเรย์



รูปที่ 6.2 บล็อกชิ้นเนื้อจากการเตรียมด้วยเทคนิคไมโครแอเรย์ หมายเลข 1-9 แทนชิ้นเนื้อของผู้ป่วยแต่ละราย

ในการศึกษานี้ตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมาโดยใช้ Monoclonal antibody ของหนูโคลน(Clone designation)1F8/Rb1 ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินจี-1 (IgG1) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อโปรตีนเรติโนบลาสโตมา- 1 (pRB-1) ผลิตโดยบริษัท NeoMarkers, LabVision โดยผสมให้เจือจางในอัตราส่วน 1:50 ซึ่งจะต้องมีการคืนสภาพแอนติเจนด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave antigen-retrieval treatment) ในภาวะเป็นด่าง เพื่อให้สามารถจับกับแอนติบอดีได้ ซึ่งแอนติบอดีชนิดนี้จะจับกับโปรตีนเรติโนบลาสโตมาได้ทุกแบบ ได้แก่ ชนิดที่ไม่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต, ชนิดที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต และชนิดที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตเล็กน้อย (Unphosphorylated, Phosphorylated or Underphosphorylated retinoblastoma protein)

การอ่านผลจะมีตัวควบคุมที่เป็นบวก (Positive control) คือ เซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์มะเร็งเต้านม โดยจะอ่านผลจากเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในนิวเคลียส โดยอนุมานว่า การกระจายตัว (Distribution) ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในนิวเคลียสของเซลล์เท่ากัน การอ่านผล แบ่งเป็น 5 เกรด ตั้งแต่ 0 ถึง 4+

เกรด 0 คือ ไม่มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีเลย

เกรด 1+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีไม่เกินร้อยละ 25 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 2+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 25 แต่ไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 3+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 50 แต่ไม่เกินร้อยละ75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 4+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดมากกว่าร้อยละ 75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

การแปลผล คือ เกรด 0 ถือว่าเป็นลบ คือ ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา และเกรด 1+ ถึง 4+ ถือว่าเป็นบวก คือ มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

รูปการติดสีเกรดต่างๆ แสดงในภาคผนวก จ

บทที่ 7

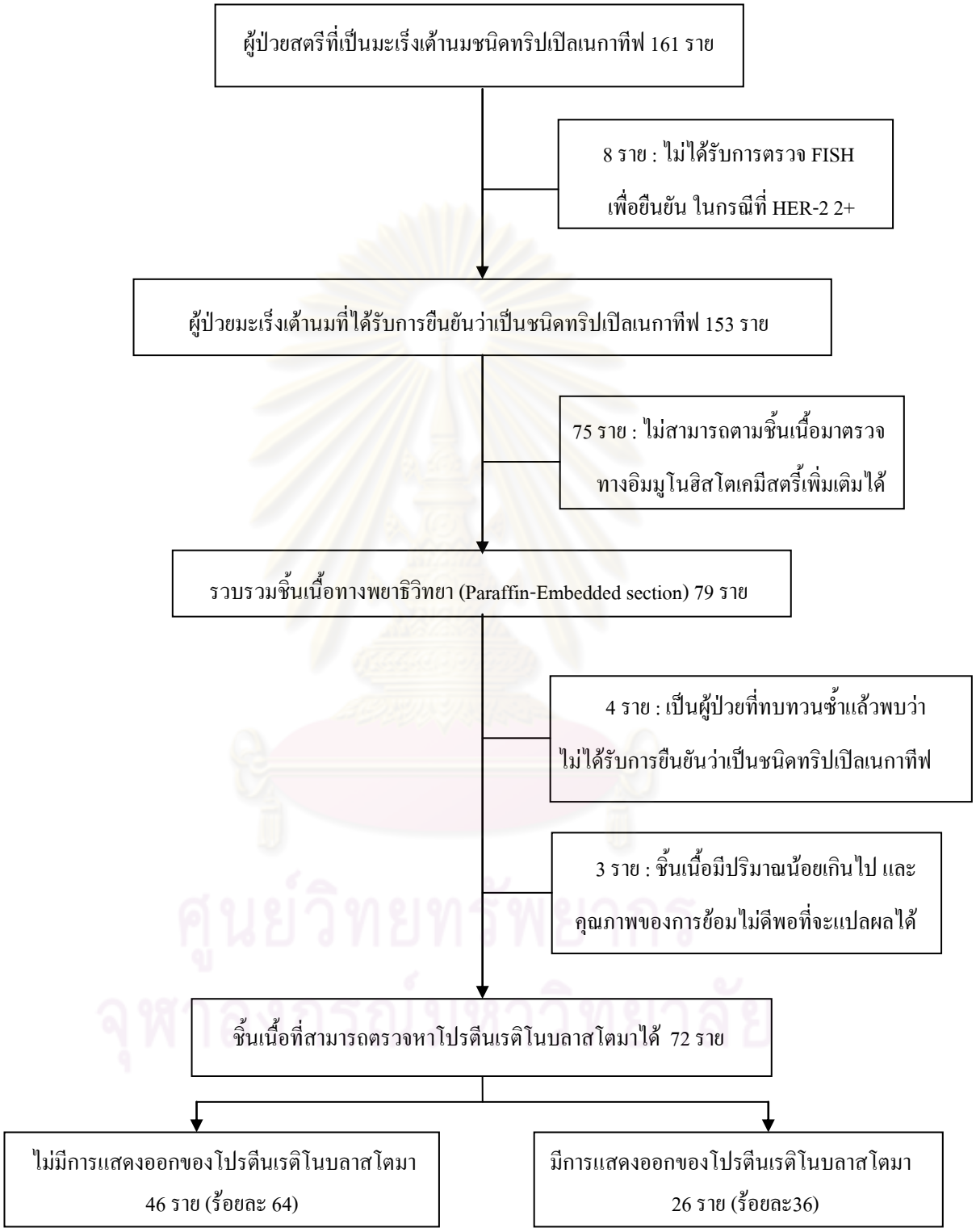
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังและติดตามผลต่อไปข้างหน้า (Retrospective-Prospective study) โดยมีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ โดยการตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry) และศึกษาผลของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด รวมถึงการดำเนินโรคของผู้ป่วย

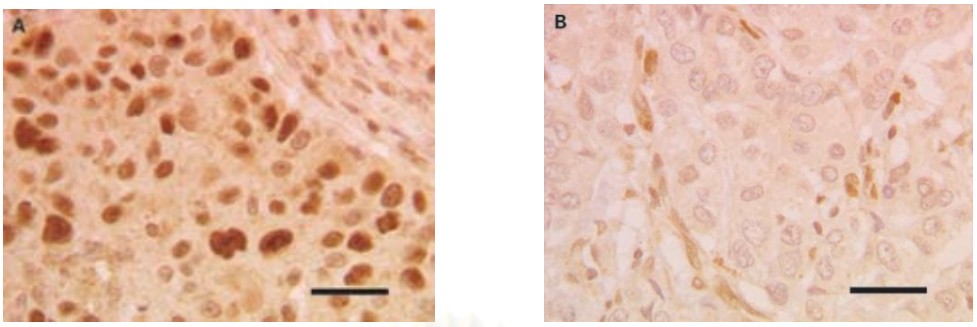
การหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ทำโดยการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพิ่มเติมจากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 จนถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2553 และเปรียบเทียบลักษณะของผู้ป่วย รวมทั้งติดตามการดำเนินโรคโดยวัดจากระยะเวลาปลอดโรค (Disease free survival) และระยะปลอดการลุกลามของโรค (Progression free survival)

มีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ จำนวนทั้งสิ้น 153 ราย และมีชิ้นเนื้อที่สามารถนำมาตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมาทั้งหมด 72 ราย ดังแสดงในรูปที่ 7.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7.1 แสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ เพื่อนำมาศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้



รูปที่ 7.2 แสดงการติดสีของโปรตีนเรติโรบลาสโตมาในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเต้านม รูป A แสดงการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาเกรด 4+ และรูป B ไม่มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (เกรด 0)

Characteristics	n = 153
Median age (years)	47.99 (26-79)
Mean follow up time (months)	34.4 (3-120)
Female	153 (100%)
ECOG Performance Status	
0	89 (58.2%)
1	64 (41.8%)
2-4	-
Reproductive status	
Premenopause	47 (43.9%)
Post menopause	60 (56.1%)
History of oral contraceptive pill use	
Yes	23 (21.9%)
No	82 (78.1%)
Family history of any malignancies	
Yes	19 (12.8%)
No	130 (87.2%)

ตารางที่ 7.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	n = 153
Palpable breast mass	
Yes	149 (97.4%)
No	4 (2.6%)
Discharge per nipple	
Yes	6 (3.9%)
No	147 (96.1%)
Breast tenderness	
Yes	12 (7.8%)
No	141 (92.2%)
Stage of disease	
Early stage	118 (77.6%)
Locally advanced stage	29 (19.1%)
Metastatic stage	5 (3.3%)
Histological grade	
1	4 (2.6%)
2	35 (23.2%)
3	91 (60.3%)
Unknown	21 (13.9%)
Tumor size	
T0 (No primary tumor)	-
T1 (≤ 2 cm)	40 (26.7%)
T2 (> 2-5 cm)	82 (54.7%)
T3 (> 5 cm)	24 (16.0%)
T4	4 (2.7%)

ตารางที่ 7.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	n = 153
Nodal involvement	
N0 (No axillary lymphadenopathy)	90 (59.2%)
N1 (1-3)	37 (24.3%)
N2 (4-9)	19 (12.5%)
N3 (≥ 10)	5 (3.3%)
Unknown	1 (0.7%)
Estrogen receptor	
Negative	146 (96.1%)
< 10%	6 (3.9%)
≥ 10%	-
Progesterone receptor	
Negative	149 (99.3%)
< 10%	2 (0.7%)
≥ 10%	-
HER-2	
0	132 (86.8%)
1+	7 (4.6%)
2+ (negative FISH)	12 (7.9%)
3+	-
Type of surgery	
Wide local excision	48 (33.3%)
Simple mastectomy + MRM	92 (63.9%)
Chemotherapy	
Yes	148 (96.7%)
No	5 (3.3%)

ตารางที่ 7.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

Characteristics	n = 153
Anthracycline-based chemotherapy	
Yes	116 (80.0%)
No	29 (20.0%)
Taxane-based chemotherapy	
Yes	49 (34.8%)
No	92 (65.2%)
Radiotherapy	
Yes	88 (66.2%)
No	45 (33.8%)
First recurrent site	
Local recurrence	8 (29.6%)
Lymph nodes	3 (11.1%)
Bone	3 (11.1%)
Lung	3 (11.1%)
Others	10 (37.0%)

ตารางที่ 7.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ผู้ป่วยทั้งหมด 153 ราย เป็นเพศหญิงทั้งหมด อายุที่เริ่มวินิจฉัยโดยเฉลี่ยประมาณ 48 ปี (อายุต่ำที่สุด 26 ปี สูงที่สุด 79 ปี) ส่วนใหญ่สภาพผู้ป่วย (ECOG Performance Status) เป็น 0 คือ แข็งแรงดี สามารถทำงานได้ตามปกติ คิดเป็นร้อยละ 58.2, อยู่ในวัยหมดประจำเดือน ร้อยละ 56.1, ส่วนใหญ่ไม่มีประวัติการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิด คิดเป็น ร้อยละ 78.1 และไม่มีประวัติโรคมะเร็งในครอบครัว อาการที่นำมาโรงพยาบาลส่วนใหญ่ คือ คลำได้ก้อนที่เต้านม ร้อยละ 97.4 ส่วนอาการอื่นๆ ได้แก่ มีน้ำไหลจากหัวนม หรือเจ็บเต้านมพบได้น้อย เมื่อได้รับการวินิจฉัย ร้อยละ 77.6 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทริปเปิลเนกาทีฟทั้งหมดอยู่ในระยะต้น สามารถผ่าตัดได้

วิธีการวินิจฉัยส่วนใหญ่ ร้อยละ 67.8 ได้มาจากการตัดชิ้นเนื้อ (Biopsy) ที่เหลือตรวจด้วยวิธีเจาะด้วยเข็มเล็ก (Fine needle aspiration or FNA) จากการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา พบว่าทั้งหมด (ร้อยละ 100) เป็นชนิด Invasive ductal carcinoma ส่วนใหญ่เป็นเกรด 3 คิดเป็นร้อยละ 60.3

ร้อยละ 54.7 มีขนาดของก้อนมากกว่า 2 เซนติเมตร แต่ไม่เกิน 5 เซนติเมตร (T2) และส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 59.2 ยังไม่มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณรักแร้ (N0) สัดส่วนของโรคที่ยังไม่มีการลุกลามเข้าหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลืองมีสูงกว่า คือ ร้อยละ 31.2 เทียบกับร้อยละ 21.0 ที่มีการลุกลามเข้าหลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลืองแล้ว แต่อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่ ร้อยละ 47.8 จะไม่ทราบว่ามีการลุกลามของโรคเข้าสู่หลอดเลือดหรือหลอดน้ำเหลืองหรือไม่ ผู้ป่วยร้อยละ 40.7 มี p53 เป็นบวก และผู้ป่วยร้อยละ 51 จะมี Ki-67 เป็นบวก คือมากกว่าร้อยละ 30

