ความสัมพันธ์ระหว่างโกลบอลดีเอ็นเอเมธิเลชันและไฮเปอร์เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีนเมธิลกวานีนเมธิลทรานสเฟอเรสในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมามัลติฟอร์เม

นางสาวจาริญญ์ จินดาประเสริฐ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CORRELATION BETWEEN GLOBAL DNA METHYLATION AND LOCAL PROMOTER HYPERMETHYLATION OF METHYLGUANINEMETHYLTRANSFERASE (MGMT) GENE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Miss Jarin Chindaprasirt

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างโกลบอลดีเอ็นเอเมธิเลชันและไฮเปอร์เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีนเมธิลกวานีนเมธิลทรานสเฟอเรสในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมามัลติฟอร์เม
โดย	นางสาวจาริญญ์ จินดาประเสริฐ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ นายแพทย์ไอยวุฒิ ไทยพิสุทธิกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์ไอยวุฒิ ไทยพิสุทธิกุล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิตร)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงธิติยา เดชเทวาพร)

จาริญญ์ จินดาประเสริฐ : ความสัมพันธ์ระหว่างโกลบอลดีเอ็นเอเมธิเลชันและไฮเปอร์เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีนเมธิลกวานีนเมธิลทรานสเฟอเรสในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมามัลติฟอร์เม (CORRELATION BETWEEN GLOBAL DNA METHYLATION AND LOCAL PROMOTERHYPERMETHYLATION OF METHYLGUANINEMETHYLTRANSFERASE (MGMT)GENE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. นพ.ไอยวุฒิ ไทยพิสุทธิกุล, 53 หน้า.

ที่มา: ภาวะเมธิเลชันของจีโนมทั้งหมดที่ลดลงเป็นลักษณะที่สำคัญลักษณะหนึ่งของมะเร็ง ในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมามัลติฟอร์เม (GBM) ภาวะไฮเปอร์เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีนเมธิลกวานีนเมธิลทรานสเฟอเรส (MGMT) เป็นทั้งปัจจัยพยากรณ์โรคที่สำคัญและเป็นปัจจัยทำนายการตอบสนองต่อยาในกลุ่มอัลคีเลชัน หลักฐานในปัจจุบันแสดงว่าระดับเมธิเลชันของจีโนมทั้งหมดจากการตรวจเมธิเลชันของ LINE-1 ในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาต่ำกว่าเนื้องอกสมองชนิด low grade

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไฮเปอร์เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีน MGMT และโกลบอลดีเอนเอเมธิเลชันในเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมา

วิธีการศึกษา: ตรวจชิ้นเนื้อพาราฟินเนื้องอกสมอง GBM ทั้งหมด 70 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่าง พ.ศ.2551 ถึง พ.ศ.2556 โดยการตรวจเมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีน MGMT ใช้วิธี pyrosequencing และ methylation specific polymerase chain reaction (MSP) และการตรวจร้อยละของเมธิเลชันของ LINE-1 ใช้วิธี pyrosequencing

ผลการศึกษา: ชิ้นเนื้องอกสมอง GBM จากผู้ป่วย 70 รายได้เข้าการศึกษานี้ โดยค่ากลางของ LINE-1 และ โปรโมเตอร์ของยีน MGMT เมธิเลชันเท่ากับร้อยละ 66.6 และร้อยละ 8.2 ตามลำดับ ผู้ป่วยร้อยละ 41 ตรวจพบมีค่า LINE-1 เมธิเลชันสูง (> ร้อยละ 68) ตรวจพบเมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีน MGMT ด้วยวิธี MSP ร้อยละ 30 และด้วยวิธี pyrosequencing (> ร้อยละ 22.7) ร้อยละ 25.7 ตามลำดับ การตรวจด้วยวิธีทั้งสองพบว่ามีผลไม่ตรงกันในผู้ป่วย 9 ราย ไม่พบความสัมพันธะหว่างเมธิเลชันของ LINE-1 และ เมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีน MGMT(r=0.094, p=0.44*)*

สรุปผลการวิจัย: ในจำนวนที่จำกัดของเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมา ไม่พบความสัมพันธระหว่างเมธิเลชันของจีโนมทั้งหมดและเมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของยีนเมธิลกวานีนเมธิลทรานสเฟอเรส เมธิเลชันของ LINE-1 ที่ต่ำมีแนวโน้มสัมพันธ์กับการอยู่รอดชีวิตที่ดีกว่า ควรมีการศึกษาในประชากรที่มากขึ้น

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
ปีการศึกษา 2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5674012730 : MAJOR MEDICINE
KEYWORDS: EPIGENETICS / GENOME-WIDE HYPOMETHYLATION / GLOBAL DNA HYPOMETHYLATION / HIGH-GRADE GLIOMA / METHYLGUANINEMETHYLTRANSFERASE

JARIN CHINDAPRASIRT: CORRELATION BETWEEN GLOBAL DNA METHYLATION AND LOCAL PROMOTERHYPERMETHYLATION OF METHYLGUANINEMETHYLTRANSFERASE (MGMT)GENE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME. ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE SRIURANPONG, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR: IYAVUT THAIPISUTTIKUL, M.D., 53 pp.

Background: Genome-wide hypomethylation is one of the cancer characteristics. In glioblastoma multiforme (GBM), hypermethylation of MGMT promoter serves as an important prognostic and a predictive factor for response to alkylating agents. Recent evidence demonstrates that level of genome-wide methylation assessed by measuring level of LINE-1 methylation in glioblastomas is lower compared with those of low-grade gliomas.

Objective: To determine the correlation between the localized methylation in the MGMT promoter and the global DNA methylation in glioblastomas.

Methods: We collected 70 formalin-fixed, paraffin-embedded GBM tissues derived from patients treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital during year 2008-2013. To define MGMT promoter methylation status, we used pyrosequencing and methylation specific polymerase chain reaction (MSP) technique. And pyrosequencing was used to determine the percentage of methylation of LINE-1.

Results: There were 70 GBMs included in this study. The median level of LINE-1 and MGMT promoter methylation were 66.6% and 8.2%, respectively. High LINE-1 methylation (>68%) was found in 41% of the patients. MGMT promoter hypermethylation was described in 30% and 25.7% by MSP and pyrosequencing (>22.7%), respectively. There were 9 patients with discordant MGMT promoter methylation status between these two techniques. There was no correlation between LINE-1 methylation and MGMT promoter methylation (r=0.094, p=0.44).

Conclusion: In limit number of glioblastomas, there is no correlation between genome-wide methylation and MGMT promoter methylation status. Low LINE-1 methylation was associated with a trend for better survival. Further studies in larger population are warranted.

Department:	Medicine	Student's Signature	....
Field of Study:	Medicine	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามจุดประสงค์

1. รองศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

2. อาจารย์ นายแพทย์ไอยวุฒิ ไทยพิสุทธิกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ

3. ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชนพ โชติช่วง ผู้ให้คำปรึกษาการทำวิจัย การวิเคราะห์ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา การตรวจทางห้องปฏิบัติการและช่วยแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ เกี่ยวกับงานวิจัย

4. อาจารย์ ดร.ชินโชติ ธีรภัคภิญโญ

5. คุณปิยะไม จันทร์เกษ

6. คุณ มาธวี อุ่มชอุ้มชญา ศูนย์จีนโปร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยเหลือด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

7. เจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน

สุดท้ายนี้ ขอบพระคุณทั้งบิดา มารดา และครอบครัว ผู้ที่ให้ความช่วยเหลือทุกประการ

Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ

กิตติกรรมประกาศ.. ฉ

สารบัญ.. ช

สารบัญตาราง.. ฌ

สารบัญรูปภาพ.. ญ

สารบัญแผนภูมิ...ฎ

สารบัญกราฟ..ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย.. 1

1.2. คำถามของการวิจัย 2

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.4 สมมุติฐาน 3

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย... 3

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น... 3

1.7 ข้อจำกัดทางการวิจัย... 4

1.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข 4

1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 4

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.. 5

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง... 5

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.1 รูปแบบการวิจัย 16
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย 16
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง 16
3.4 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย 17
3.5 การดำเนินการวิจัย 17
3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล 18
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล 18
3.8 การนำเสนอข้อมูล 19
3.9 ปัญหาทางจริยธรรม 19
บทที่ 4 ผลการศึกษา 20
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 35
5.1 อภิปรายผลการวิจัย 35
5.2 สรุปผลการวิจัย 38
รายการอ้างอิง 39
ภาคผนวก 44
ภาคผนวก ก 45
ภาคผนวก ข 47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 53

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง GBM (n=70)................................ 20

ตารางที่ 2 แสดงอายุของผู้ป่วยแยกตามชนิดเนื้องอกสมอง GBM.. 21

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในแต่ละวิธี.. 22

ตารางที่ 4 แสดงระดับ LINE-1 เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง....................................... 23

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนผู้ป่วยแบ่งตาม MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชัน... 24

ตารางที่ 6 แสดงระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง...................... 25

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกพยาธิวิทยา (clinicopathologic factors) กับระดับของ LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation................. 29

ตารางที่ 8 แสดงการอยู่รอดชีวิตแบ่งตามระดับ LINE-1 เมธิเลชัน.. 30

ตารางที่ 9 แสดงการอยู่รอดชีวิตแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี MSP 31

ตารางที่ 10 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี PSQ 32

ตารางที่ 11 แสดงการอยู่รอดชีวิตตามระดับ LINE-1 และ methylation ของ MGMT.................. 33

ตารางที่ 12 แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง GBM 34

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 ชนิดของ Glioblastoma multiforme และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับแต่ละชนิด (ดัดแปลงจาก Cancer: Principles & Practice of Oncology: Primer of the Molecular Biology of Cancer, 2011).. 7

รูปภาพที่ 2 แสดงการทำงานของ alkyl guanine transferase: AGT เอนไซม์ในการนำหมู่ alkyl ออก ในภาพคือหมู่ methyl (-CH3) ที่ตำแหน่ง O^6- guanine[19] 10

รูปภาพที่ 3 แสดงกลไกการยับยั้งการทำงานของ MGMT ยีนด้วยกระบวนการเอพิเจเนติกเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด[20] 11

รูปภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ epigeneticsเมื่อมีการพัฒนาของเนื้องอกมะเร็ง[29] 13