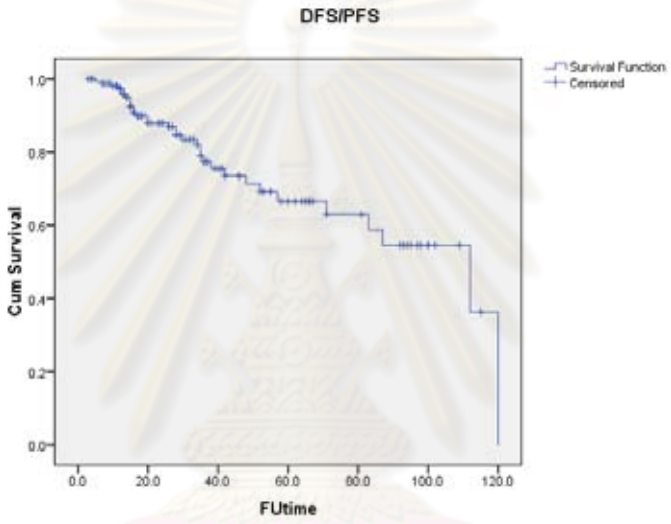
เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ พบว่าแทบทั้งหมด ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมน คือ ร้อยละ 96.1 ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน และร้อยละ 98.0 ไม่มีตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ผู้ป่วยร้อยละ 62.9 ได้รับการผ่าตัดด้วยวิธีการผ่าตัดเต้านมแบบ Modified radical mastectomy หรือ MRM ซึ่งเป็นการตัดเอาเนื้อเต้านมออกหมด ทั้งเนื้อเต้านม หัวนมและฐานหัวนม (Nipple-areolar complex) ร่วมกับเลาะต่อมน้ำเหลืองระดับ 1 และระดับ 2 (หลังและข้างกล้ามเนื้อ Pectoralis minors) ออกหมด มักใช้ในกรณีการผ่าตัดเพื่อป้องกันมะเร็งเต้านมในผู้มีความเสี่ยงสูง และผู้ป่วยร้อยละ 69.3 สามารถผ่าตัดก้อนออกไปได้หมด (Negative margin) หลังผ่าตัดมีผู้ป่วยร้อยละ 96.7 ได้รับยาเคมีบำบัด โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับสูตรยาเคมีบำบัดที่มีแอนทราไซคลิน คิดเป็นร้อยละ 80.0 ในขณะที่มีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 34.8 ที่ได้รับสูตรยาเคมีบำบัดที่มี Taxane เป็นส่วนประกอบ และ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 66.2 ได้รับการฉายแสงหลังการผ่าตัด

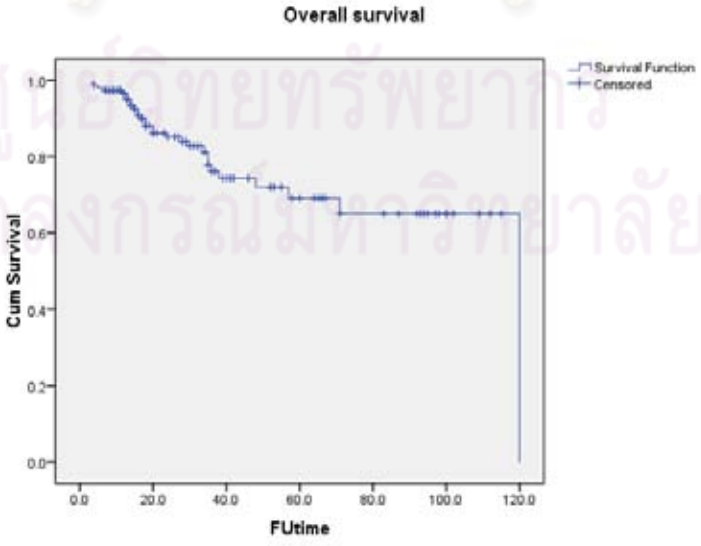
เมื่อติดตามผู้ป่วยกลุ่มนี้จนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 พบว่ามีผู้ป่วย 27 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.6 เกิดโรคกลับเป็นซ้ำ โดยตำแหน่งที่เกิดโรคกลับเป็นซ้ำมากที่สุด คือ ตำแหน่งเดิม (Local recurrence) ร้อยละ 29.6 ส่วนตำแหน่งอื่นๆที่พบ ได้แก่ ต่อมน้ำเหลือง, กระดูก, ปอด, สมอง, เต้านมด้านตรงข้าม, ผิวหนัง และเกิดการกลับเป็นซ้ำหลายตำแหน่งพร้อมกัน เป็นต้น และมีผู้ป่วย

เสียชีวิตทั้งหมด 29 ราย คิดเป็น ร้อยละ 19.2 โดยมีระยะเวลาติดตามอาการเฉลี่ย 34.4 เดือน หรือประมาณ 2.9 ปี (ระยะเวลาสั้นที่สุด 3 เดือน ยาวที่สุด 120 เดือน)

ค่ามัธยฐานของการมีชีวิตโดยปลอดโรคโดยประมาณ (Estimated median disease free survival) และค่ามัธยฐานของการมีชีวิตรอดทั้งหมดโดยประมาณ (Estimated median overall survival) ยังมาสามารถบอกได้ (Not reached) ดังรูปที่ 7.3 และ 7.4



รูปที่ 7.3 กราฟแสดงการมีชีวิตโดยปลอดโรคหรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้น



รูปที่ 7.4 กราฟแสดงการมีชีวิตรอดโดยรวม

ในการศึกษาถึงการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดจะศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด (Neoadjuvant chemotherapy) เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด ซึ่งมีผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนผ่าตัดทั้งหมด 48 ราย มี 43 ราย คิดเป็นร้อยละ 89.6 ได้รับยาเคมีบำบัดกลุ่มแอนทราไซคลิน, 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 20.8 ได้รับยาเคมีบำบัดกลุ่ม Taxane และ 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.3 ได้รับ CMF (Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-FU) โดยผู้ป่วยบางรายได้รับยาเคมีบำบัดมากกว่า 1 กลุ่ม

ผลการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดในกลุ่มมะเร็งเต้านมทริปเปิลเนกาทีฟระยะต้น แสดงดังตารางที่ 7.2

Type of response	**n = 48**
CR (Complete response)	12 (25%)
PR (Partial response)	23 (47.9%)
SD (Stable disease)	11 (22.9%)
PD (Progression of disease)	2 (4.2%)
Response rate (CR+PR)	72.9 %

ตารางที่ 7.2 แสดงการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่ได้ก่อนผ่าตัด

เมื่อพิจารณาเฉพาะชิ้นเนื้อที่สามารถนำมาตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ซึ่งได้รับการยืนยันว่าเป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ ทั้งหมด 75 ราย พบว่ามีคุณภาพดีพอ สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ 72 ราย ได้ผลการศึกษา ดังนี้

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป (General information)

ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 153 ราย กับกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพื่อหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา 72 ราย ได้ผลดังตาราง 7.3

Characteristics	Total	RB available group	p-value
N	153	72	-
Mean Age (years)	47.99 (26-79)	48.64 (30-79)	0.696
ECOG PS			1.000
0	89 (58.2%)	43 (59.7%)	
1	64 (41.8%)	29 (40.3%)	
2-4	-	-	
Reproductive status			0.965
Premenopause	47 (43.9%)	35 (48.1%)	
Post-menopause	60 (56.1%)	37 (51.9%)	
Family history of any malignancies			0.833
Yes	19 (12.8%)	10 (13.9%)	
No	130 (87.2%)	62 (86.1%)	
Histological grade			0.372
1	4 (2.6%)	1 (1.4%)	
2	35(23.2%)	16 (21.9%)	
3	91 (60.3%)	51 (69.9%)	
Unknown	21 (13.9%)	5 (6.8%)	
Tumor size			0.708
T0 (No primary tumor)	-	-	
T1 (≤ 2 cm)	40 (26.7%)	19 (27.4%)	
T2 (> 2-5 cm)	82 (54.7%)	40 (56.2%)	
T3 (> 5 cm)	24 (16.0%)	12 (16.4%)	
T4	4 (2.7%)	-	

ตารางที่ 7.3 เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	Total	RB available group	p-value
Nodal involvement			0.923
N0 (No axillary LN+)	90 (59.2%)	43 (59.5%)	
N1 (1-3)	37 (24.3%)	19 (27.0%)	
N2 (4-9)	19 (12.5%)	7 (9.5%)	
N3 (≥ 10)	5 (3.3%)	2 (2.7%)	
Unknown	1 (0.7%)	1 (1.4%)	
Stage of disease			0.956
Early stage	118 (77.6%)	55 (76.4%)	
Locally advanced stage	29 (19.1%)	15 (20.8%)	
Metastatic stage	5 (3.3%)	2 (2.8%)	
Lymphovascular invasion			0.747
Yes	29 (21.0%)	15 (22.7%)	
No	43 (31.2%)	23 (34.9%)	
Unknown	66 (47.8%)	28 (42.4%)	
p53			0.588
Positive	61 (40.4%)	32 (45.1%)	
Negative	30 (19.9%)	17 (23.9%)	
Not done	60 (39.7%)	22 (31.0%)	
Ki-67			0.333
< 15%	9 (6.0%)	6 (8.5%)	
15-30%	12 (7.9%)	2 (2.8%)	
> 30%	77 (51.0%)	43 (60.6%)	
Not done	53 (35.1%)	20 (28.2%)	
Type of surgery			0.591
Wide local excision	48 (34.0%)	19 (28.8%)	
Simple mastectomy & MRM	92 (65.3%)	46 (69.7%)	
No surgery	1 (0.7%)	1 (1.5%)	

ตารางที่ 7.3 (ต่อ) เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

Characteristics	Total	RB available group	p-value
Chemotherapy			0.454
Yes	148 (96.7%)	69 (98.6%)	
No	5 (3.3%)	1 (1.4%)	
Anthracycline-based regimens			0.631
Yes	116 (80.0%)	59 (85.5%)	
No	29 (20.0%)	10 (14.5%)	
Taxane-based regimens			0.942
Yes	49 (34.8%)	25 (37.9%)	
No	92 (65.2%)	41 (62.1%)	
Hormonal therapy			0.343
Yes	17 (12.2%)	5 (7.5%)	
No	122 (87.8%)	62 (92.5%)	
Radiotherapy			0.753
Yes	88 (66.2%)	44 (67.7%)	
No	45 (33.8%)	21 (32.3%)	
First recurrent site			0.853
Local recurrence	8 (29.6%)	3 (33.3%)	
Lymph nodes	3 (11.1%)	2 (22.2%)	
Bone	3 (11.1%)	1 (11.1%)	
Lung	3 (11.1%)	2 (22.2%)	
Others	10 (37.0%)	1 (11.1%)	
Dead			0.714
Yes	29 (19.2%)	11 (16.2%)	
No	122 (80.8%)	61 (83.8%)	

ตารางที่ 7.3 (ต่อ) เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่าง

ลักษณะพื้นฐานและการรักษาในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด และเฉพาะกลุ่มที่ได้รับการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพื่อหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วย 72 ราย ได้ผลดังตารางที่ 7.4

Characteristics	Total	pRB -	pRB +	p-value
N	72	46 (64%)	26 (36%)	-
Mean Age (years)	48.64	47.61	49.48	0.526
ECOG PS				0.223
0	43 (59.7%)	30 (65.2%)	13 (50.0%)	
1	29 (40.3%)	16 (34.8%)	13 (50.0%)	
2-4	-	-	-	
Reproductive status				0.084
Premenopause	35 (48.1%)	24 (51.6%)	11 (42.9%)	
Post-menopause	37 (51.9%)	22 (48.4%)	15 (57.1%)	
Family history				0.736
Yes	10 (13.9%)	7 (15.6%)	3 (11.5%)	
No	62 (86.1%)	39 (84.4%)	23 (88.5%)	
Histological grade				0.308
1	1 (1.4%)	-	1 (4.0%)	
2	16 (21.9%)	9 (19.6%)	5 (20.0%)	
3	51 (69.9%)	35 (76.1%)	16 (64.0%)	
Unknown	5 (6.8%)	2 (4.3%)	3 (12.0%)	
Tumor size				0.261
T0 (No primary tumor)	-	-	-	
T1 (≤ 2 cm)	19 (27.4%)	13 (28.9%)	6 (23.1%)	
T2 (> 2-5 cm)	40 (56.2%)	27 (60.0%)	13 (50.0%)	
T3 (> 5 cm)	12 (16.4%)	5 (11.1%)	7 (26.9%)	
T4	-	-	-	

ตารางที่ 7.4 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

Characteristics	Total	pRB -	pRB +	p-value
Nodal involvement				0.844
N0 (No axillary LN+)	43 (59.5%)	28 (60.9%)	15 (57.7%)	
N1 (1-3)	19 (27.0%)	11 (23.9%)	8 (30.8%)	
N2 (4-9)	7 (9.5%)	4 (8.7%)	3 (11.5%)	
N3 (≥ 10)	2 (2.7%)	2 (4.3%)	-	
Unknown	1 (1.4%)	1 (2.2%)	-	
Stage of disease				0.060
Early stage	55 (76.4%)	38 (82.6%)	17 (65.4%)	
Locally advanced stage	15 (20.8%)	6 (13.0%)	9 (34.6%)	
Metastatic stage	2 (2.8%)	2 (4.3%)	-	
Lymphovascular invasion				0.063
Yes	15 (22.7%)	6 (14.0%)	9 (39.2%)	
No	23 (34.9%)	16 (37.2%)	7 (30.4%)	
Unknown	28 (42.4%)	21 (48.8%)	7 (30.4%)	
p53				0.281
Positive	32 (45.1%)	24 (52.2%)	8 (32.0%)	
Negative	17 (23.9%)	10 (21.7%)	7 (28.0%)	
Not done	22 (31.0%)	12 (26.1%)	10 (40.0%)	
Ki-67				0.137
< 15%	6 (8.5%)	4 (8.7%)	2 (8.0%)	
15-30%	2 (2.8%)	-	2 (8.0%)	
> 30%	43 (60.6%)	31 (67.4%)	12 (48.0%)	
Not done	20 (28.2%)	11 (23.9%)	9 (36.0%)	
Type of surgery				0.219
Wide local excision	19 (28.8%)	15 (33.3%)	4 (19.0%)	
Simple mastectomy & MRM	46 (69.7%)	29 (64.4%)	17 (81.0%)	
No surgery	1 (1.5%)	1 (2.2%)	-	

ตารางที่ 7.4 (ต่อ) ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	Total	pRB -	pRB +	p-value
Chemotherapy				1.000
Yes	69 (98.6%)	43 (97.7%)	26 (100.0%)	
No	1 (1.4%)	1 (2.3%)	-	
Anthracycline-based regimens				0.675
Yes	59 (85.5%)	38 (88.4%)	21 (80.8%)	
No	10 (14.5%)	5 (11.6%)	5 (19.2%)	
Taxane-based regimens				0.489
Yes	25 (37.9%)	13 (31.7%)	12 (48.0%)	
No	41 (62.1%)	28 (68.3%)	13 (52.0%)	
Hormonal therapy				1.000
Yes	5 (7.5%)	3 (7.1%)	2 (8.0%)	
No	62 (92.5%)	39 (92.9%)	23 (92.0%)	
Radiotherapy				0.780
Yes	44 (67.7%)	30 (69.8%)	14 (63.6%)	
No	21 (32.3%)	13 (30.2%)	8 (36.4%)	
First recurrent site				0.302
Local recurrence	3 (33.3%)	1 (25.0%)	2 (40.0%)	
Lymph nodes	2 (22.2%)	-	2 (40.0%)	
Bone	1 (11.1%)	1 (25.0%)	-	
Lung	2 (22.2%)	2 (50.0%)	-	
Others	1 (11.1%)	-	1 (20.0%)	
Dead				0.511
Yes	11 (16.2%)	6 (13.0%)	5 (19.2%)	
No	61 (83.8%)	40 (87.0%)	21 (80.8%)	

ตารางที่ 7.4 (ต่อ) ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการตรวจหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟจำนวน 72 ราย พบว่ามีผู้ป่วย 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 64 ที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา เมื่อนำผลการศึกษามาทดสอบสมมติฐานที่ตั้งไว้ตอนแรก คือ

H0 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ เท่ากับร้อยละ 37

H1 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟไม่เท่ากับร้อยละ 37

จะสามารถคำนวณค่า Z = 4.72 โดยแสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ง ซึ่งปฏิเสธ H0 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟไม่เท่ากับร้อยละ 37

ลักษณะที่พบทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ซึ่งบอกถึงการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาโดยวัดจากสัดส่วนของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในนิวเคลียส แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

เกรด 0 คือ ไม่มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีเลย

เกรด 1+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีไม่เกินร้อยละ 25 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 2+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 25 แต่ไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 3+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 50 แต่ไม่เกินร้อยละ75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 4+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดมากกว่าร้อยละ 75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

โดยที่ระดับ 0 แปลผลว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (pRB-) และระดับ 1+ ถึง 4+ แปลผลว่า มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา (pRB+)

รูปแสดงการติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ระดับ 0 ถึง 4+ แสดงในภาคผนวก จ

จากข้อมูลดังกล่าวพบว่ามีลักษณะบางอย่างที่บ่งบอกว่าโรคค่อนข้างรุนแรงในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ได้แก่ อายุเฉลี่ยที่น้อยกว่า (47.6 ปี เทียบกับ 49.5 ปี), เกรดของชิ้นเนื้อเป็นเกรด 3 ในสัดส่วนที่มากกว่า (ร้อยละ 76 เทียบกับร้อยละ 64) และระดับ Ki-67 ที่มากกว่าร้อยละ 30 ซึ่งบอกถึงการแบ่งตัวของเซลล์ในสัดส่วนที่มากกว่า (ร้อยละ 67.4 เทียบกับร้อยละ 48.0) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

พบว่าตำแหน่งที่มีการกลับเป็นซ้ำและอัตราการเสียชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างผู้ป่วยที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

ส่วนที่ 2 การดำเนินโรค

เมื่อสิ้นสุดการติดตามผู้ป่วยตามที่กำหนดไว้ ระยะเวลาเฉลี่ยของการติดตามกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 29.6 เดือน หรือ 2.5 ปี และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม พบว่ากลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีระยะเวลาติดตามอาการโดยเฉลี่ยนานกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ประมาณ 7 เดือน คือ 31.9 เดือน เทียบกับ 24.7 เดือน

การรักษาที่ได้รับ ระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ วิธีการผ่าตัด การได้รับยาเคมีบำบัด และการฉายแสงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา 24 ราย จากทั้งหมด 46 ราย (ร้อยละ 54.5) ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำ หรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้นในกรณีที่เป็นมะเร็งระยะแพร่กระจายตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัย เทียบกับ 12 ราย จากทั้งหมด 26 ราย (ร้อยละ 48) ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งมีแนวโน้มว่ากลุ่มที่มีการขาดโปรตีน เรติโนบลาสโตมาจะมีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่าหลังได้รับการรักษา (กลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 72 รายที่มีชิ้นเนื้อตรวจเพิ่มเติม มีผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด 1 คน คิดเป็นร้อยละ 1.4 ซึ่งตรวจพบว่าไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติ

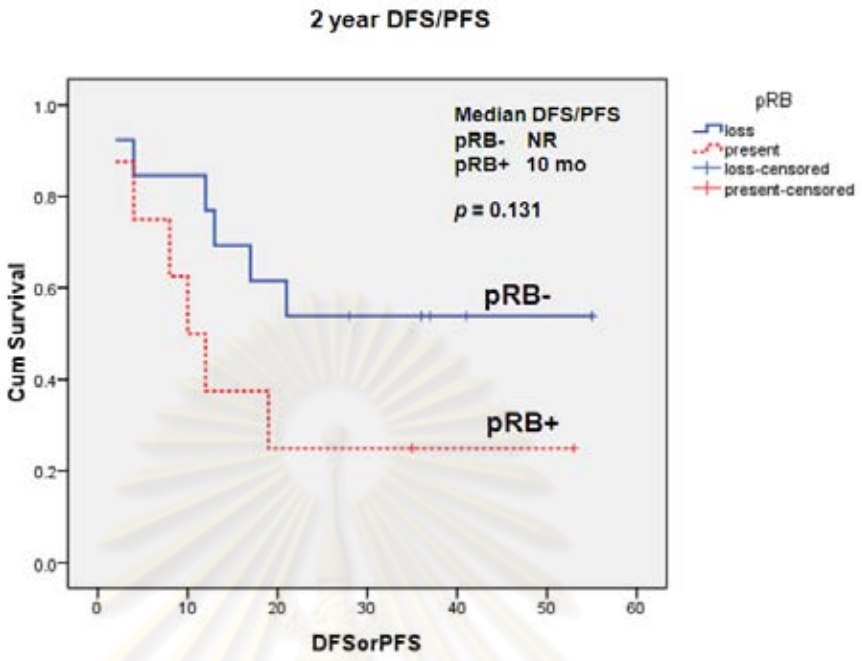
โนบลาสโตมา 26 ราย ซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดทุกรายแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

เมื่อเปรียบเทียบกันหลังติดตามผลการรักษาไป 3 ปี พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมายังคงมีการดำเนินโรคที่ดีกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโน บลาสโตมา คือ มีสัดส่วนผู้ป่วยที่ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำ หรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้น ร้อยละ 26 และ ร้อยละ 8 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม อุบัติการณ์ของการกลับเป็นซ้ำหรือการลุกลามของโรคมะเร็งเต้านมจากการศึกษานี้ยังไม่ถึงร้อยละ 50

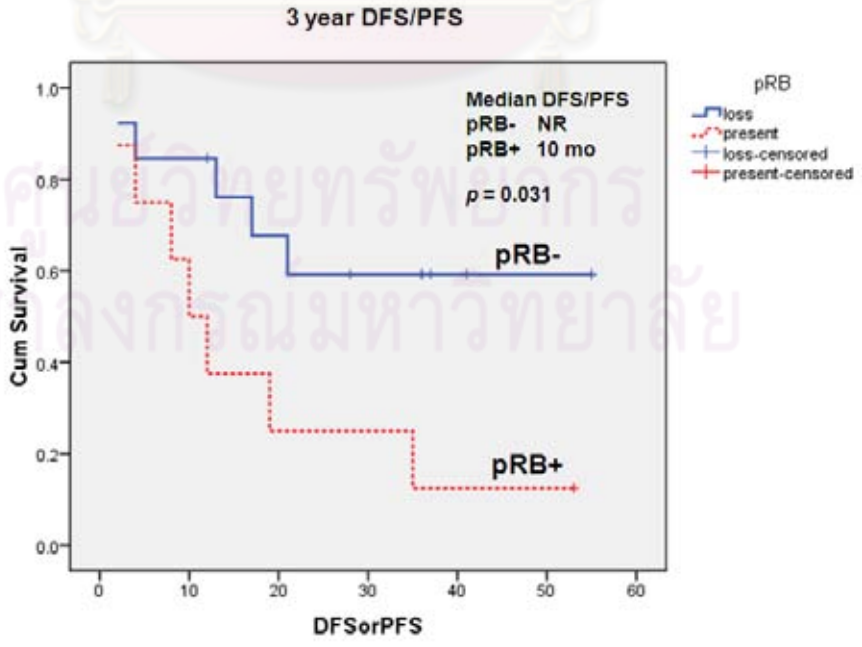
ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่โรคกลับเป็นซ้ำหรือลุกลามมากขึ้นเป็น 10 เดือน ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาเทียบกับผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโน บลาสโตมา ซึ่งยังไม่สามารถคำนวณได้ (Not reached) เนื่องจากระยะเวลาที่ติดตามผู้ป่วยสั้นเกินกว่าที่จะบอกได้ ($p = 0.13$ และ 0.03 ที่ 2 และ 3 ปีตามลำดับ) ตามตารางที่ 7.5, รูปที่ 7.5 และ7.6

TNBC	2-year follow up Median DFS/PFS (months)	3-year follow up Median DFS/PFS (months)
Overall	19.0	21.0
pRB- pRB +	Not reached 10.0	Not reached 10.0
p-value	0.131	0.031

ตารางที่ 7.5 แสดงระยะเวลาที่ยังไม่มีการกลับเป็นซ้ำที่ 2 และ 3 ปี



รูปที่ 7.5 กราฟแสดงระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปลอดโรคหรือปลอดการลุกลามของโรคที่ 2 ปี



รูปที่ 7.6 กราฟแสดงระยะเวลาที่มีชีวิตโดยปลอดโรคหรือปลอดการลุกลามของโรคที่ 3 ปี

DFS or PFS	pRB -	pRB +	p-value
At 2 year-follow up without events			0.561
Yes	24 (54.5%)	12 (48.0%)	
No	6 (13.6%)	6 (24.0%)	
Not reached	14 (31.8%)	7 (28.0%)	
At 3 year-follow up without events			0.074
Yes	12 (27.3%)	2 (8.0%)	
No	5 (11.4%)	7 (28.0%)	
Not reached	27 (61.4%)	16 (64.0%)	

ตารางที่ 7.6 แสดงสถานภาพของผู้ป่วยหลังติดตามอาการไป 2 และ 3 ปี หลังได้รับการรักษา

เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่มาติดตามอาการตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป 39 ราย พบว่าในกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีผู้ป่วยที่มีชีวิตรอดโดยไม่มีการกลับเป็นซ้ำที่ 2 ปี 24 ราย และในกลุ่มที่มีมีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา 12 ราย โดยผู้ป่วยที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีระยะเวลาติดตามอาการโดยเฉลี่ย 45.6 เดือน ซึ่งนานกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งมีระยะติดตามอาการโดยเฉลี่ย 33.7 เดือน

เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่มาติดตามอาการตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป 16 ราย ยังคงพบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามากกว่า และระยะติดตามอาการโดยเฉลี่ยนานกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา คือ 13 เทียบกับ 3 ราย และมีระยะเวลาติดตามอาการโดยเฉลี่ย 62.2 เดือน เทียบกับ 49.3 เดือน ตามลำดับ

ส่วนที่ 3 การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด

เมื่อศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดซึ่งดูจากสัดส่วนผู้ป่วยที่รอยโรคหายไปหลังได้รับการรักษา (Pathological complete response or pCR) โดยดูจากผลการรายงานทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อที่ผ่าตัดออกมาภายหลัง พบว่ากลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีการหายไปของรอยโรคหลังได้รับการรักษา เป็นสัดส่วนมากกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา คือ 2 ราย ใน 6 ราย หรือ ร้อยละ 33.3 เทียบกับ 2 ราย ใน 10 ราย หรือร้อยละ 20.0 ตามลำดับ (p = 0.604) ดังตารางที่ 7.7

Neoadjuvant chemotherapy	**pRB-**	**pRB +**	**p-value**
N	6	10	-
Pathological complete response			0.604
Yes	2 (33.3%)	2 (20.0%)	
No	4 (66.7%)	8 (80.0%)	

ตารางที่ 7.7 แสดงการตอบสนองต่อการได้ยาเคมีบำบัดก่อนผ่าตัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 8

อภิปรายผลการวิจัย

มะเร็งเต้านมเป็นโรคที่มีความหลากหลาย สามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยๆอีกหลายกลุ่ม ทั้งจากการแบ่งตามการแสดงออกของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ร่วมกับตัวรับสัญญาณ HER-2 ด้วยวิธีการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ หรือจากการตรวจการเรียงตัวของยีน ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความรุนแรง, การพยากรณ์โรค, การพิจารณาวิธีรักษา และการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกัน

การศึกษานี้ทำในกลุ่มมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ คือ กลุ่มที่ไม่มีการแสดงของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนและ HER-2 เท่านั้น ซึ่งมีข้อมูลว่ามะเร็งเต้านมชนิดนี้มักพบในผู้ป่วยอายุน้อย มีการดำเนินโรครุนแรง โอกาสกลับเป็นซ้ำหลังการรักษาเสริมสูงโดยเฉพาะใน 1-3 ปีแรก มีอัตราการรอดชีวิตสั้นกว่าชนิดอื่นๆ ส่วนมากมักเสียชีวิตในช่วง 5 ปีแรก และไม่มีการรักษาเฉพาะ

ในปัจจุบัน ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟจึงมีเพียงยาเคมีบำบัดเท่านั้น ซึ่งมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟนี้จะตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดีกว่ามะเร็งเต้านมชนิดอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม ยาเคมีบำบัดมีผลข้างเคียงค่อนข้างมากและไม่เหมาะสมในผู้ป่วยบางราย เช่น ผู้ป่วยสูงอายุ หรือสภาพร่างกายไม่แข็งแรงมาก ดังนั้น การหาปัจจัยที่ช่วยในการพยากรณ์การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด หรือช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีการรักษาแก่ผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ไม่แข็งแรงมาก ซึ่งการตัดสินใจระหว่างผลดีที่จะได้จากการรักษากับผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัดน่าจะมีความจำเป็นมากขึ้น

จากการทบทวนวรรณกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องพบว่า ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะต้นที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด CMF (Cyclophosphamide, Methotrexate, 5-FU) มีเพียงปัจจัยเดียวที่สามารถทำนายการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด คือ การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ส่วนปัจจัยอื่นๆที่นำมาวิเคราะห์ร่วมด้วย ได้แก่ ขนาดของก้อน, ความรุนแรงของความผิดปกติของชิ้นเนื้อ,

การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง, ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน, ตัวรับสัญญาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, ระดับของ p53 ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการเจริญของมะเร็ง, ระดับของ Ki-67 ซึ่งบอกถึงอัตราการแบ่งเซลล์ และตัวรับสัญญาณ HER-2 นั้นกลับไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดเลย (1)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา อาการ อาการแสดง ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ การดำเนินโรค การพยากรณ์โรคของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในประเทศไทยมาก่อน

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

จากการเก็บข้อมูลพบว่าผู้ป่วยมีอายุโดยเฉลี่ยค่อนข้างน้อย, เกรดของชิ้นเนื้อในทางพยาธิวิทยา และค่าการแบ่งตัวของเซลล์ค่อนข้างสูง ซึ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและการดำเนินโรคที่รุนแรง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับการศึกษาอื่นๆในสหรัฐอเมริกา พบว่าลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 8.1

Author	**Carey (86)**	**Dent (50)**	**Liedtke (52)**	**Current study**
Year	2006	2007	2008	**2011**
N	100	180	255	**153**
Mean age (Years)	46	53	47.64	**47.99**
Median F/U (years)	NA	7.9	NA	**2.9**
Staging		NA	NA	
Early	86%			**77.6%**
Locally advanced	8%			**19.1%**
Metastatic	5%			**3.3%**

ตารางที่ 8.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเปรียบเทียบแต่ละการศึกษา

Author	Carey (86)	Dent (50)	Liedtke (52)	Current study
Tumor size	NA			
T1		36.5%	12.2%	**26.7%**
T2		55.6%	52.2%	**54.7%**
T3		7.9%	14.9%	**16.0%**
T4		-	-	**2.7%**
Missing		-	17.6%	**-**
Nodal involvement				
N-	59%	44.6%	33.7%	**59.2%**
N+	41%	54.45	66.3%	**40.8%**
Tumor grade				
1	2%	9.8%	0.8%	**2.6%**
2	14%	24.2%	11.4%	**23.1%**
3	84%	66.0%	85.1%	**60.3%**
Unknown	-	-	-	**13.9%**
Missing	-	-	2.7%	**-**

ตารางที่ 8.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเปรียบเทียบแต่ละการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความชุกของการขาดไปของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้ คือ การหาความชุกของการขาดไปของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ พบว่ามีผู้ป่วยถึงร้อยละ 64 ที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งพบมากกว่าการศึกษาในต่างประเทศที่พบเพียงร้อยละ 37 (5) ซึ่งเมื่อนำผลการศึกษามาทดสอบสมมติฐานที่ตั้งไว้ จะสามารถคำนวณค่า Z = 4.72 ซึ่งปฏิเสธ H0

ซึ่งตั้งไว้ว่า ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ เท่ากับร้อยละ 37 ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า *ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ**ไม่เท่ากับร้อยละ 37***

พบความชุกในการศึกษานี้มากกว่าในการศึกษาจากต่างประเทศ อาจเป็นเพราะลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่ศึกษาแตกต่างกันจริง ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่อธิบายถึงอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในการศึกษานี้ คือ ประมาณ 48 ปี ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับต่างประเทศ คือ ประมาณ 50-55 ปี (5, 50, 87) เนื่องจาก การขาดโปรตีนเรติโน บลาสโตมา ซึ่งเป็นโปรตีนที่กดการเจริญของมะเร็ง (Tumor suppressor protein) ทำให้โรคมีความรุนแรง จึงเกิดได้เร็วขึ้น และพบในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยกว่า

จากข้อมูลของการศึกษานี้ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกของกลุ่มตัวอย่างที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา พบว่า กลุ่มที่ขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีลักษณะที่บ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่แย่ และโรคมีความรุนแรงกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา แม้จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ อายุเฉลี่ยที่น้อยกว่า, เกรดของชิ้นเนื้อเป็นเกรด 3 ในสัดส่วนที่มากกว่า และระดับ Ki-67 ที่มากกว่าร้อยละ 30 ซึ่งบอกถึงการแบ่งตัวของเซลล์ในสัดส่วนที่มากกว่า

ในทางตรงกันข้าม ลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยที่ศึกษาอาจไม่ได้แตกต่างกับการศึกษาในต่างประเทศจริง แต่ผลการศึกษาซึ่งไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากวิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน โดยในการศึกษาของต่างประเทศ ไม่ได้ออกแบบการศึกษาเพื่อหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาเฉพาะในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเท่านั้น แต่ยังเก็บข้อมูลของมะเร็งเต้านมทุกชนิด โดยกลุ่มทริปเปิลเนกาทีฟเป็นเพียงกลุ่มย่อยกลุ่มหนึ่ง

เนื่องจากไม่มีการศึกษาใดในอดีตที่ตั้งวัตถุประสงค์ และออกแบบมาเพื่อหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟเพียงชนิดเดียว การศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในประเทศไทยเท่ากับร้อยละ 64 แต่ไม่

สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าข้อมูลของผู้ป่วยในประเทศไทยมีความเหมือนหรือแตกต่างกับในต่างประเทศหรือไม่

การพยากรณ์โรคและการดำเนินโรค

ในแง่ของการพยากรณ์โรคและการดำเนินโรค พบว่าผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีการดำเนินโรคที่ดีกว่า และตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดดีกว่า

เมื่อติดตามผลการรักษาไป 2 ปี พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโน บลาสโตมาร้อยละ 54 ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำ หรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้น เทียบกับร้อยละ 48 ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาที่ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำ หรือไม่มีการลุกลามของโรค

ผลการรักษาที่ 3 ปี อาจจะยังสรุปไม่ได้ เนื่องจาก สัดส่วนผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มที่เกิดการกลับเป็นซ้ำหรือการลุกลามของโรค ยังมีน้อยกว่าร้อยละ 50 แต่มีแนวโน้มว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมายังคงมีการดำเนินโรคที่ดีกว่า

ข้อมูลจากการติดตามผู้ป่วยไปเป็นระยะเวลา 2 และ 3 ปี พบว่า ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่โรคกลับเป็นซ้ำหรือลุกลามมากขึ้นเป็น 10 เดือน ในผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา เทียบกับผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งยังไม่สามารถคำนวณได้ (Not reached) เนื่องจากระยะเวลาที่ติดตามผู้ป่วยสั้นเกินกว่าที่จะบอกได้ การติดตามการรักษาเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นจะสามารถบอกข้อมูลที่ถูกต้องได้

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษานี้ สนับสนุนข้อมูลจากการศึกษาในต่างประเทศและสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีการดำเนินโรคที่ดีกว่า และตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดดีกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของโดยเฉลี่ยที่โรคกลับเป็นซ้ำหรือลุกลามมากขึ้นระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มนี้ ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากระยะเวลาที่ติดตามอาการผู้ป่วยโดยเฉลี่ย 2.5 ปีนั้น สั้นเกินไป เพราะผู้ป่วยส่วนใหญ่ คือ ประมาณร้อยละ 68 ยังเป็นมะเร็งระยะต้น ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ดีอยู่แล้ว โดยมีระยะเวลาการมีชีวิตเฉลี่ยสูงมาก ตามข้อมูลของมะเร็งวิทยาสมาคมของประเทศสหรัฐอเมริกา (American Cancer Society) ได้แก่ อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ในมะเร็งเต้านมระยะที่ 1 (ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร และไม่มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลือง), ระยะที่ 2A (ก้อนมะเร็งมีขนาดระหว่าง 2-5 เซนติเมตร และ/หรือ มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองไม่เกิน 3 ต่อม), ระยะที่ 2B (ก้อนมะเร็งมีขนาดระหว่าง 2-5 เซนติเมตร และมีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองไม่เกิน 3 ต่อม หรือก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร), ระยะที่ 3A (ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร และมีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองไม่เกิน 9 ต่อม หรือ ก้อนมะเร็งมีขนาดไม่เกิน5 เซนติเมตร มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลือง 4- 9 ต่อม) และระยะที่ 3B (มีการลุกลามมาที่ผนังทรวงอกและกล้ามเนื้อหน้าอก) เป็นร้อยละ 100, 92, 81, 67 และ 54 ตามลำดับ ดังนั้นการติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลาเพียง 2-3 ปี จึงไม่ยาวนานพอที่จะเห็นถึงความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม

นอกจากนั้น จากผลการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีลักษณะพื้นฐานของโรคที่รุนแรงกว่า แต่กลับมีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดีกว่า ส่งผลให้มีระยะเวลาปลอดโรค และปลอดการลุกลามของโรคที่ยาวนานกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ดังได้แสดงไปแล้ว

แต่หากผู้ป่วยที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาบางรายที่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ไม่ดี ซึ่งแตกต่างจากผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาโดยทั่วไป ร่วมกับมีลักษณะพื้นฐานของโรคที่ไม่ดีอยู่แล้ว จึงทำให้ยิ่งมีการดำเนินโรคที่รุนแรงมาก และมีระยะเวลาปลอดโรคสั้นลง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความแตกต่างข้อผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มไม่ชัดเจนนัก

การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด

จากข้อมูลในการศึกษานี้ที่แยกศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด (Neoadjuvant chemotherapy) 16 ราย พบว่าผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ที่รอยโรคหายไปหลังจากได้รับเคมีบำบัด 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 เปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศดังแสดงในตารางที่ 8.2