รูปภาพที่ 5 แสดง methylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี MSP... 48

รูปภาพที่ 6 แสดง unmethylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี MSP 49

รูปภาพที่ 7 แสดง MGMT โปรโมเตอร์โดยแสดงตำแหน่งของ CpG ที่ใช้ในการศึกษา [21] 50

รูปภาพที่ 8 แสดง methylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี PSQ 51

รูปภาพที่ 9 แสดง unmethylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี PSQ 51

รูปภาพที่ 10 แสดงการตรวจ LINE-1 methylation.. 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย 3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 แสดงอายุของผู้ป่วยแยกตามชนิดเนื้องอกสมอง GBM 22

กราฟที่ 2 แสดงระดับ LINE-1 เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง 23

กราฟที่ 3 แสดงร้อยละของ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันจากการตรวจด้วยวิธี PSQ 25

กราฟที่ 4 แสดงระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันจากการตรวจด้วยวิธี PSQ แบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง 26

กราฟที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation ... 26

กราฟที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation ในเนื้องอกสมอง primary GBM และ secondary GBM ตามลำดับ 27

กราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation ในเนื้องอกสมอง primary GBM และ secondary GBM ตามลำดับ 28

กราฟที่ 8 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ LINE-1 เมธิเลชัน........ 31

กราฟที่ 9 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี MSP 32

กราฟที่ 10 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี PSQ 33

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

ถึงแม้เนื้องอกในสมองจะพบน้อยกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆในร่างกาย แต่ภาวะเนื้องอกสมองชนิด glioblastoma หรือ anaplastic glioma นั้น มีการดำเนินโรคที่รุนแรงและการพยากรณ์ที่ไม่ดี โดยค่าเฉลี่ยการมีชีวิตของผู้ป่วยอยู่ประมาณ 14 เดือนหลังได้รับการวินิจฉัย ทั้งๆที่ได้มีการพัฒนาการรักษาทั้งการผ่าตัด การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด [1]

การผ่าตัดโดยการนำเนื้องอกออกให้มากที่สุดโดยยังคงสภาพการทำงานของระบบประสาทได้คือเป้าหมายในการผ่าตัดเนื้องอกสมอง แต่หากเนื้องอกมีการกระจายในสมองมากจนไม่สามารถผ่าตัดออกหมดได้ การผ่าตัดเพียงบางส่วนหรือการตัดชิ้นเนื้อมาตรวจก็ยังจำเป็นเพื่อให้ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง[2] การฉายรังสีหลังการผ่าตัดเป็นการรักษาที่จำเป็น เนื่องจากถึงแม้จะผ่าตัดเอาก้อนเนื้องอกออกได้ทั้งหมดแต่อัตราการกลับเป็นซ้ำที่ตำแหน่งเดิมก็ยังคงสูง โดยการให้การฉายรังสีหลังการผ่าตัดสามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำและยังเพิ่มอัตราการรอดชีวิตด้วย[3]

ยาเคมีบำบัดที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันในการรักษาเนื้องอกสมองหลังการผ่าตัดร่วมกับการฉายรังสีคือยา temozolomide ซึ่งเป็นยากินในกลุ่ม alkylating agent โดยการศึกษาใน phase III พบว่าการให้ยา temozolomide ร่วมกับการฉายรังสี และให้ยาต่ออีก 6 รอบเทียบกับการฉายรังสีอย่างเดียวในผู้ป่วย glioblastoma multiforme สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปี คือ 10 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ 2 เปอร์เซ็นต์ (HR 0.63, 95% CI 0.53-0.75)[4]

ถึงแม้จะมีความก้าวหน้าด้านการรักษาในหลายๆ ด้าน แต่อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยก็ยังไม่มากนัก ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) และพันธุศาสตร์ของเนื้องอกสมอง โดยการศึกษาทั้งในระดับยีนและ epigenetics ซึ่งทำให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับเนื้องอกสมองมากขึ้น

ความผิดปกติในระดับ epigenetics คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของสาย DNA แต่ทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป การเปลี่ยนแปลงที่พบในเนื้องอก เช่น มีการดัดแปลงเบส cytosine ที่อยู่ด้านปลาย 5’ ของ guanine ที่ตำแหน่ง CpG islands โดยมีหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 5’ ของ cytosine บริเวณ CpG islands ลดลง (DNA hypomethylation) หรือการเติมหมู่ methyl

(-CH3) ที่บริเวณ Promoter ของยีนยับยั้งการการก่อมะเร็ง ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง[5] ในเนื้องอกสมองการเติมหมู่ methyl ที่ promoter ของยีน *methylguaninemethyltransferase (mgmt)* เป็นทั้งปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต (prognostic factor) และปัจจัยที่บ่งบอกการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด (predictive factor) [6]

การเปลี่ยนแปลงของ DNA methylation เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งภาวะ global DNA hypomethylation มักจะเกิดร่วมกับ hypermethylation ที่ตำแหน่ง CpG islands[5] ซึ่งเป้าหมายของการศึกษานี้คือเพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ global DNA methylation และ promoter hypermethylation ของ MGMTยีน ในผู้ป่วย glioblastoma รวมทั้งผลต่อการรอดชีวิต

1.2. คำถามของการวิจัย

คำถามวิจัยหลัก: ภาวะ global DNA methylation มีความสัมพันธ์กับภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) ในเนื้องอกสมอง glioblastoma มากกว่า 0.3 หรือไม่

คำถามวิจัยรอง: ภาวะ global DNA methylation และภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) เป็นปัจจัยพยากรณ์โรคของเนื้องอกสมอง glioblastoma หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ global DNA methylationกับภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) ในเนื้องอกสมอง glioblastoma
2. เพื่อศึกษาว่าภาวะ global DNA methylation และภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) เป็นปัจจัยพยากรณ์โรคของเนื้องอกสมอง glioblastoma

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

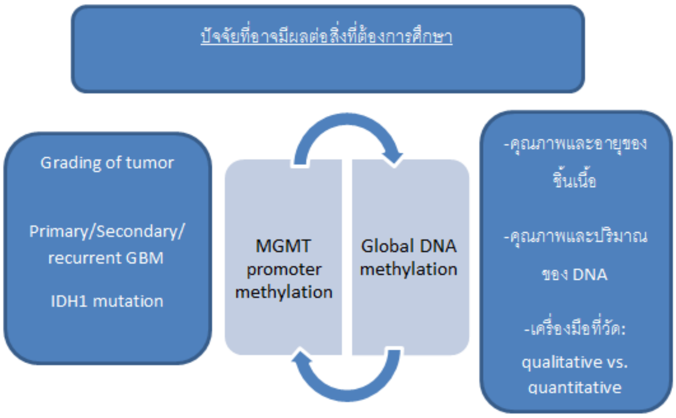
1.4 สมมุติฐาน

Ho: ในโรคเนื้องอกสมอง glioblastoma ภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) มีความสัมพันธ์กับภาวะglobal DNA methylation น้อยกว่า 0.3

Ha: ในโรคเนื้องอกสมอง glioblastoma ภาวะ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) มีความสัมพันธ์กับภาวะglobal DNA methylation ในทิศทางบวกมากกว่า 0.3

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

- วันที่ได้รับการวินิจฉัย คือวันที่มีผลทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็น glioblastoma multiforme
- วันที่โรคลุกลาม คือวันที่มีการตรวจทางรังสีวิทยายืนยันว่ามีการลุกลามของโรคร่วมกับในประวัติการรักษามีบันทึกว่าโรคลุกลาม
- Primary GBM คือ เนื้องอกสมอง GBM ที่เกิดขึ้นโดยไม่มีประวัติเนื้องอกสมองมาก่อน

- Secondary GBM คือเนื้องอกสมอง GBM ที่เกิดขึ้นโดยมีประวัติเนื้องอกสมอง low-grade glioma หรือ anaplastic astrocytoma นำมาก่อน
- ผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคนับเป็นคนละ sample unit โดยนับวันที่โรคกลับเป็นซ้ำคือวันที่ได้รับการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยายืนยันเช่นกัน

1.7 ข้อจำกัดทางการวิจัย

- ค่าที่ได้จากตรวจ LINE-1 methylation และ pyrosequencing อาจไม่เที่ยงตรงได้ถ้าชิ้นเนื้อเก็บไม่ดีหรือมีอายุนานเกินไป เนื่องจากศึกษาจากชิ้นเนื้อที่เก็บใน paraffin-embedded specimen
- ชิ้นเนื้อที่ได้จากการทำ biopsy อาจมีปริมาณน้อย ทำให้ไม่พอในการตรวจเพิ่มเติม
- ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกอาจเก็บได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบ retrospective analysis

1.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรการแก้ไข

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการเก็บข้อมูลผู้ป่วยย้อนหลัง อาจทำให้ไม่สามารถเก็บข้อมูลตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคได้ครบถ้วน การแก้ไขคือ ต้องมีการสอบถามประวัติผู้ป่วยเพิ่มเติมก่อนเข้าทำการวิจัยหรือศึกษาแบบ prospective study

1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง global DNA methylation และ local promoter hypermethylationของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) ในเนื้องอกสมอง glioblastoma

3. ทราบว่า global DNA methylation และ local promoter hypermethylation ของ *methylguaninemethyltransferase* (*mgmt*) มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง glioblastoma อย่างไร อาจจะนำมาประยุกต์ใช้ในการเลือกการรักษาในผู้ป่วยแต่ละรายได้เหมาะสมยิ่งขึ้น

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ถึงแม้เนื้องอกในสมองจะพบน้อยกว่ามะเร็งชนิดอื่นๆในร่างกายเพียงร้อยละ 2 ของมะเร็งทั้งหมด แต่ภาวะเนื้องอกสมองชนิด glioblastoma multiforme หรือ anaplastic glioma นั้นพบมากที่สุดของเนื้องอกสมองทั้งหมด โดยมีการดำเนินโรคที่รุนแรงและการพยากรณ์ที่ไม่ดี โดยค่าเฉลี่ยการมีชีวิตของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามาตรฐานอยู่ประมาณ 14 เดือนหลังได้รับการวินิจฉัย ทั้งๆที่มีการพัฒนาการรักษาทั้งการผ่าตัด การฉายรังสี และการให้ยาเคมีบำบัด[1]