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศพบว่า การตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดมีความแตกต่างกันบ้างตามชนิดของยาเคมีบำบัดที่ใช้ การให้ยาหลายชนิดพร้อมกันหรือให้ทีละตัว อย่างไรก็ตามมีเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆที่ใช้ยาเคมีบำบัดเป็นกลุ่มแอนทราไซคลินและ/หรือกลุ่ม Taxane เหมือนกัน แต่กลับมีการตอบสนองที่ค่อนข้างแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจอธิบายได้จากลักษณะพื้นฐานบางอย่างของผู้ป่วยที่ต่างกัน รวมถึงปริมาณยาที่ได้รับ ซึ่งทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบข้ามการศึกษาได้โดยตรง

Author	Year	N	Staging	Chemotherapy regimens	pCR (%)
Liedtke (52)	2008	255	II/III	FAC or FEC or AC	20
				T ⟶ FAC or T ⟶ FEC	28
				Single agent Taxane	12
Chang HR (88)	2010	11	II/III	CBDCA + Docetaxel	54.6
Masuda H (89)	2010	33	II/III	FEC ⟶ T or FEC ⟶ D	36
Gildetti (90)	2010	39	Non-metastasis	FEC or EC	15
				FEC or EC ⟶ T	19

ตารางที่ 8.2 เปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

Author	Year	N	Staging	Chemotherapy regimens	pCR (%)
Silver DP (91)	2010	28	II/III	Cisplatin	22
Yagata H (92)	2011	111	Non-metastasis	Anthracycline and/or Taxane	9
Sakuma K (93)	2011	44	Non-metastasis	Anthracycline and/or Taxane	36
Current study	**2011**	**48**	**Non-metastasis**	**Anthracycline and/or Taxane**	**25**

ตารางที่ 8.2 (ต่อ) เปรียบเทียบการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดของมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

ในการศึกษานี้ เมื่อพิจารณาแยกผู้ป่วยแต่ละกลุ่มพบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดที่ดีกว่า คือ รอยโรคหายไปหลังได้รับการรักษา ร้อยละ 33 เทียบกับ ร้อยละ 20 ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาส โตมา

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟสัมพันธ์กับลักษณะของโรคที่รุนแรงและมีแนวโน้มจะลุกลามได้เร็ว แต่ก็เป็นกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดี และมีแนวโน้มจะมีการดำเนินโรคที่ดีกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา หลังได้รับยาเคมีบำบัด

การติดตามอาการของผู้ป่วยต่อไปในระยะยาว จะทำให้สามารถแยกความแตกต่างของการดำเนินโรคระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม รวมถึงประโยชน์ของการตรวจโปรตีนเรติโนบลาสโตมาได้ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะกรณีที่ผู้ป่วยที่ไม่มั่นใจว่าสมควรจะได้รับยาเคมีบำบัดหรือไม่

บทที่ 9

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเป็นการศึกษาแบบย้อนหลังและติดตามผลต่อไปข้างหน้า (Retrospective-Prospective study) มีวัตถุประสงค์คือ เพื่อหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ และเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด รวมถึงการดำเนินโรคของผู้ป่วยระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ และกดการเจริญของเนื้องอก

การหาโปรตีนเรติโนบลาสโตมาทำโดยการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพิ่มเติมจากชิ้นเนื้อเดิมที่มีอยู่แล้ว และเปรียบเทียบลักษณะของผู้ป่วย รวมทั้งติดตามการดำเนินโรคโดยวัดจากระยะเวลาปลอดโรค และระยะปลอดการลุกลามของโรคในกรณีที่เป็นมะเร็งระยะแพร่กระจาย

ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพื่อหาการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาและนำมาคำนวณหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ ซึ่งชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (Paraffin-Embedded section) ที่ตรวจแล้วมีคุณภาพดีพอ สามารถนำมาวิเคราะห์ได้มีจำนวนเพียงพอ คือ 72 ราย เมื่อเทียบกับที่คำนวณไว้ตั้งแต่แรก คือ 63 ราย (คำนวณเผื่อคุณภาพของการตรวจไม่ดีอีก ร้อยละ 10 รวมเป็น 70 ราย) เป็นผลให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้มีความน่าเชื่อถือและเพียงพอในการบอกความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

วิธีการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยการใช้ชุดการตรวจสำเร็จรูป ทำบนชิ้นเนื้อที่ได้รับการเตรียมด้วยวิธีไมโครแอเรย์ (Microarray) เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ แต่อาจมีความแตกต่างกันในแง่การอ่านและการแปลผล เนื่องจากใช้ชุดการตรวจสำเร็จรูปจากต่างบริษัทกัน อย่างไรก็ตามการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในการศึกษานี้ก็มีตัวควบคุมที่ชัดเจนและมีความแตกต่างกันระหว่างการมีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา โดยดู

จากสัดส่วนของเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดสีในนิวเคลียสเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด ซึ่งสามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีการติดสีหรือไม่ ดังนั้นผลการตรวจที่ได้ในการศึกษานี้จึงมีความน่าเชื่อถือและน่าจะสามารถนำไปใช้ในการตรวจครั้งต่อๆไป

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟจากการศึกษานี้ คือ ร้อยละ 64 โดยลักษณะพื้นฐานและการดำเนินโรคโดยรวมของผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟในประเทศไทย ใกล้เคียงกับผลจากการศึกษาในต่างประเทศ

กลุ่มที่ขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมามีลักษณะของโรคที่รุนแรงกว่าเมื่อแรกวินิจฉัย ได้แก่ อายุเฉลี่ยที่น้อยกว่า, เกรดของชิ้นเนื้อเป็นเกรด 3 ในสัดส่วนที่มากกว่า และระดับ Ki-67 ที่มากกว่าร้อยละ 30 ซึ่งบอกถึงการแบ่งตัวของเซลล์ในสัดส่วนที่มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและปัจจัยทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยที่มีและไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อสิ้นสุดการติดตามผู้ป่วยตามที่กำหนดไว้พบว่ากลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาโตมามีระยะเวลาติดตามอาการโดยเฉลี่ยนานกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโน บลาสโตมาประมาณ 7 เดือน และพบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาที่ยังไม่มีโรคกลับเป็นซ้ำหรือไม่มีการลุกลามของโรคมากขึ้นในกรณีที่เป็นมะเร็งระยะแพร่ กระจายตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยมีสัดส่วนมากกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาและผลยังคงเป็นเช่นเดิม เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการติดตามอาการอย่างน้อย 3 ปี

เมื่อศึกษาเฉพาะกลุ่มย่อยที่ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนผู้ป่วยที่รอยโรคหายไปหลังได้รับการรักษา พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีการหายไปของรอยโรคหลังได้รับการรักษา เป็นสัดส่วนมากกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ซึ่งน่าจะเป็นการยืนยันได้ว่าผู้ป่วยที่ขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา มีแนวโน้มว่าจะตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดีกว่า

แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของโดยเฉลี่ยที่โรคกลับเป็นซ้ำหรือลุกลามมากขึ้นระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มนี้ ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากระยะเวลาที่ติดตามอาการผู้ป่วยโดยเฉลี่ย 2.5 ปีนั้น สั้นเกินไป เพราะผู้ป่วยส่วนใหญ่ ยังเป็นมะเร็งระยะต้น ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ดีอยู่แล้ว และมีระยะเวลาการมีชีวิตรอดเฉลี่ยสูงมาก การติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเวลาเพียง 2-3 ปี จึงไม่นานพอ ที่จะเห็นถึงความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องขึ้นในแง่ของการหาความชุกในผู้ป่วยสตรีชาวไทย และได้ผลที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะในแง่ของความแตกต่างของการดำเนินโรคของผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม
2. ติดตามกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษานี้ต่อไปในระยะยาวเพื่อศึกษาถึงการดำเนินโรคของผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม แล้วจึงรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลอีกครั้ง
3. มีการแยกผู้ป่วยออกเป็นแต่ละกลุ่มให้ชัดเจน เพื่อศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น แยกเฉพาะผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟระยะต้น หรือระยะแพร่กระจาย, เฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาก่อนการผ่าตัด (Neoadjuvant treatment) หรือได้รับการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด (Adjuvant treatment) เป็นต้น
4. ตรวจหาตัวบ่งชี้อื่นๆที่จำเพาะ และมีผลกับการดำเนินโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มีผลกับการวางแผนรักษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Derenzini M, Donati G, Mazzini G, Montanaro L, Vici M, Ceccarelli C, et al. Loss of retinoblastoma tumor suppressor protein makes human breast cancer cells more sensitive to antimetabolite exposure. **Clin Cancer Res.** 2008 Apr 1;14(7):2199-209.

2. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology.** 2008 Jan;52(1):108-18.

3. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell.** 1995 May 5;81(3):323-30.

4. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.** 2000 Jul 15;60(14):3689-95.

5. Trere D, Brighenti E, Donati G, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, et al. High prevalence of retinoblastoma protein loss in triple-negative breast cancers and its association with a good prognosis in patients treated with adjuvant chemotherapy. **Ann Oncol.** 2009 Nov;20(11):1818-23.

6. Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, et al. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. **Cell.** 2000 Mar 31;101(1):79-89.

7. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. **Cell.** 1999 Sep 17;98(6):859-69.

8. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.** 1999 Jun 15;13(12):1501-12.

9. Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. **Nat Rev Cancer.** 2008 Sep;8(9):714-24.

10. Wang W, Cassidy J, O'Brien V, Ryan KM, Collie-Duguid E. Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells. **Cancer Res.** 2004 Nov 15;64(22):8167-76.

11. Bosco EE, Mayhew CN, Hennigan RF, Sage J, Jacks T, Knudsen ES. RB signaling prevents replication-dependent DNA double-strand breaks following genotoxic insult. **Nucleic Acids Res.** 2004;32(1):25-34.

12. Angus SP, Wheeler LJ, Ranmal SA, Zhang X, Markey MP, Mathews CK, et al. Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. **J Biol Chem.** 2002 Nov 15;277(46):44376-84.

13. Knudsen KE, Booth D, Naderi S, Sever-Chroneos Z, Fribourg AF, Hunton IC, et al. RB-dependent S-phase response to DNA damage. **Mol Cell Biol.** 2000 Oct;20(20):7751-63.

14. Valero V, Forbes J, Pegram MD, Pienkowski T, Eiermann W, von Minckwitz G, et al. Multicenter Phase III Randomized Trial Comparing Docetaxel and Trastuzumab With Docetaxel, Carboplatin, and Trastuzumab As First-Line Chemotherapy for Patients With HER2-Gene-Amplified Metastatic Breast Cancer (BCIRG 007 Study): Two Highly Active Therapeutic Regimens. **J Clin Oncol.** 2011 Jan 10;29(2):149-56.

15. Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, et al. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. **J Clin Oncol.** 2010 Oct 1;28(28):4307-15.

16. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. **N Engl J Med.** 2006 Feb 23;354(8):809-20.

17. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med.** 2005 Oct 20;353(16):1673-84.

18. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med.** 2005 Oct 20;353(16):1659-72.

19. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol.** 2006 Feb;19(2):264-71.

20. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR, et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. **Cancer Res.** 2004 Feb 1;64(3):830-5.

21. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. **Lab Invest.** 2002 Nov;82(11):1525-33.

22. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res.** 2004 Aug 15;10(16):5367-74.

23. Wang ZC, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, et al. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. **Cancer Res.** 2004 Jan 1;64(1):64-71.

24. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. **J Pathol.** 2010 Jan;220(2):263-80.

25. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med.** 2009 Feb 19;360(8):790-800.

26. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Res.** 2007;9(5):R65.

27. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Oncol.** 2008 May 20;26(15):2568-81.

28. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2008 May;109(1):123-39.

29. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. **Trends Mol Med.** 2006 Nov;12(11):537-44.

30. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clin Cancer Res.** 2005 Jul 15;11(14):5175-80.

31. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 2003 Oct 1;95(19):1482-5.

32. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene.** 2007 Mar 29;26(14):2126-32.

33. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. **Nat Rev Cancer.** 2004 Oct;4(10):814-9.

34. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. **Cancer Cell.** 2006 Feb;9(2):121-32.

35. Manie E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, Pierron G, Turpin E, Warcoin M, et al. High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. **Cancer Res.** 2009 Jan 15;69(2):663-71.

36. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer.** 2005 Sep 1;116(3):340-50.

37. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med.** 2010 Nov 11;363(20):1938-48.

38. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res.** 2008 Mar 1;14(5):1368-76.

39. Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 Sep;117(1):199-204.

40. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res.** 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.

41. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 May;115(2):423-8.

42. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol.** 2008 Mar 10;26(8):1275-81.

43. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. **Clin Cancer Res.** 2006 Mar 1;12(5):1533-9.

44. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. **BMC Cancer.** 2007;7:134.

45. Tan DS, Marchio C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. **Breast Cancer Res Treat.** 2008 Sep;111(1):27-44.

46. Cristofanilli M, Gonzalez-Angulo A, Sneige N, Kau SW, Broglio K, Theriault RL, et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. **J Clin Oncol.** 2005 Jan 1;23(1):41-8.