การผ่าตัดเพื่อนำเนื้องอกออกให้มากที่สุดโดยยังคงสภาพการทำงานของระบบประสาทได้คือเป้าหมายในการผ่าตัดเนื้องอกสมอง แต่หากเนื้องอกมีการกระจายในสมองมากจนไม่สามารถผ่าตัดออกหมดได้ การผ่าตัดเพียงบางส่วนหรือการตัดชิ้นเนื้อมาตรวจก็ยังจำเป็นเพื่อให้ได้รับการวินิจฉัยที่ถูกต้อง[2] การฉายรังสีหลังการผ่าตัดเป็นการรักษาที่จำเป็น เนื่องจากถึงแม้จะผ่าตัดเอาก้อนเนื้องอกออกได้ทั้งหมดแต่อัตราการกลับเป็นซ้ำที่ตำแหน่งเดิมก็ยังคงสูง โดยการฉายรังสีหลังการผ่าตัดสามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำและยังเพิ่มอัตราการรอดชีวิตด้วย[3]

ยาเคมีบำบัดที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันในการรักษาเนื้องอกสมองหลังการผ่าตัดร่วมกับการฉายรังสีคือยา temozolomide ซึ่งเป็นยากินในกลุ่ม alkylating agent โดยการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 พบว่าการให้ยา temozolamide ร่วมกับการฉายรังสี และให้ยาต่ออีก 6 รอบเทียบกับการฉายรังสีอย่างเดียวในผู้ป่วย glioblastoma multiforme สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปีคือร้อยละ 10 เทียบกับร้อยละ 2 (HR 0.63, 95%CI 0.53-0.75)[4]

ถึงแม้จะมีความก้าวหน้าด้านการรักษาในหลายๆ ด้าน แต่อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยก็ยังไม่มากนัก ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษาด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) และพันธุศาสตร์ของเนื้องอกสมอง โดยการศึกษาทั้งในระดับยีนและ epigenetics ซึ่งทำให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับเนื้องอกสมองมากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 เนื้องอกสมอง

เนื้องอกสมอง glioma เป็นเนื้องอกสมองที่กำเนิดจาก glial cells เช่น astrocytes oliogodendrocytes และ ependymal cells โดย glioma เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุด

การแบ่งชนิด

การแบ่งชนิด glioma นั้นแบ่งตาม grading ตามลักษณะความรุนแรงทางพยาธิวิทยา โดยแบ่งตาม 2007 World Health Organization (WHO) [7], 2007 แบ่งได้เป็น

Grade I Pilocytic astrocytoma

Grade II Oligodendroglioma, Astrocytoma

Grade III Anaplastic oligodendroglioma/astrocytoma/oligoastrocytoma

Grade IV Glioblastoma multiforme (GBM)

โดย high-grade (malignant) gliomas นับตั้งแต่ grade III ขึ้นไป คือรวม anaplastic oligodendroglioma, anaplastic astrocytoma และ glioblastoma

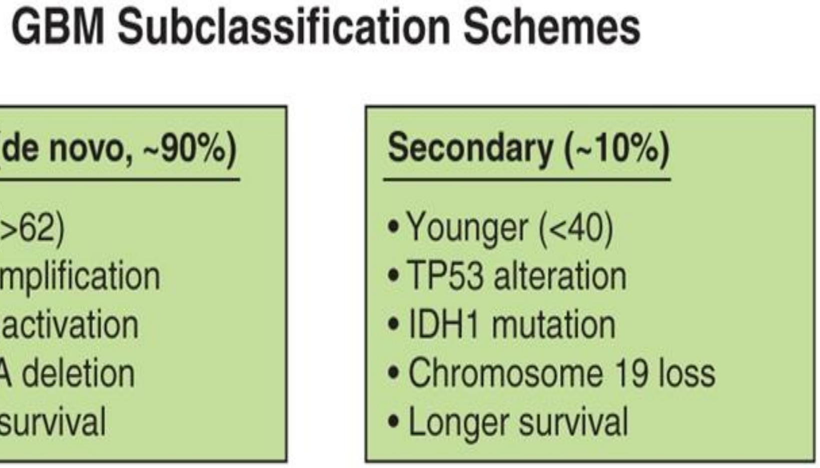
Glioblastoma แบ่งได้เป็น 2 ชนิด [8] คือ

1. primary glioblastoma คือ เนื้องอก glioblastoma ที่เกิดขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงมาจากเนื้องอกกลิโอมาชนิด low grade มักพบในผู้ป่วยอายุมาก ส่วนใหญ่ของผู้ป่วย glioblastoma มักเป็น primary glioblastoma

2. secondary glioblastoma คือ เนื้องอก glioblastoma ที่มีการเปลี่ยนแปลงมาจากเนื้องอกสมองกลิโอมา grade II หรือ grade III มักพบในผู้ป่วยอายุน้อย

โดยทั้ง 2 ชนิดมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ดังรูปภาพที่ 1

รูปภาพที่ 1 ชนิดของ Glioblastoma multiforme และการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับแต่ละชนิด (ดัดแปลงจาก Cancer: Principles & Practice of Oncology: Primer of the Molecular Biology of Cancer, 2011)



อาการและอาการแสดง

อาการแสดงนำของผู้ป่วยเนื้องอกสมองแบ่งเป็น

- อาการที่เกิดจากความดันในกะโหลกศีรษะสูงขึ้นจากการที่มีก้อนในสมอง ได้แก่ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ระดับความรู้สึกตัวเปลี่ยนแปลง
- อาการที่เกิดจากเนื้องอกมีผลต่อระบบประสาทเฉพาะตำแหน่ง ทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นกับตำแหน่งของสมอง
- หากเนื้องอกอยู่บริเวณสมองน้อยหรือ posterior fossa อาจอุดกั้นการไหลเวียนของทางเดินน้ำไขสันหลัง ส่งผลให้เกิด hydrocephalus ซึ่งทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ อาเจียน หรือไม่รู้สติได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การรักษา

การรักษา malignant glioma ที่ดีที่สุดคือการรักษาแบบผสมผสานคือการผ่าตัด ร่วมกับการฉายรังสีและเคมีบำบัด

Surgical resection

การรักษาหลักของเนื้องอกสมอง glioblastoma นั้นคือการผ่าตัดเพื่อนำเนื้องอกออกให้มากที่สุดโดยยังคงสภาพการทำงานของระบบประสาทได้

การผ่าตัดเนื้องอกสมองกลิโอมามีจุดประสงค์หลัก 2 ประการ

1. การผ่าตัดเพื่อได้ชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัย โดยสามารถได้จากการผ่าตัดเอาก้อนเนื้องอกออกทั้งหมด หรือผ่าตัดชิ้นเนื้อ (biopsy)

2. การผ่าตัดเพื่อนำก้อนเนื้องอกออกทั้งหมด (tumor removal) พบว่าการผ่าตัดที่นำเนื้องอกออกทั้งหมดนั้นได้ผลดีกว่าการนำเนื้องอกออกบางส่วน โดยในการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ไม่มีก้อนเนื้องอกเหลืออยู่หลังได้รับการผ่าตัดนั้นมีการรอดชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่ผ่าตัดนำเนื้องอกออกไม่หมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ 17.9 เดือนเทียบกับ 12.9 เดือน $p<0.001$[9]

Radiotherapy

แม้ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดก้อนเนื้องอกออกทั้งหมดแล้วก็ยังมีอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง โดยมีการศึกษาพบกว่าการฉายรังสีหลังการผ่าตัดสามารถลดการกลับเป็นซ้ำที่ตำแหน่งเดิมและสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้ ในการศึกษาตั้งแต่ในช่วงปี ค.ศ. 1970-1980 พบว่าการฉายรังสีแบบทั้งสมอง (whole-brain radiotherapy) หลังการผ่าตัดสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดหลังการผ่าตัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกล่าวคือ 35 สัปดาห์ เทียบกับ 14.5 สัปดาห์[10] ในยุคต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคในการฉายรังสี และพบว่าการฉายรังสีแบบเฉพาะส่วน (involved-field radiotherapy: IFRT) สามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำ[11] และสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง จึงได้กลายเป็นมาตรฐานในการรักษา โดยฉายรังสี 60 Gy ใน 30 ครั้ง ใช้ระยะเวลาในการรักษา 6-8 สัปดาห์

Chemotherapy

การให้ยาในการรักษาเนื้องอกสมองนั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือการผ่านของยาเข้าสู่เนื้อสมองจำเป็นต้องเป็นยาที่ผ่าน blood-brain barrier ได้ดี ยาเคมีบำบัดที่ใช้ได้จึงมีจำกัด มีการศึกษาการให้เคมีบำบัดในการรักษา glioblastoma ตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ.1970-1980 ซึ่งพบว่าการให้ยาในกลุ่ม nitrosoureas สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้[12] จากนั้นได้มีการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 ในผู้ป่วย gliblastoma โดยแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว (2 Gy ต่อวัน 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้น 60 Gy) และกลุ่มที่ได้รับยา temozolomide ร่วมกับการฉายรังสีหลังการผ่าตัด (75 มก./ตร.ม.ของพื้นที่ผิวร่างกาย ทุกวันตั้งแต่วันแรกถึงวันสุดท้ายของการฉายรังสี) และให้ยา temozolomide ต่ออีก 6 รอบ (150-200 มก./ตร.ม.ของพื้นที่ผิวร่างกาย) 5 วันใน 28 วันโดยกลุ่มที่ได้รับยานั้นมีระยะเวลาการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 2.5

เดือนคือจาก 12.1 เดือนเป็น 14.6 เดือน และเพิ่มอัตราการอยู่รอดที่ 2 ปีจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 26 โดยมีผลข้างเคียงไม่มาก[13] ดังนั้นยา temozolomide จึงเป็นยาเคมีบำบัดมาตรฐานในการรักษา glioblastoma ในปัจจุบัน

2.2.2 ตัวบ่งชี้ทางโมเลกุลของเนื้องอกสมองกลิโอมา

ในทศวรรษที่ผ่านมาความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิวิทยาของเนื้องอกสมองกลิโอมาได้เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก มีการค้นพบยีนที่เกี่ยวกับเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดมากขึ้น ซึ่งสามารถบ่งบอกการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษา

- การกลายพันธุ์ของ isocitrate dehydrogenase (IDH)

การกลายพันธุ์ของ IDH ยีน 1 หรือ 2 นั้นเป็นลักษณะซึ่งพบได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการพัฒนาเป็น glioma โดยจะตรวจพบในเนื้องอกสมองกลิโอมาชนิดอื่นๆได้บ่อยกว่าเนื้องอกสมองชนิด primary glioblastoma[14]

การกลายพันธุ์ของ IDH ยีนเป็นตัวบ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ดีในกลิโอมาชนิด high grade[14] และเป็นตัวบ่งชี้ถึงผลการรักษาที่ดีในผู้ป่วย anaplastic oligodendroglioma และ anaplastic oligoastrocytoma ที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดสูตร PCV (procarbazine/lomustine/vincristine)[15]

- การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใน glioblastoma

การค้นพบที่สำคัญของ The Cancer Genome Atlas (TCGA) ได้นำไปสู่ความเข้าใจทางพันธุกรรมเกี่ยวกับความหลากหลายของ glioblastoma มากขึ้น[16] การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่พบบ่อยได้แก่ 1. การกลายพันธุ์และการเพิ่มจำนวนของ epidermal growth factor receptor (EGFR) 2. การเสียของยีนกดการทำงานของกระบวนการเกิดมะเร็งphosphatase and tensin homolog (PTEN) 3. การขาดหายและการกลายพันธุ์ของยีนretinoblastoma 1 (RB1) 4. การขาดหายของ cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN2A/B) และ 5. การขาดหายและการกลายพันธุ์ของยีน neurofibromin (NF1)

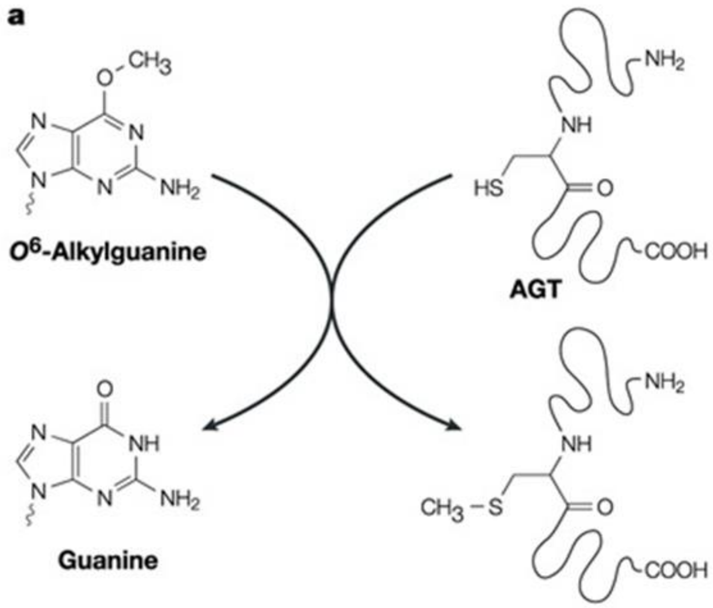
การแสดงออกทางพันธุกรรมของเนื้องอก glioblastoma ทำให้สามารถจัดกลุ่มผู้ป่วยเป็นชนิดย่อยๆ ได้โดยมีความแตกต่างทางลักษณะทางคลินิกด้วย โดยจัดเป็น proneural classical proliferative และ mesenchymal ซึ่งผู้ป่วยกลุ่ม proneural มีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่ากลุ่ม

mesenchymal หรือ proliferative[17] และในกลุ่มของ proneural นั้นมี glioblastoma ชนิดที่มี DNA methylation แบบเฉพาะซึ่งเรียกว่า Glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) ซึ่งมีการพยากรณ์โรคดีกว่า[18]

- ภาวะ methylation ของ MGMT promoter

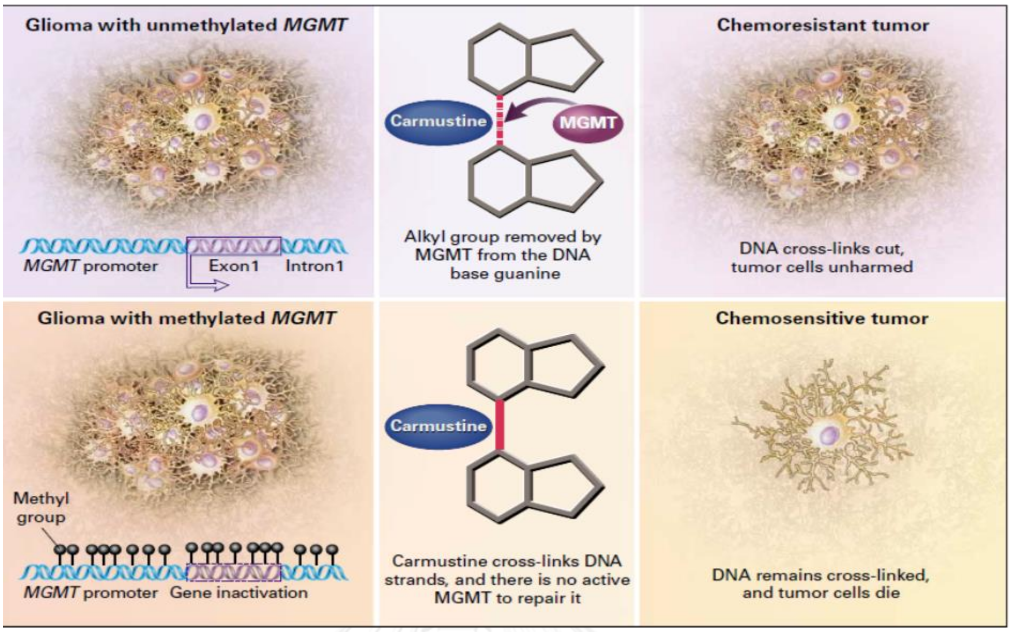
MGMT (methylguanine methyltransferase) คือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA เมื่อมีการให้ยากลุ่ม alkylating agent เช่น temozolomide ส่งผลให้เกิดการเมธิเลชันของเบสนิวคลีโอไทด์ใน DNA และจำเป็นต้องใช้ MGMT ในการซ่อมแซมโดยเฉพาะในตำแหน่ง O^6-methylguanine ซึ่งเป็นตำแหน่งที่รุนแรง เมื่อเกิด alkylation จะส่งผลให้เซลล์ตายได้ [19] (รูปภาพที่ 2)

รูปภาพที่ 2 แสดงการทำงานของ alkyl guanine transferase: AGT เอนไซม์ในการนำหมู่ alkyl ออก ในภาพคือหมู่ methyl (-CH3) ที่ตำแหน่ง O^6- guanine[19]



ความผิดปกติของโปรตีน MGMT เกิดได้ทั้งระดับ genetics คือมีการ mutation ของ *methylguaninemethyltransferase* ซึ่งพบได้น้อยมาก และความผิดปกติของระดับ epigenetics คือการควบคุมการ methylation ผ่าน promoter gene โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของการลำดับเบสในสาย DNA บน *methylguaninemethyltransferase* ซึ่งพบว่ามี MGMT promoter methylation ประมาณร้อยละ 30 ดังรูปภาพที่ 3

รูปภาพที่ 3 แสดงกลไกการยับยั้งการทำงานของ MGMT ยีนด้วยกระบวนการเอพิเจเนติกเพิ่มการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด[20]



ในเนื้องอกสมอง malignant glioma พบว่าการมี MGMT promoter hypermethylation นั้นส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีน MGMT ลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการตอบสนองต่อยา temozolomide กล่าวคือ ผู้ป่วยในกลุ่มที่มี hypermethylation และได้รับการรักษาด้วยยา temozolomide นั้นมีผลการรักษาที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่พบ hypermethylation ของ MGMT promoter (predictive factor) ในขณะเดียวกันภาวะนี้ก็ยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการดำเนินโรค (prognostic factor) คือผู้ป่วยที่มี MGMT promoter hypermethylation จะมีโอกาสรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มที่ไม่มี โดยไม่ขึ้นกับการรักษา ในผู้ป่วยที่มี methylated MGMT promoter ที่ได้รับเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสีอัตราการอยู่รอดที่ 2 ปีเท่ากับร้อยละ 13.8 เทียบกับน้อยกว่าร้อยละ 2 ในกลุ่มที่ unmethylated MGMT promoter[6]

วิธีการตรวจสถานะของ methylation บน promoter ของยีน MGMT มีหลายวิธีเช่น

1. การดู MGMT promoter methylation โดยใช้ methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) จาก paraffin-embedded tissue โดยรายงานผลเป็น methylated และ unmethylated MGMT ข้อด้อยของวิธีนี้คือเป็นการตรวจเชิงคุณภาพ ไม่สามารถรายงานเป็นปริมาณได้ และถ้าคุณภาพของ DNA ที่นำมาตรวจไม่ดี

จะไม่สามารถทำได้ รวมทั้งไม่สามารถตรวจแบบแผนของการ methylation ที่ไม่สม่ำเสมอได้[21]

2. Pyrosequencing (PSQ) คือการตรวจลำดับเบสที่ตำแหน่งเฉพาะที่ต้องการตรวจ โดยการตรวจการปล่อยแสงเมื่อมีการเติม nucleotide ในสาย DNA และสามารถรายงานผลของ methylation โดยรายงานค่าเป็นเปอร์เซนต์ สามารถตรวจได้โดยใช้ paraffin-embedded tissue ข้อจำกัดคือสามารถตรวจได้เพียง 25-30 คู่เบส และยังไม่มีค่า cut-point ที่แน่นอน
3. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)
4. การวัดระดับของโปรตีน MGMT โดยวิธี immunohistochemistry

โดยพบว่าวิธี Methylation-specific PCR และ pyrosequencing สามารถทำนายการอยู่รอดชีวิตโดยโรคไม่กำเริบ (progression-free survival) ได้ดีกว่าการใช้ลักษณะทางคลินิกอย่างมีนัยสำคัญ แต่วิธี MS-MLPA ไม่สามารถทำนายได้[21, 22] เนื่องมาจากการตรวจด้วยวิธี MSP และ PSQ นั้นมีความคาบเกี่ยวกันในตำแหน่งของ CpG ที่นำมาศึกษาซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบว่าสำคัญที่สุดในการแสดงออกของ *methylguaninemethyltransferase* และมีการศึกษามากที่สุด ในขณะที่การใช้วิธี MS-MLPA นั้นตำแหน่งของ CpG ที่ศึกษากระจายอยู่ทั่วไปใน MGMT CG island ซึ่งทำให้การทำนายการอยู่รอดชีวิตโดยโรคไม่กำเริบด้อยกว่า

สำหรับการตรวจด้วย immunohistochemistry นั้น ไม่พบว่าสัมพันธ์กับการอยู่รอดของผู้ป่วย[23] และมีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับการรักษาอีกด้วย[24] การศึกษาในประชากรไทยพบว่าความถี่ของ MGMT overexpression ในผู้ป่วย malignant astrocytoma ในโรงพยาบาลรามาธิบดีเท่ากับ 31% (ตรวจด้วยการย้อม immunohistochemistry)และค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 11.9 เดือน และอัตราการอยู่รอดที่ 1 ปี และ 5 ปี เท่ากับ 50% และ 21% ตามลำดับ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตคือโรคเบาหวาน ความผิดปกติทางระบบประสาทตั้งแต่วินิจฉัย และการได้รับการรักษาด้วยวิธีการเดียว แต่ภาวะ MGMT overexpression ไม่ได้ส่งผลต่อการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วย และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด[25]

การตรวจตัวบ่งชี้เหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในการดูแลผู้ป่วยโดยเฉพาะการตัดสินใจในการเลือกการรักษา ซึ่งในผู้ป่วยที่มีสภาพร่างกายแข็งแรง อายุไม่มากนั้น หากไม่มีการรักษาที่ดีกว่าการฉายรังสี

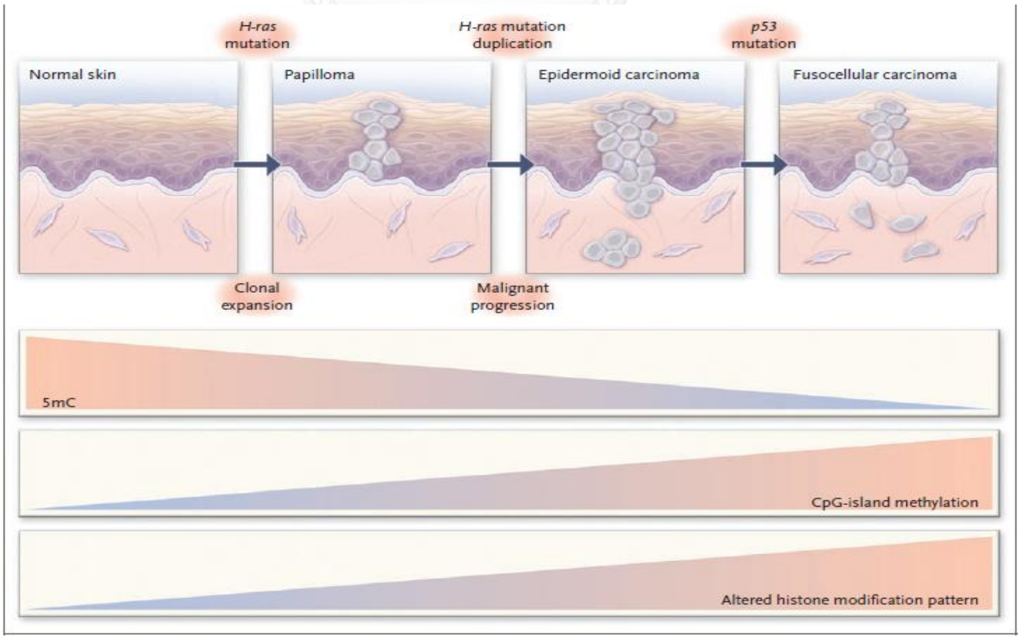
ร่วมกับการ temozolomide แล้ว ก็อาจไม่จำเป็นต้องส่งตรวจ methylation status ของ *methylguaninemethyltransferase* ทุกราย ในทางตรงกันข้าม ในผู้ป่วยสูงอายุซึ่งมีการศึกษาพบว่าการให้ยาเคมีบำบัดมีประสิทธิภาพเทียบเคียงได้กับการฉายรังสีอย่างเดียว การตรวจ MGMT status นั้นสามารถนำมาช่วยในการตัดสินใจ กล่าวคือให้ยาเคมีบำบัดสำหรับเนื้องอกที่มี methylation ของ MGMT และฉายรังสีสำหรับเนื้องอกที่มี unmethylation ของ MGMT(26-28)

2.2.3 Global DNA methylation และมะเร็ง

การตรวจพบการลดลงของระดับ DNA methylationในเนื้องอกเมื่อเทียบกับในเนื้อเยื่อปกติของอวัยวะเดียวกันนั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงระดับ epigenetics ที่ถูกค้นพบลำดับแรกๆในการศึกษามะเร็งในมนุษย์ การลดลงของ methylation นั้นส่วนใหญ่เกิดจากการเกิด hypomethylation ของลำดับ DNA ที่ซ้ำๆ กัน และการ demethylation ของสาย DNA

ในการพัฒนาเป็นเนื้องอกมะเร็งนั้น ภาวะ hypomethylation ของดีเอนเอเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับเมื่อรอยโรคค่อยๆ พัฒนาจากเนื้องอกธรรมดาไปสู่เนื้องอกมะเร็งที่มีการลุกลาม(29) ดังรูปภาพที่ 4

รูปภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับ epigeneticsเมื่อมีการพัฒนาของเนื้องอกมะเร็ง(29)



ภาวะ global DNA hypomethylation พบร่วมกับ hypermethylation ของ CpG islands ได้บ่อยในโรคมะเร็ง[30] โดยผู้ป่วยที่มีภาวะ hypomethylation ในมะเร็งลำไส้นั้นมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่แย่กว่าผู้ป่วยที่ไม่มี(31) ในเนื้องอกสมองนั้น มีการศึกษาภาวะ global DNA methylation ด้วยการตรวจ Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) พบว่า LINE-1 methylation ในเนื้องอกสมอง glioblastoma มีค่าน้อยกว่าในเนื้องอกสมอง low-grade glioma และเนื้อสมองปกติ รวมทั้งภาวะ LINE-1 methylation ในเนื้องอกสมอง low-grade glioma และ GBM นั้นมีความสัมพันธ์ในทิศทางบวกกับ MGMT promoter hypermethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า r=0.335 นอกจากนี้ยังพบว่า LINE-1 methylation ที่สูงนั้นเป็นปัจจัยที่ส่งผลดีต่อการรอดชีวิต[32]

การตรวจ global level of DNA methylation นั้นทำได้หลายวิธีเช่น

1. การวัดระดับ LINE-1 (Long interspersed nuclear element-1) methylation ด้วยวิธี pyrosequencing โดย LINE-1 คือ DNA ที่พบได้หลายชุดกระจายในจีโนม มีประมาณ 18% ของจีโนมของมนุษย์ ซึ่งมีความยาวตั้งแต่ 500 คู่เบสขึ้นไป ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน[33] การวัดระดับ LINE-1 methylation ในปัจจุบันจัดเป็น surrogate marker สำหรับ global genomic methylation
2. การวัด In vitro radiolabeled methyl incorporation assay สำหรับ 5-methylcytosine
3. วิธี Immunohistochemistry (IHC) โดยย้อมด้วย monoclonal antibody เพื่อดูระดับ 5mc protein และสามารถทำได้จาก paraffin-embedded specimen

จากการศึกษาพบว่าการตรวจด้วยวิธี methyl incorporating assay และ IHC สามารถใช้ในการตรวจ hypomethylation ของ DNA ในเนื้องอกชนิด squamous cell carcinoma ทั้ง 2 วิธี[34] อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธี IHC นั้นมีข้อดีคือสามารถเปรียบเทียบสะดวกและง่ายกว่า รวมทั้งสามารถดูระดับการแสดงออกของโปรตีนในเนื้องอกสมองและเนื้อสมองในชิ้นเนื้อเดียวกันเปรียบเทียบกันได้เลย แต่มีข้อเสียคืออาจย้อมโปรตีนไม่ติดหรือระดับที่ติดไม่ได้บ่งบอกการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetics ที่แท้จริง แต่วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจ global DNA methylation ที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางคือการตรวจ LINE-1 methylation

ดังนั้น การศึกษานี้น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระดับอณูชีววิทยาของเนื้องอกสมอง GBM เพื่อทำให้เข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับเนื้องอกในระดับ epigenetics รวมถึงความสัมพันธ์เหล่านี้กับการอยู่รอดชีวิตและการตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเลือกการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยแต่ละราย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบ descriptive studyโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง MGMT promoter methylation และ global DNA methylation ของเนื้องอกสมอง glioblastoma multiforme

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร และตัวอย่าง

<u>ประชากรเป้าหมาย (Target Population)</u>

หมายถึงผู้ป่วยเนื้องอกสมอง glioblastoma multiforme

<u>ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population)</u>

หมายถึง ผู้ป่วยเนื้องอกสมอง glioblastoma multiforme ที่ได้รับการวินิจฉัยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

<u>เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)</u>

1. ผู้ป่วยที่อายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป ทั้งชายและหญิง
2. ได้รับการวินิจฉัยเนื้องอกสมอง glioblastoma multiforme (WHO grade IV) โดยผลการตรวจทางพยาธิวิทยายืนยัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)</u>

ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตามชิ้นเนื้อหรือชิ้นเนื้อไม่สามารถนำมาศึกษาเพิ่มเติมได้

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ (correlation) จึงใช้วิธีการคำนวณจำนวนประชากรโดยใช้สูตร

$$n = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2}{\frac{1}{4}\left\{\log_e\left(\frac{1+p}{1-p}\right)\right\}^2}$$

n = จำนวนประชากร

กำหนดให้ $\alpha/2=0.05$ $Z_\alpha = 1.64$

$\beta = 0.2$ $Z_\beta = 0.84$

แทนค่าในสูตรจากการศึกษาของ Ohka และคณะ(32) ที่ค่า spearman's correlation ของ global methylation และ MGMT promoter methylation

r =0.335

ซึ่งเมื่อแทนค่าในสูตร

$n = 68$

ดังนั้นการศึกษาทั้งหมด 68 คน

3.4 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

- การวินิจฉัยเนื้องอกสมอง GBM ถือตามเกณฑ์ของพยาธิวิทยาแบ่งตาม WHO 2007
- LINE-1 เมธิเลชันตรวจด้วยวิธี pyrosequencing จัดเป็นกลุ่ม high เมื่อมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 68 จากการศึกษาของ Ohka และคณะ[32]
- MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันตรวจด้วย 2 วิธี คือ

  1. MSP ให้ผลเป็นบวกและลบ

  2. pyrosequencing ให้ผลบวกเมื่อมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 22.7 จากการศึกษาของ Christians และคณะ[21]

3.5 การดำเนินการวิจัย

3.5.1 ขั้นเตรียมการ

1. ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับโรค glioblastoma multiforme ปัจจัยที่ได้รับการศึกษาในด้านการพยากรณ์โรค ปัจจัยในการเกิดโรคแพร่กระจายและแนวทางในการรักษาโรคตามมาตรฐานปัจจุบัน

2. เสนอโครงร่างงานวิจัย และขอความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

3.5.2 ขั้นดำเนินการตรวจชิ้นเนื้อ

นำชิ้นเนื้อของเนื้องอกสมอง glioblastoma นำมาแยก DNA โดยใช้ QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตามคำแนะนำของทางบริษัท และเมื่อได้ DNA ที่เพียงพอจึงนำมาวิเคราะห์ทาง epigenomic ต่อไป

การตรวจ MGMT promoter methylation นั้นจะตรวจด้วย 2 วิธี คือ methylation specific polymerase chain reaction (MSP) และวิธี pyrosequencing โดยจะรายงานค่าเป็นร้อยละของค่าเฉลี่ยของ methylation ที่ CpG 5 ตำแหน่งที่อยู่บน MGMT promoter[21]

การประเมิน global DNA methylation นั้นทำโดยวิธีตรวจด้วยวิธี pyrosequencing เพื่อหา LINE-1 methylation[32] รายละเอียดในภาคผนวก

3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เก็บรวบรวมรายชื่อผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมา ซึ่งมารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555
2. เก็บข้อมูลจากทั้งเวชระเบียนผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยใน โดยผู้ดำเนินการวิจัยบันทึกลงในแบบบันทึก (case record form) ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย, อาการและอาการแสดง, ลักษณะของโรค, ตำแหน่งตัวโรค, การรักษาที่ได้รับ
3. เก็บข้อมูลวันเสียชีวิตตรวจสอบจากทะเบียนราษฎร์
4. ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษาจะถูกบันทึกลงบนแบบบันทึก โดยปกปิดชื่อ-สกุล และจัดเก็บเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์โดยใช้ record number และมีรหัสการเข้าดูข้อมูลโดยผู้บันทึกเท่านั้น

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเป็นเชิงปริมาณ สรุปข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย (Mean) หรือค่ามัธยฐาน (Median) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ข้อมูลเป็นเชิงคุณภาพ สรุปข้อมูลในรูปของร้อยละ (Percentage) และ สัดส่วน (Proportion)

การเปรียบเทียบข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ใช้วิธี Student’s t-test หรือ Mann – Whitney U test

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

มาเปรียบเทียบข้อมูลในเชิงกลุ่ม (categorical data) ใช้วิธี Chi-square หรือ Fisher's exact test

การหาความสัมพันธ์ของข้อมูลเชิงปริมาณใช้สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) หรือสหสัมพันธ์ลำดับที่สเปียร์แมน (Spearman's rank correlation)

ศึกษาการอยู่รอด (survival analysis) โดยรายงานด้วย Kaplan-Meier curve และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย log-rank test

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรคโดยการใช้ univariate และ multivariate survival analysis ด้วย Cox-proportional hazard model

โดยใช้ระบบ SPSS version 17.0 ของ window ในการวิเคราะห์ข้อมูล และในการวิเคราะห์ทั้งหมด นัยสำคัญของความแตกต่างคิดที่ค่า $p<0.05$

3.8 การนำเสนอข้อมูล

ตาราง (Table) และแผนภูมิ (Graph)

3.9 ปัญหาทางจริยธรรม

หลักความเคารพในบุคคล (respect for person)

คือ ไม่มีการเปิดเผยชื่อหรือเลขที่โรงพยาบาลของผู้ป่วย รวมถึงรักษาความลับของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาไม่สามารถย้อนกลับไปสู่การระบุตัวผู้ป่วยได้

หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence)

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาชิ้นเนื้อเนื้องอกไม่มีความเสี่ยงแก่ผู้ป่วย

หลักความยุติธรรม (justice)

คือ มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ.2550 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ.2555 ทั้งหมด 70 ชิ้นจากผู้ป่วย 70 ราย เป็นเพศชาย 45 ราย (ร้อยละ 64.3) และเพศหญิง 25 ราย (ร้อยละ 35.7) โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 54 ปี ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยที่สุดและมากที่สุดในการศึกษาเท่ากับ 15 ปี และ 87 ปี ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 75) มีสภาพร่างกาย (Performance status) อยู่ในระดับ 0-1 ตามเกณฑ์ของ ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ส่วนอาการแสดงที่นำมาสู่การวินิจฉัยโรค 3 อันดับแรกได้แก่ ปวดศีรษะ (ร้อยละ 25.7), กล้ามเนื้ออ่อนแรง (ร้อยละ 21.4) และการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม (ร้อยละ 20.0) สำหรับตำแหน่งของเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาพบเป็นที่ส่วนของ frontal lobe 29 ราย (ร้อยละ 41.4) และ temporal lobe 25 ราย (ร้อยละ 35.7) ดังแสดงในตารางที่ 1

ร้อยละ 77 ของผู้ป่วยในการศึกษานี้ไม่เคยมีประวัติเนื้องอกสมองมาก่อน โดยมี 12 รายมีประวัติ low-grade glioma และ 4 รายมีประวัติ glioblastoma

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง GBM (n=70)

Age, median (min-max), years Characteristics	**54 (15-87)** Number of patients (%)
Gender	
Male	45 (64.3)
Female	25 (35.7)
ECOG	
0-1	53 (75.7)
2-4	17 (24.3)
Clinical presentation	
Headache	18 (25.7)
Weakness	15 (21.4)
Seizure	12 (17.1)

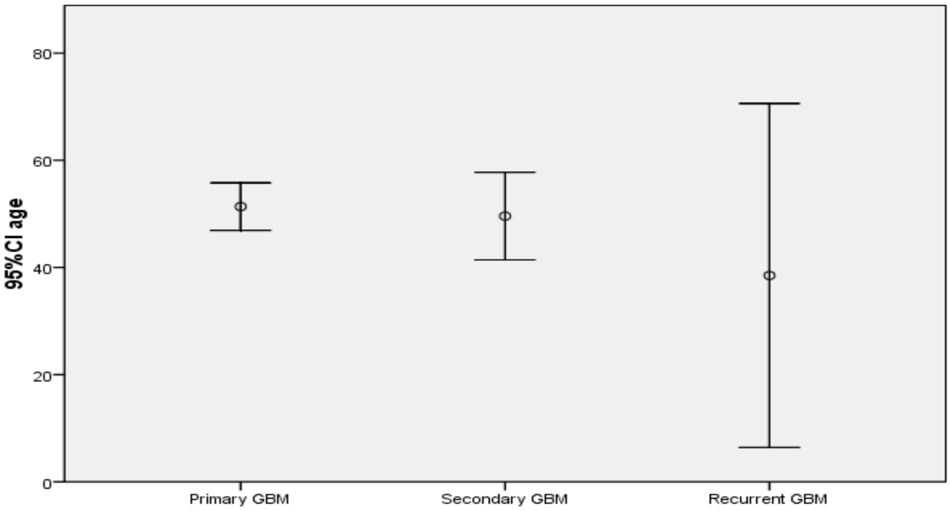
Age, median (min-max), years Characteristics	**54 (15-87)** Number of patients (%)
Behavioral change	14 (20.0)
Other	11 (15.7)
Location	
Frontal lobe	29 (41.4)
Parietal lobe	16 (22.9)
Temporal lobe	25 (35.7)
Occipital lobe	6 (8.6)
Basal ganglia	6 (8.6)
Cerebellum	3 (4.3)
Type of GBM	
Primary	54 (77.1)
Secondary	12 (17.1)
Recurrent	4 (5.7)

อายุของผู้ป่วยในกลุ่ม primary GBM มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 51.35±16.25 ปี กลุ่ม secondary GBM มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.58±12.84 ปีและในกลุ่ม recurrent GBM มีค่าเฉลี่ยอายุน้อยที่สุดเท่ากับ 38.50±20.17 ปีตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และกราฟที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงอายุของผู้ป่วยแยกตามชนิดเนื้องอกสมอง GBM

	Primary GBM (n=54)	**Secondary GBM (n=12)**	**Recurrent GBM (n=4)**	
Age Min-Max	51.35±16.25 15-87	49.58±12.84 29-67	38.50±20.17 16-57	p=0.30

กราฟที่ 1 แสดงอายุของผู้ป่วยแยกตามชนิดเนื้องอกสมอง GBM



จากตารางที่ 3 พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดโดยการนำเนื้องอกออกบางส่วนหรือออกทั้งหมด มีเพียงแค่ 7 รายที่ได้รับการผ่าตัดเฉพาะนำชิ้นเนื้อมาตรวจ ผู้ป่วยร้อยละ 74 ได้รับการฉายรังสีภายหลังจากการผ่าตัด โดยค่ากลางของปริมาณรังสีที่ได้รับคือ 60 Gy ภายใน 30 ครั้ง ผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัด temozolomide ร่วมกับการฉายรังสีทั้งสิ้น 18 ราย และมีผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด temozolomide หลังการฉายรังสี 19 รายและผู้ป่วย 1 รายได้รับยาเคมีบำบัด carmustine ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด temozolomide ทั้งร่วมกับการฉายรังสีและหลังการฉายรังสีมีเพียง 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 17

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในแต่ละวิธี

Modalities	Number of patients (%)
Extent of surgery	
Biopsy	7 (10)
Subtotal tumor resection	25 (35.7)
Gross tumor resection	38 (54.3)
Adjuvant radiation	52(74.3)
Dosage of radiation (median ± IQR, Gy)	60 ± 18
Adjuvant chemotherapy	20 (28.5)

IQR=interquartile range

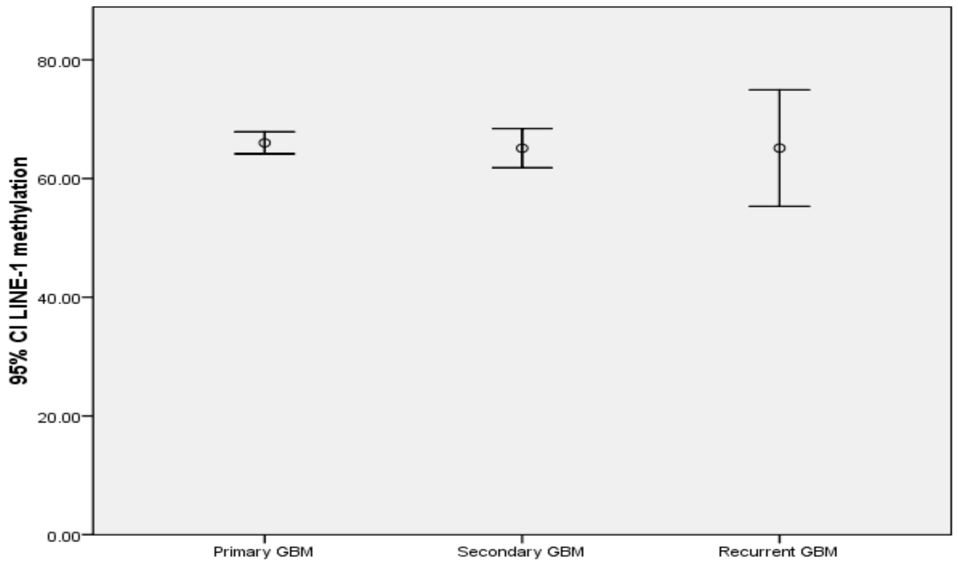
<u>ระดับ LINE-1 methylation</u>

ในการศึกษานี้พบว่าค่ากลางของ LINE-1 methylation เท่ากับร้อยละ 66.6 (IQR=9.6) โดยในกลุ่ม primary GBM มีค่าเฉลี่ยระดับ LINE-1 methylation เท่ากับร้อยละ 66.0±6.79 กลุ่ม secondary GBM มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 65.1±5.19 และในกลุ่ม recurrent GBM มีค่าเฉลี่ยระดับ LINE-1 methylation เท่ากับ 65.12±6.17 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และกราฟที่ 2

ตารางที่ 4 แสดงระดับ LINE-1 เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง

	Primary GBM (n=54)	Secondary GBM (n=12)	Recurrent GBM (n=4)	p-value
%LINE-1 methylation	66.0±6.79	65.1±5.19	65.12±6.17	0.89
Min-Max	45.75-78.75	57.75-75.70	60.00-73.50	
High LINE-1	25 (46.3%)	3 (25%)	3 (75%)	0.33
Low LINE-1	29 (53.7%)	9 (75%)	1 (25%)	

กราฟที่ 2 แสดงระดับ LINE-1 เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง



ในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้ศึกษาระดับของ LINE-1 methylation โดยใช้ค่า LINE-1 methylation ที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 68 (high LINE-1 group) และน้อยกว่าร้อยละ 68 (low LINE-1 group) ตามที่เคยได้มีการรายงานมาในการศึกษาก่อนหน้าของ Ohka และคณะ[32] โดยพบว่าในการศึกษานี้มีผู้ป่วยในกลุ่ม high LINE-1 ร้อยละ 41.4 โดยในกลุ่ม secondary GBM ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 75) อยู่ในกลุ่ม low LINE-1 และในทางตรงกันข้าม ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในกลุ่ม recurrent GBM (ร้อยละ 75) อยู่ในกลุ่ม high LINE-1

MGMT promoter methylation

การศึกษา MGMT promoter methylation ในการศึกษานี้ใช้ 2 วิธี

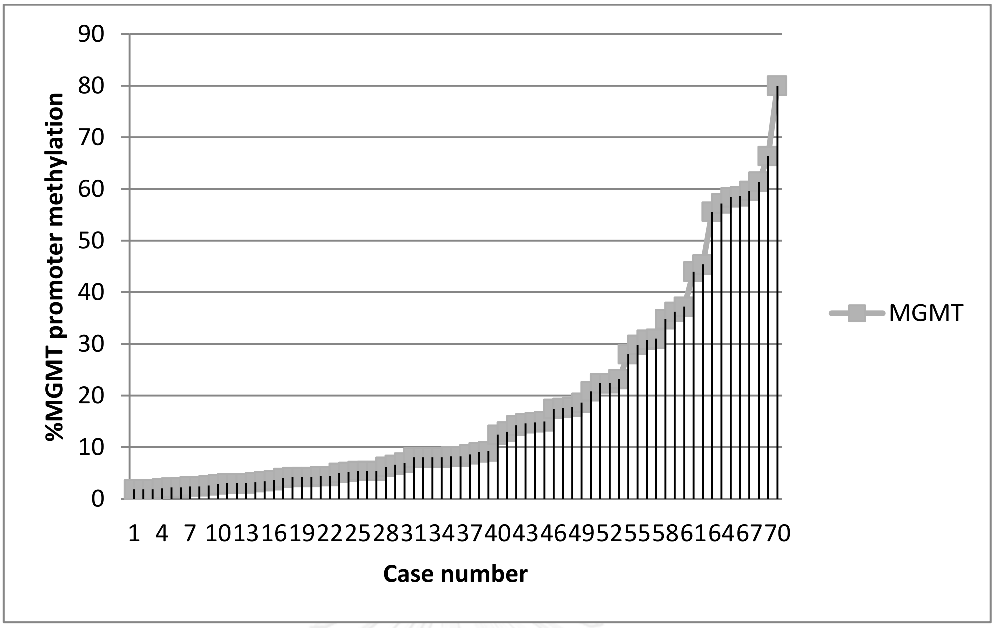
- วิธี methylation specific polymerase chain reaction (MSP) รายงานผลเป็น methylation หรือ unmethylation
- วิธี pyrosequencing นั้น รายงานผลเป็นร้อยละของการ methylation ดังแสดงในกราฟที่ 3 ซึ่งค่า cut-off value ในการประเมินว่า methylation MGMT promoter คือค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 22.7 (methylation group) และน้อยกว่าร้อยละ 22.7 (unmethylation group) จากการศึกษาของ Christians และคณะ [21]

ซึ่งในการศึกษานี้พบว่ามี methylation group ที่ไม่ตรงกันจากการตรวจทั้งสองวิธีทั้งหมด 9 ราย โดยพบว่าหากใช้การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี MSP มีผู้ป่วยในกลุ่ม methylated MGMT 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 30 และหากใช้วิธี pyrosequencing มีผู้ป่วยในกลุ่ม methylated MGMT 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 25.7 ซึ่งค่าเฉลี่ยของเมธิเลชันในกลุ่ม methylated MGMT เท่ากับ 46.53±16.1 เทียบกับกลุ่ม unmethylated MGMT เท่ากับ 7.86±5.9 ($p<0.001$) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนผู้ป่วยแบ่งตาม MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชัน

	Methylated MGMT	Unmethylated MGMT	p-value
Pyrosequencing			
N (%)	18/70 (25.7)	52/70 (74.3)	
%MGMT promoter methylation	46.53±16.1	7.86±5.9	<0.001
Min-Max	1.8-22.4	23.2-80.0	
MSP (%)	21/70 (30)	49/70 (70)	

กราฟที่ 3 แสดงร้อยละของ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันจากการตรวจด้วยวิธี PSQ

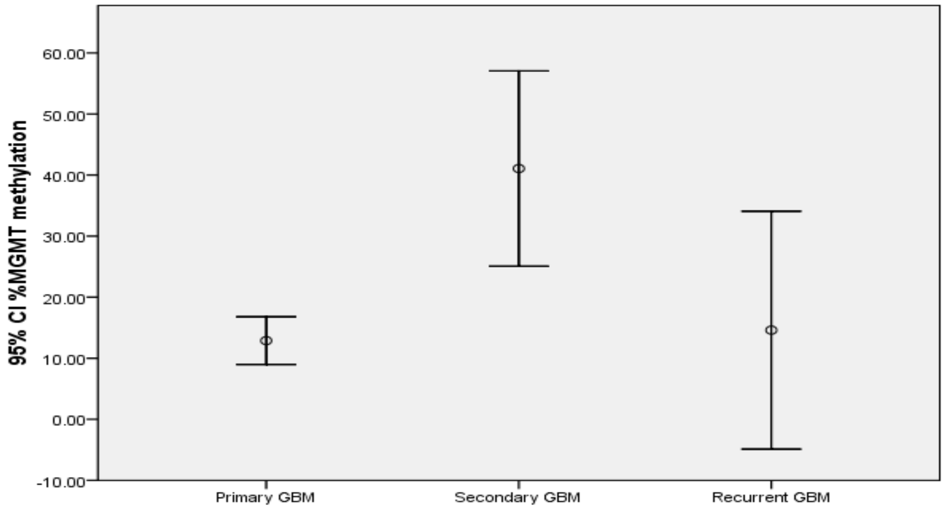


ในกลุ่ม primary GBM ผู้ป่วยเพียงร้อยละ 20.4 อยู่ในกลุ่ม methylated MGMT ต่างกับผู้ป่วยส่วนใหญ่ในกลุ่ม secondary GBM (ร้อยละ 66.7) โดยความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่ม secondary GBM มีค่าเฉลี่ยระดับ MGMT promoter methylation สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 41.01±25.17 ในกลุ่ม recurrent GBM และ primary GBM มีค่าเฉลี่ยระดับ MGMT promoter methylation เท่ากับ 14.60±12.24 และ 12.88±14.35 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p<0.001 ดังแสดงในตารางที่ 6 และกราฟที่ 4

ตารางที่ 6 แสดงระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันแบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง

	Primary GBM (n=54)	Secondary GBM (n=12)	Recurrent GBM (n=4)	p-value
Pyrosequencing				
%MGMT promoter methylation	12.88±14.35	41.01±25.17	14.60±12.24	<0.001
Min-Max				
MSP	1.8-61.4	1.8-80.0	2.0-29.8	
Methylated MGMT				
Unmethylated MGMT	11 (20.4%)	8 (66.7%)	2 (50%)	0.03
	43 (79.6%)	4 (33.3%)	2 (50%)	

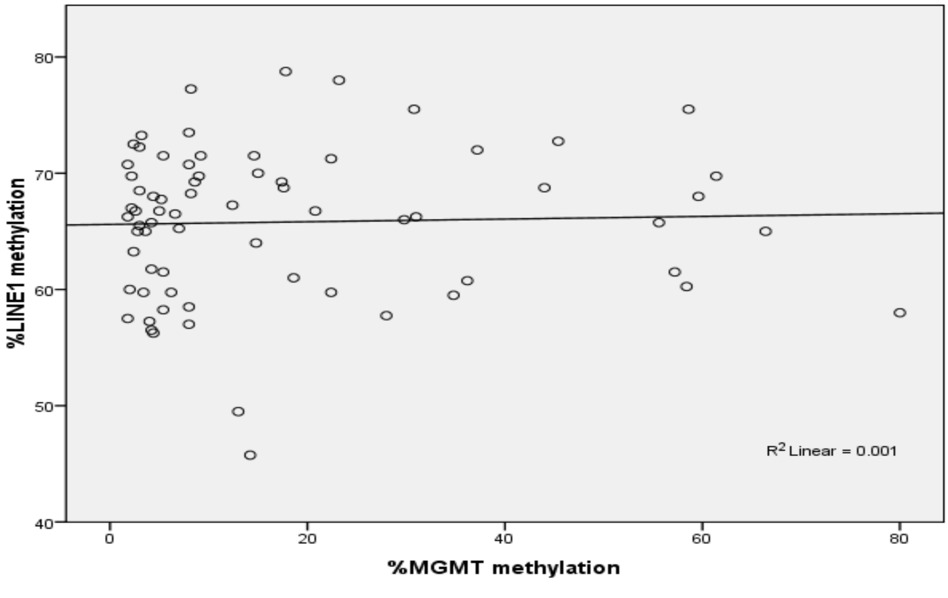
กราฟที่ 4 แสดงระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันจากการตรวจด้วยวิธี PSQ แบ่งตามชนิดของเนื้องอกสมอง



<u>ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation</u>

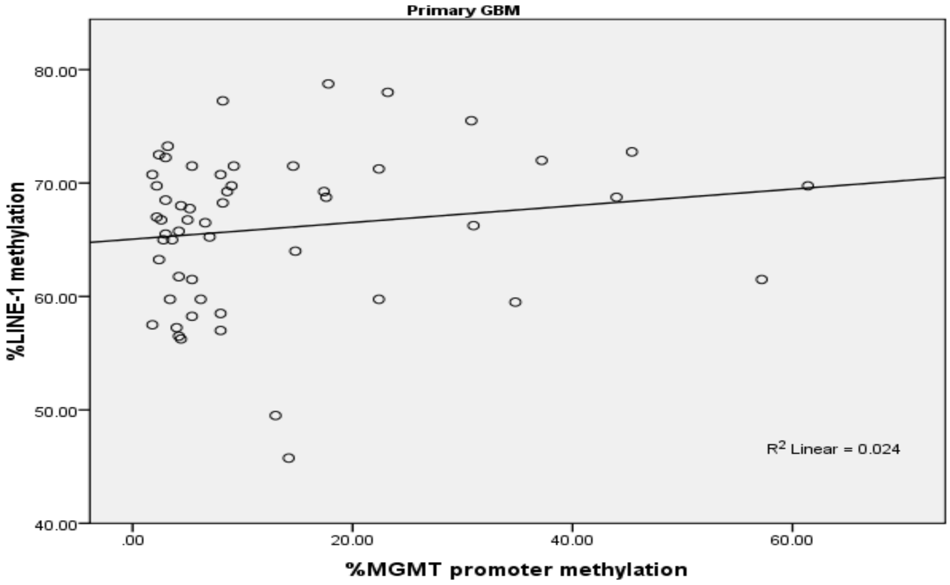
เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT methylation พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าทั้งสองโดยค่า r=0.094 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.44 (กราฟที่ 5)

กราฟที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation

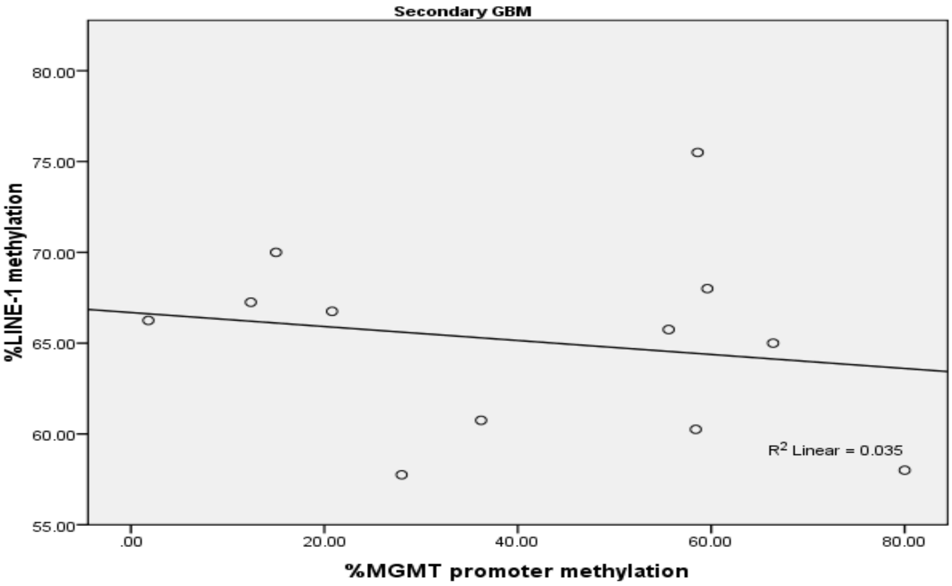


เมื่อแยกวิเคราะห์ตามชนิดของเนื้องอกสมองพบว่า ในเนื้องอกสมอง primary GBM ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT methylation มีทิศทางไปในทางบวก r=0.189 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.17 (กราฟที่ 6) ในทางตรงกันข้าม ในเนื้องอกสมอง secondary GBM ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT methylation มีทิศทางไปในทางลบ r=-0.245, p=0.44 (กราฟที่ 7)

กราฟที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation ในเนื้องอกสมอง primary GBM และ secondary GBM ตามลำดับ



กราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation ในเนื้องอกสมอง primary GBM และ secondary GBM ตามลำดับ



เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามค่า LINE-1 methylation ข้างต้น พบว่า ผู้ป่วย 41 ราย จัดอยู่ในกลุ่ม low LINE-1 และ 29 รายจัดอยู่ในกลุ่ม high LINE-1 จากตารางที่ 3 พบว่า กลุ่ม high LINE-1 มีสัดส่วนของผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 40 และ ECOG performance status 2-4 มากกว่ากลุ่ม low LINE-1 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.06 และ p=0.27 ตามลำดับ

เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตาม MGMT promoter methylation ด้วยวิธี MSP พบว่า ผู้ป่วย 49 ราย จัดอยู่ในกลุ่ม unmethylation และ 21 รายจัดอยู่ในกลุ่ม methylation จากตารางที่ 7 พบว่า กลุ่ม methylation มีสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นเนื้องอกสมองและ ECOG performance status 2-4 มากกว่ากลุ่ม unmethylation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.004 และ p=0.018 ตามลำดับ มีสัดส่วนของผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 40 มากกว่ากลุ่ม unmethylation แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ p=0.15

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิกพยาธิวิทยา (clinicopathologic factors) กับระดับของ LINE-1 methylation และ MGMT promoter methylation

Clinical variables	LINE-1 methylation			MGMT promoter methylation status		
	Low (<68%) n=41	High (≥68%) n=29	p-value	Unmethylation n=49	Methy-lation n=21	p-value
Gender						
Male	58.5%	72.4%	0.23	69.4%	52.4%	0.17
Female	41.5%	27.6%		30.6%	47.6%	
History of brain tumor						
None	70.7%	86.2%	0.13	87.8%	52.4%	0.004*
Low-grade glioma/GBM	29.3%	13.8%		12.2%	47.6%	
Clinical presentation						
Headache	24.8%	27.6%	0.76	32.7%	9.5%	0.042*
Weakness	19.5%	24.1%	0.64	22.4%	19.0%	1.0
Seizure	19.5%	13.8%	0.75	10.2%	33.3%	0.034*
Behavioral change	17.1%	24.1%	0.47	26.5%	4.8%	0.05
Other	14.6%	17.2%	1.00	12.2%	23.8%	0.29
Age						
Mean	48.1	53.5	0.14	48.5	54.5	0.15
≤40 years	34.1%	13.8%	0.06	30.6%	14.3%	0.15
>40 years	65.9%	86.2%		69.4%	85.7%	
ECOG						
0-1	80.5%	69%	0.27	83.7%	57.1%	0.018*
2-4	19.5%	31%		16.3%	42.9%	
Adjuvant chemotherapy						
Yes	24.4%	31%	0.54	77.6%	61.9%	0.18
No	75.6%	69%		22.4%	38.1%	
Adjuvant radiation						
Yes	70.7%	79.3%	0.42	73.5%	76.2%	0.81
No	29.3%	20.7%		26.5	23.8%	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

*significant, p<0.05

<u>การอยู่รอดชีวิต (Survival)</u>

ในผู้ป่วยทั้งหมดมีค่ากลางของโรคกำเริบหรือการอยู่รอดชีวิต (progression-free survival) เท่ากับ 7.3 เดือน (95%CI 5.45-9.14) และค่ากลางของการอยู่รอดชีวิต (overall survival) เท่ากับ

9.57 เดือน (95%CI 6.83-12.30) โดยอัตราการอยู่รอดชีวิตที่ 1 ปีและ 2 ปี เท่ากับร้อยละ 42.9 และ 15.4 ตามลำดับ

ในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์ปัจจัยทางคลินิกและปัจจัยทาง epigenetics ที่ส่งผลต่อการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยโดยใช้สถิติ log-rank test พบว่า ECOG performance status 0-1 การได้รับการฉายรังสีและยาเคมีบำบัดหลังการผ่าตัดมีความสัมพันธ์กับการอยู่รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.022, p<0.001 และ p=0.04 ตามลำดับ)