47. Hanrahan EO, Hennessy BT, Valero V. Neoadjuvant systemic therapy for breast cancer: an overview and review of recent clinical trials. **Expert Opin Pharmacother.** 2005 Aug;6(9):1477-91.

48. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

49. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999 Aug 3;96(16):9212-7.

50. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res.** 2005 Aug 15;11(16):5678-85.

51. Buchholz TA, Stivers DN, Stec J, Ayers M, Clark E, Bolt A, et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. **Cancer J.** 2002 Nov-Dec;8(6):461-8.

52. Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, Warnat P, Hahn M, Kramer H, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. **J Clin Oncol.** 2006 Apr 20;24(12):1839-45.

53. Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, Kim SJ, Ando A, Miyoshi Y, et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. **J Clin Oncol.** 2005 Jan 20;23(3):422-31.

54. Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol.** 2004 Jun 15;22(12):2284-93.

55. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. **Lancet.** 2003 Aug 2;362(9381):362-9.

56. Kleinerman RA, Tucker MA, Tarone RE, Abramson DH, Seddon JM, Stovall M, et al. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. **J Clin Oncol.** 2005 Apr 1;23(10):2272-9.

57. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. **Oncogene.** 2006 Aug 28;25(38):5220-7.

58. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. **Exp Cell Res.** 1997 Nov 25;237(1):1-6.

59. Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. **Cell Cycle.** 2002 Mar-Apr;1(2):103-10.

60. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell.** 2002 Aug;2(2):103-12.

61. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. **Cell.** 1998 Feb 20;92(4):463-73.

62. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. **Nature.** 2001 Aug 2;412(6846):561-5.

63. Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. **Nature.** 2001 Nov 22;414(6862):457-62.

64. Mann DJ, Higgins T, Jones NC, Rozengurt E. Differential control of cyclins D1 and D3 and the cdk inhibitor p27Kip1 by diverse signalling pathways in Swiss 3T3 cells. **Oncogene.** 1997 Apr 17;14(15):1759-66.

65. Sherr CJ. Cancer cell cycles. **Science.** 1996 Dec 6;274(5293):1672-7.

66. Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. **Mol Cell Biol.** 1996 Dec;16(12):6917-25.

67. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. **Curr Opin Cell Biol.** 1996 Dec;8(6):805-14.

68. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature.** 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

69. L'Allemain G, Lavoie JN, Rivard N, Baldin V, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. **Oncogene.** 1997 Apr 24;14(16):1981-90.

70. Bignon YJ, Rio P. The retinoblastoma gene: will therapeutic use of its tumor suppressive properties be possible?. **Bull Cancer.** 1993 Aug;80(8):704-12.

71. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. **Yonsei Med J.** 2005 Oct 31;46(5):597-613.

72. Cobrinik D, Whyte P, Peeper DS, Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. **Genes Dev.** 1993 Dec;7(12A):2392-404.

73. De Falco G, Bellan C, Lazzi S, Claudio P, La Sala D, Cinti C, et al. Interaction between HIV-1 Tat and pRb2/p130: a possible mechanism in the pathogenesis of AIDS-related neoplasms. **Oncogene.** 2003 Sep 18;22(40):6214-9.

74. Lazzi S, Bellan C, De Falco G, Cinti C, Ferrari F, Nyongo A, et al. Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. **Hum Pathol.** 2002 Jul;33(7):723-31.

75. Cinti C, Leoncini L, Nyongo A, Ferrari F, Lazzi S, Bellan C, et al. Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. **Am J Pathol.** 2000 Mar;156(3):751-60.

76. Cinti C, Giordano A. The retinoblastoma gene family: its role in cancer onset and progression. **Emerg Ther Targets.** 2000;4(6):765-83.

77. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell.** 1994 Nov 18;79(4):573-82.

78. Keyomarsi K, Conte D, Jr., Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. **Oncogene.** 1995 Sep 7;11(5):941-50.

79. Caputi M, Russo G, Esposito V, Mancini A, Giordano A. Role of cell-cycle regulators in lung cancer. **J Cell Physiol.** 2005 Dec;205(3):319-27.

80. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. **J Clin Oncol.** 1998 Mar;16(3):1207-17.

81. Claudio PP, Howard CM, Fu Y, Cinti C, Califano L, Micheli P, et al. Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Res.** 2000 Jan 1;60(1):8-12.

82. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. 20050711 DCOM-20050921(0300-9858 (Print)).

83. Montero C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. 20021227 DCOM-20030203(0022-1554 (Print)).

84. Shi SR, Liu C, Taylor CR. Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. **J Histochem Cytochem.** 2007 Feb;55(2):105-9.

85. David L.Rimm LC, et al. Tissue Microarray Facility. What are tissue microarrays?: Yale University School of Medicine.

86. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA.** 2006 Jun 7;295(21):2492-502.

87. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative

invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer.** 2007 May 1;109(9):1721-8.

88. Chang HR, Glaspy J, Allison MA, Kass FC, Elashoff R, Chung DU, et al. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. **Cancer.** 2010 Sep 15;116(18):4227-37.

89. Masuda H, Masuda N, Kodama Y, Ogawa M, Karita M, Yamamura J, et al. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2010 Jul 1.

90. S. Gildetti CN, M. Zilli, S. Iacobelli. Effect of taxanes following anthracyclines on pathologic complete response (pCR) in patients with triple-negative breast cancer (TNBC) receiving primary systemic therapy (PST). **J Clin Oncol.** 2010 May 20 28(15_suppl):e13129.

91. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol.** 2010 Mar 1;28(7):1145-53.

92. Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. **Breast Cancer.** 2011 Feb 3.

93. Kaori Sakuma MK, Tetsunari Oyama. Pathological tumor response to neoadjuvant chemotherapy using anthracycline and taxanes in patients with triple-negative breast cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine.** 2011;2(2):257-64.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Record form)

เลขที่แบบสอบถาม

ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

คำชี้แจง

1. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

เพื่อศึกษาผลของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา กับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ

2. ผู้กรอกแบบสอบถามได้แก่ ผู้ทำการวิจัยโดยกรอกข้อมูลตามความเป็นจริง ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ หรือทำเครื่องหมาย ✓ ลงใน ☐ ที่กำหนด

3. แบบสอบถามแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

3.1 ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

3.2 ส่วนที่ 2 ข้อมูลของโรค

3.3 ส่วนที่ 3 การรักษา

3.4 ส่วนที่ 4 ผลการรักษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ส่วนที่ 1</u> ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

1.1 ชื่อผู้ป่วย..... HN……

1.2 อายุ……ปี

☐ ยังมีประจำเดือนอยู่

☐ หมดประจำเดือนแล้ว เป็นระยะเวลา.....ปี

1.3 ระดับความสมบูรณ์ของร่างกายก่อนให้ยาเคมีบำบัด (ECOG Performance Status)

☐ 0 (สามารถทำงานและออกแรงได้ตามปกติ ไม่ต่างจากตอนก่อนเป็นมะเร็งเต้านม)

☐ 1 (ทำงานหนักไม่ได้ ทำงานหนักไม่ได้ แต่ยังสามารถเคลื่อนไหวและทำงานเบาๆ รวมทั้งกิจวัตรประจำวันต่างๆ หรืองานบ้านเบาๆได้ เช่น งานสำนักงาน, กวาดพื้น ดูดฝุ่น ปัดฝุ่น ล้างจาน เป็นต้น)

☐ 2 (เคลื่อนไหวได้ กิจวัตรประจำวันต่างๆได้ แต่ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติและ นอนติดเตียงน้อยกว่าร้อยละ 50)

☐ 3 (ช่วยเหลือตนเองได้บ้าง ส่วนใหญ่ต้องอาศัยคนช่วยและนอนติดเตียงมากกว่าร้อยละ 50)

☐ 4 (ทำอะไรไม่ได้เลย และนอนติดเตียงตลอดเวลา)

<u>ส่วนที่ 2</u> ข้อมูลของโรค

2.1 ชนิดของเนื้อเยื่อ

☐ Ductal carcinoma ระบุ (เช่น IDC, DCIS).....

☐ Lobular carcinoma ระบุ.....

☐Medullary carcinoma

☐Mucoid carcinoma

☐ Sarcomatoid carcinoma

2.2 ขนาด

☐T1 (น้อยกว่า 2 ซม.)

☐ T2 (2-5 ซม.)

☐T3 (มากกว่า 5 ซม.)

☐T4 (มีการกระจายถึงผิวหนังหรือผนังทรวงอก หรือมีการอักเสบ)

2.3 ระดับความผิดปกติ

☐Grade 1 (น้อย)

☐Grade 2 (ปานกลาง)

☐Grade 3 (มาก)

2.4 การลุกลามเข้าต่อมน้ำเหลือง

☐ ไม่มี (N0)

☐ N1

☐ N2

☐ N3

2.5 การลุกลามเข้าท่อน้ำเหลืองหรือหลอดเลือด (Lymphovascular invasion)

☐ มี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

☐ ไม่มี

2.6 ความสามารถในการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อออก

☐เอาออกหมด

☐เอาออกไม่หมด

2.7 ระดับยีนที่ควบคุมการเจริญของมะเร็ง (p53)

☐น้อยกว่า 10 เปอร์เซนต์

☐มากกว่าหรือเท่ากับ 10 เปอร์เซนต์

2.8 เปอร์เซนต์การแบ่งตัว (Ki67)

☐น้อยกว่าร้อยละ 15

☐ร้อยละ 15 -30

☐มากกว่าร้อยละ 30

2.9 โปรตีนเรติโนบลาสโตมา

☐มี

☐ไม่มี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ส่วนที่ 3</u> การรักษา

3.1ชนิดของการผ่าตัด

☐ Mastectomy

☐ Breast conservative surgery

☐ ไม่ได้ผ่าตัด

3.2 เคมีบำบัด

☐ ได้

☐ ไม่ได้

3.2ชนิดของยาเคมีบำบัด

☐ Anthracycline-based chemotherapy ระบุ.....

☐ Taxane-based chemotherapy ระบุ.....

☐ CMF ระบุ.....

☐ อื่นๆ ระบุ.....

<u>ส่วนที่ 4</u> ผลการรักษา (Result)

4.1 ระยะเวลาติดตามผล……เดือน

4.2 การได้รับยาเคมีบำบัด

☐ได้ครบทุกรอบ

☐ได้ไม่ครบ

4.3 การตอบสนองต่อการรักษา

☐ หายขาด

☐โรคกลับเป็นอีก (ตอบคำถามข้อ 4.4)

☐เสียชีวิต (ตอบคำถามข้อ 4.5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การรักษาเพิ่มเติมที่ได้รับ

☐เคมีบำบัด

☐ฉายแสง

☐ผ่าตัด

☐รักษาด้วยฮอร์โมน

☐ไม่รักษาเพิ่มเติม

☐อื่นๆ ระบุ.....

4.5 สาเหตุที่เสียชีวิต

☐มะเร็งเต้านม

☐ผลข้างเคียงจากการรักษา

☐อื่นๆ ระบุ.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด ทริปเปิลเนกาทีฟ

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

ข้าพเจ้า นาง /นางสาว .....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่ ..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย(และจะได้รับการชดเชยจาก.....)

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในเอกสารยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย

(Information sheet for research volunteer)

ชื่อโครงการวิจัย ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาจากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ พญ.ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์

ที่อยู่ 1873, รพ.จุฬาลงกรณ์, ถ.พระราม 4, แขวงปทุมวัน, เขตปทุมวัน, กทม. 10330

เบอร์โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-2564533

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียดเพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาหาความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมา ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการขาดเรติโนบลาสโตมาโปรตีนกับการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

เพื่อหาสิ่งบ่งชี้อื่นๆจากการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ที่มีผลต่อการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่ผ่านเกณฑ์ที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ทางผู้วิจัยขอความร่วมมือในการสัมภาษณ์ประวัติการรักษา ร่วมกับทบทวนข้อมูลจากเวชระเบียนผู้ป่วย และส่งย้อมพิเศษเพิ่มเติมจากชิ้นเนื้อที่มีอยู่แล้ว เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ หาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษามากที่สุด

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

ไม่มีเนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้มีส่วนในการตัดสินใจการรักษา และไม่ต้องทำหัตถการใดกับผู้เข้าร่วมวิจัย

ค่าใช้จ่ายสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ผู้สนับสนุนโครงการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการ วิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่านจากการ ลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยมีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ ของท่านได้ตลอดเวลาแม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ พญ. ประคองบุญ สังฆสุบรรณ์ แผนกมะเร็งวิทยา ตึกว่องวานิช ชั้น4 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้

2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์

3.ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย

4. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

5. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่

6. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยการที่ท่านเลือกที่จะไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการตัดสินใจของแพทย์ในการดูแลรักษาโรคของท่าน

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

แสดงการทดสอบสมมติฐาน

เนื่องจากสมมติฐานของการศึกษานี้ คือ

H_0 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ เท่ากับร้อยละ 37

H_1 : ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟไม่เท่ากับร้อยละ 37

เพื่อจะทดสอบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในการศึกษานี้กับสัดส่วนที่ใช้เป็นเกณฑ์ (5) มีความแตกต่างกันหรือไม่ สถิติที่ใช้ คือ

$$Z = \frac{p - \pi}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$$

เมื่อ กำหนด p แทน สัดส่วนของผู้ป่วยบริโภคที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในกลุ่มตัวอย่าง = 0.64

π แทน สัดส่วนของของผู้ป่วยบริโภคที่มีการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟในประชากร = 0.37

n คือ จำนวนตัวอย่าง = 72

จะคำนวณ $Z = 4.75$

ปฏิเสธ H_0 ดังนั้น ความชุกของการขาดโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในผู้ป่วยสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมชนิดทริปเปิลเนกาทีฟ***ไม่เท่ากับร้อยละ 37*** ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ภาคผนวก จ

รูปแสดงการติดสีย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

การอ่านผล จะดูจากเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีการติดสีของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในนิวเคลียส โดยอนุมานว่า การกระจายตัว (Distribution) ของโปรตีนเรติโนบลาสโตมาในนิวเคลียสของเซลล์เท่ากัน การอ่านผล แบ่งเป็น 5 เกรด ตั้งแต่ 0 ถึง 4+

เกรด 0 คือ ไม่มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีเลย

เกรด 1+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีไม่เกินร้อยละ 25 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 2+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 25 แต่ไม่เกินร้อยละ 50 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

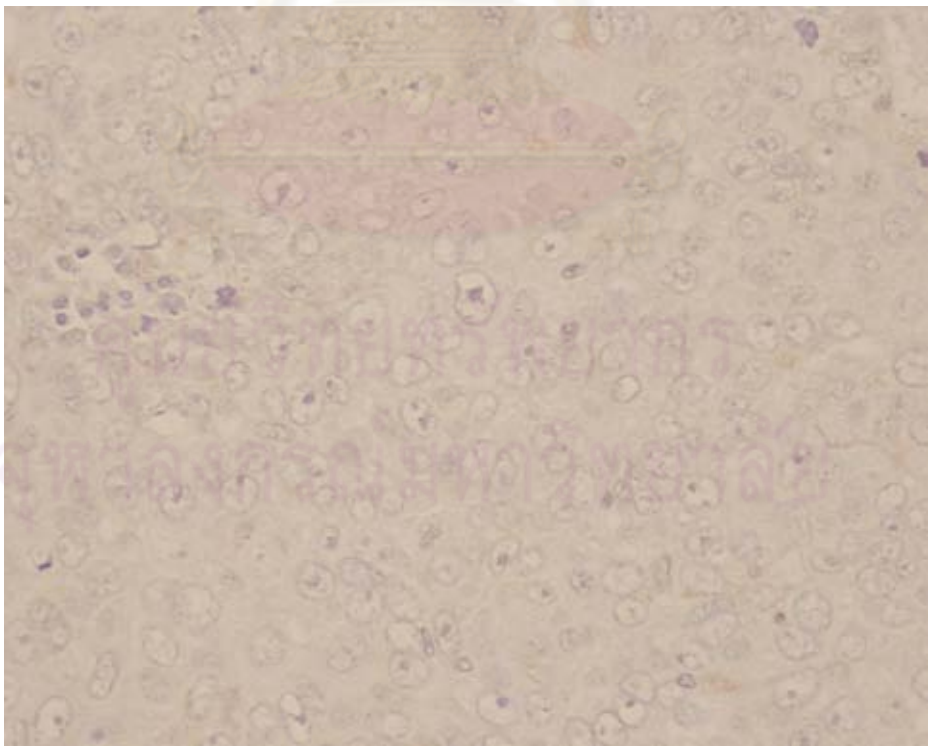
เกรด 3+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดสีมากกว่าร้อยละ 50 แต่ไม่เกินร้อยละ75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

เกรด 4+ คือ มีเซลล์ที่นิวเคลียสติดมากกว่าร้อยละ 75 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งหมด

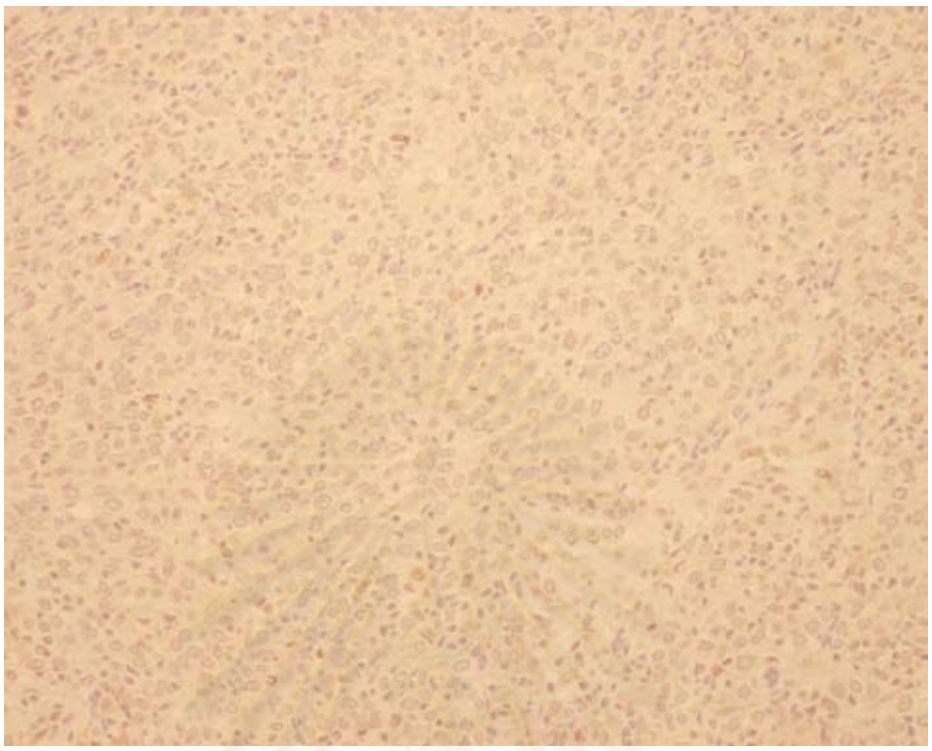
การแปลผล คือ เกรด 0 ถือว่าเป็นลบ (pRB-) คือ ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา และเกรด 1+ ถึง 4+ ถือว่าเป็นบวก (pRB+) คือ มีการแสดงออกของโปรตีนเรติโนบลาสโตมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

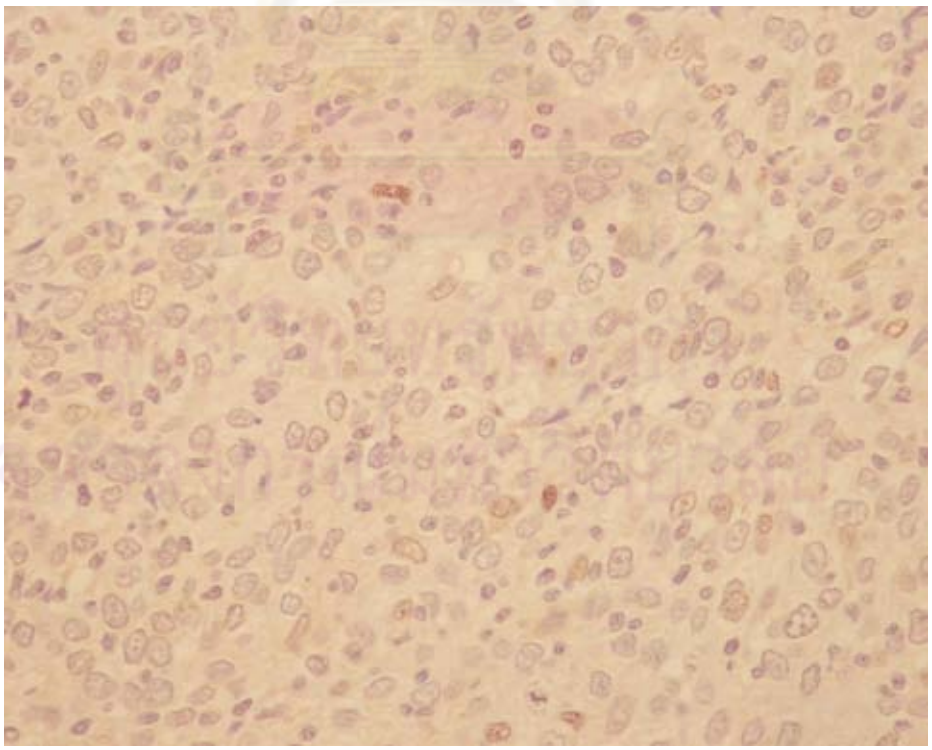
กำลังขยาย 20 เท่า แสดงการติดสีเกรด 0



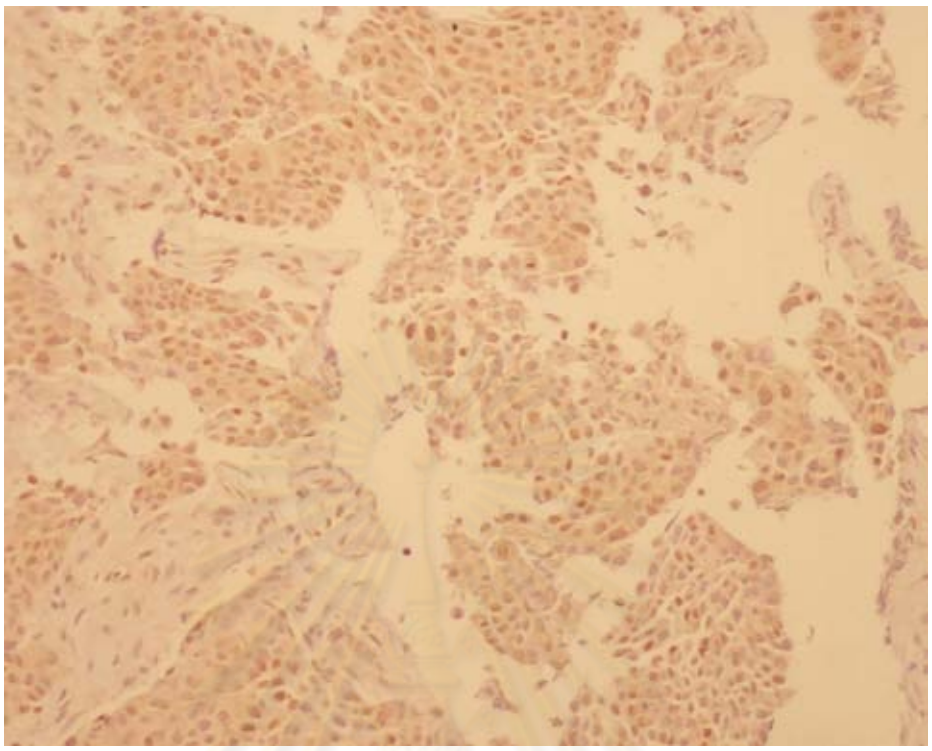
กำลังขยาย 40 เท่า แสดงการติดสีเกรด 0



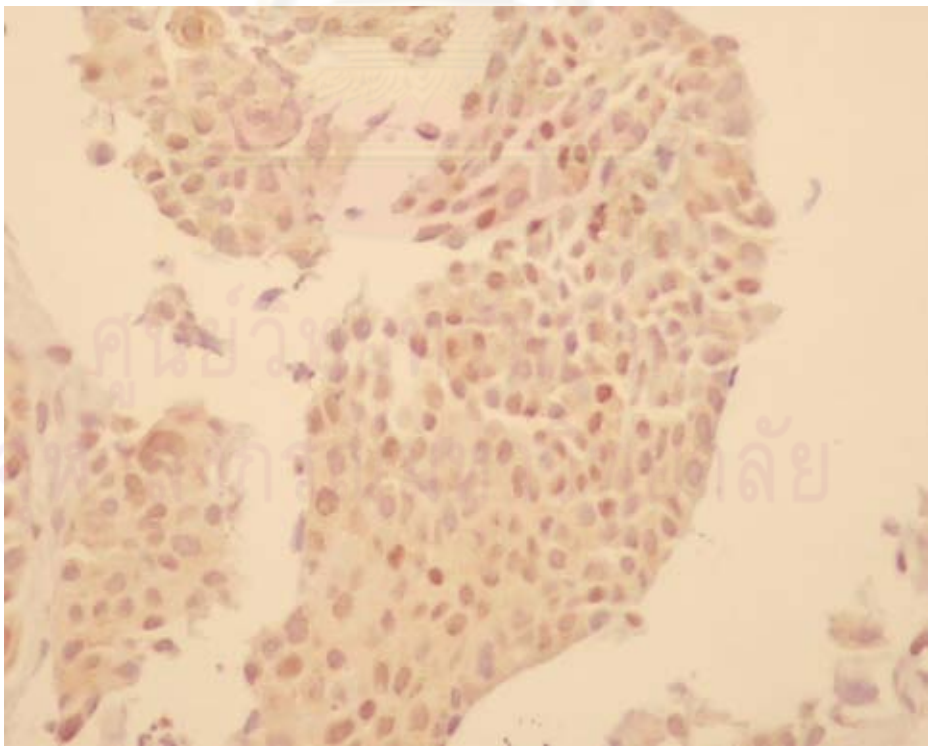
กำลังขยาย 20 เท่า แสดงการติดสีเกรด 1+



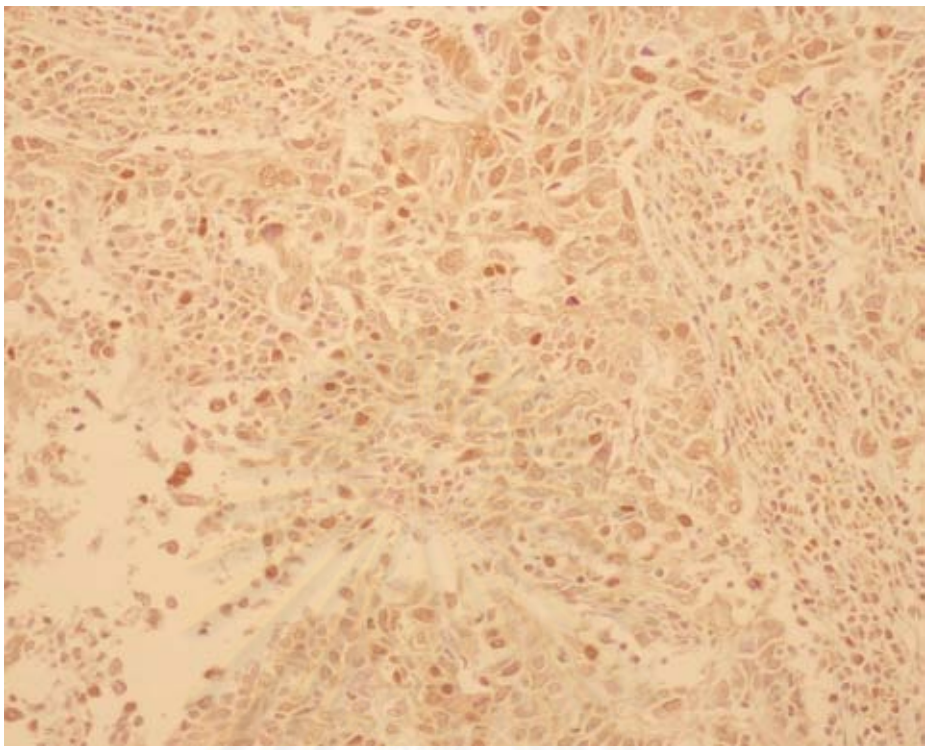
กำลังขยาย 40 เท่า แสดงการติดสีเกรด 1+



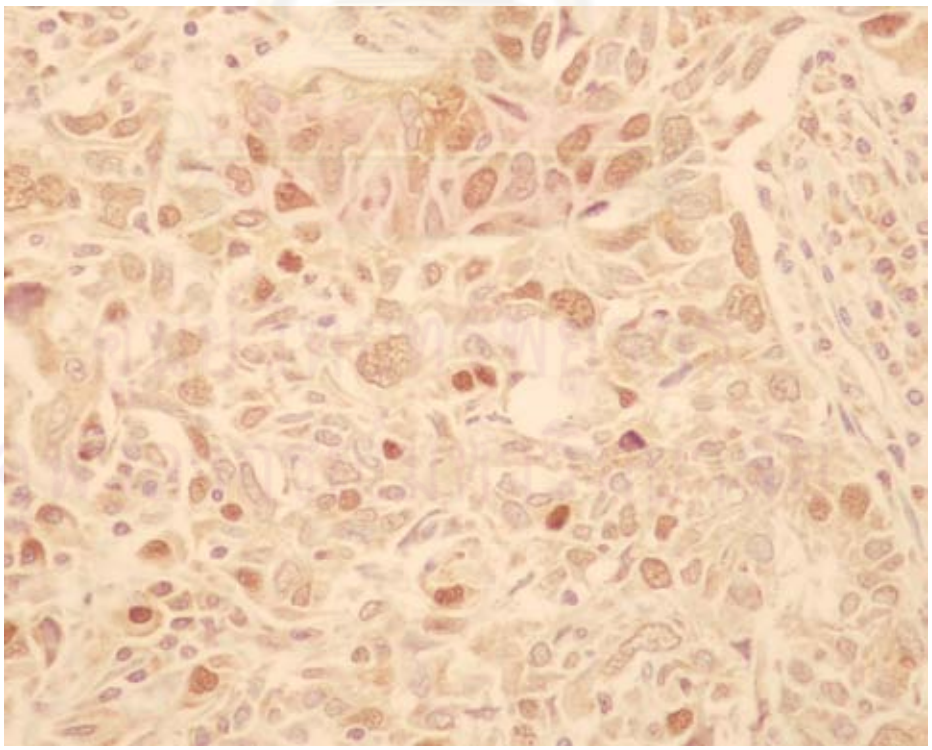
กำลังขยาย 20 เท่า แสดงการติดสีเกรด 2+



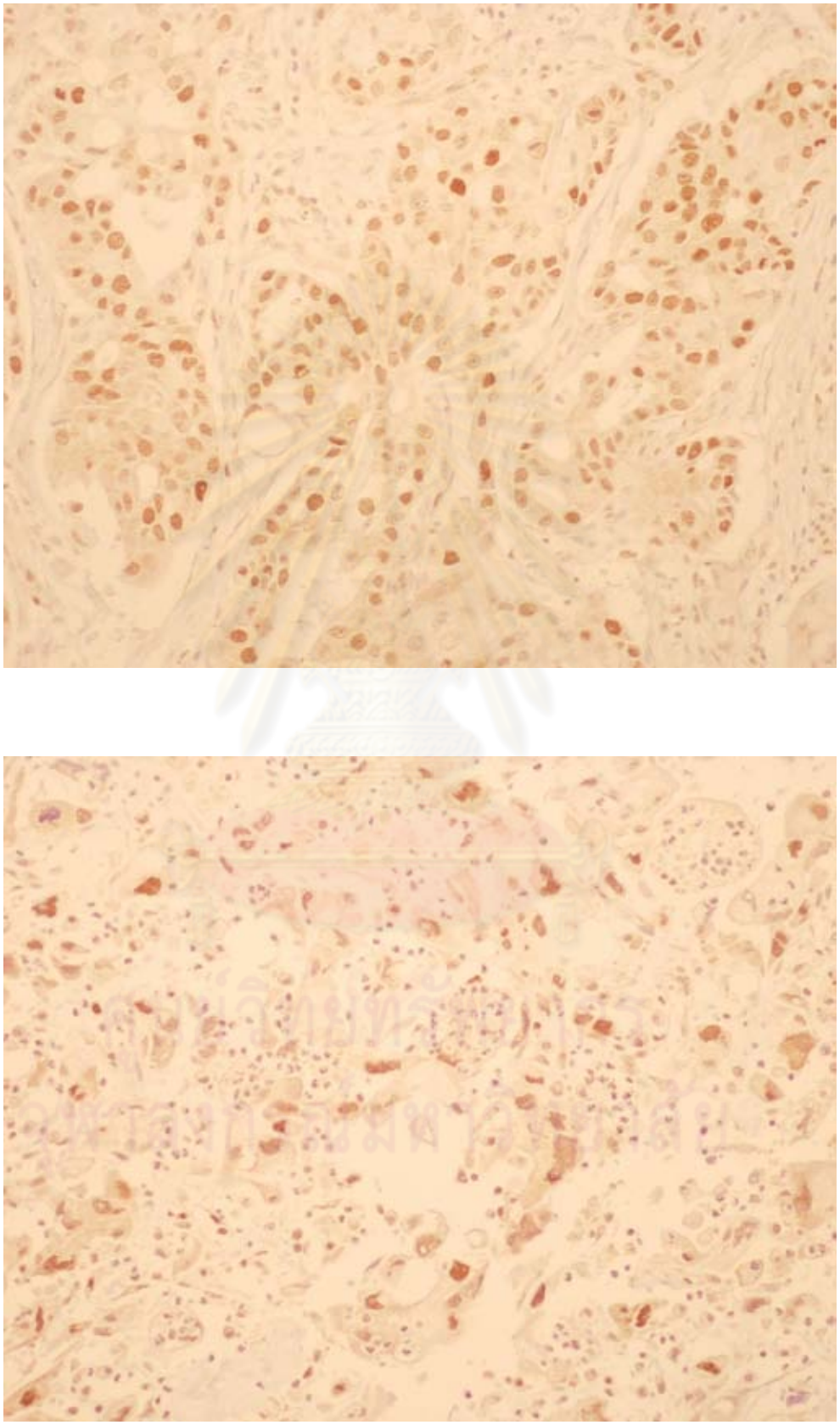
กำลังขยาย 40 เท่า แสดงการติดสีเกรด 2+



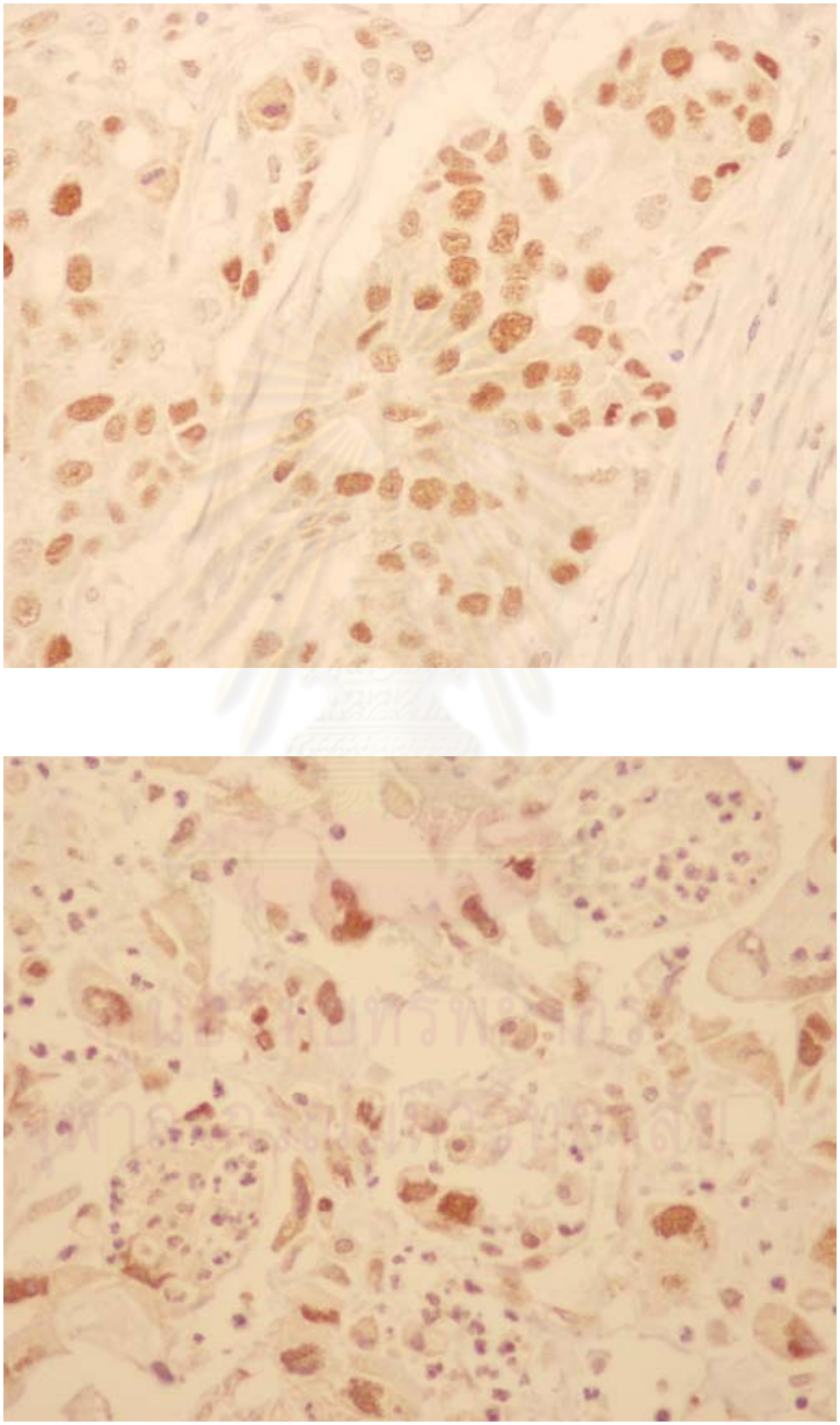
กำลังขยาย 20 เท่า แสดงการติดสีเกรด 3+



กำลังขยาย 40 เท่า แสดงการติดสีเกรด 3+



กำลังขยาย 20 เท่า แสดงการติดสีเกรด 4+



กำลังขยาย 40 เท่า แสดงการติดสีเกรด 4+

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวประคองบุญ สังฆสุบรรณ์

วันเดือนปีเกิด 25 พฤศจิกายน 2525 จังหวัดเชียงใหม่

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2544 – 2550

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2550

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย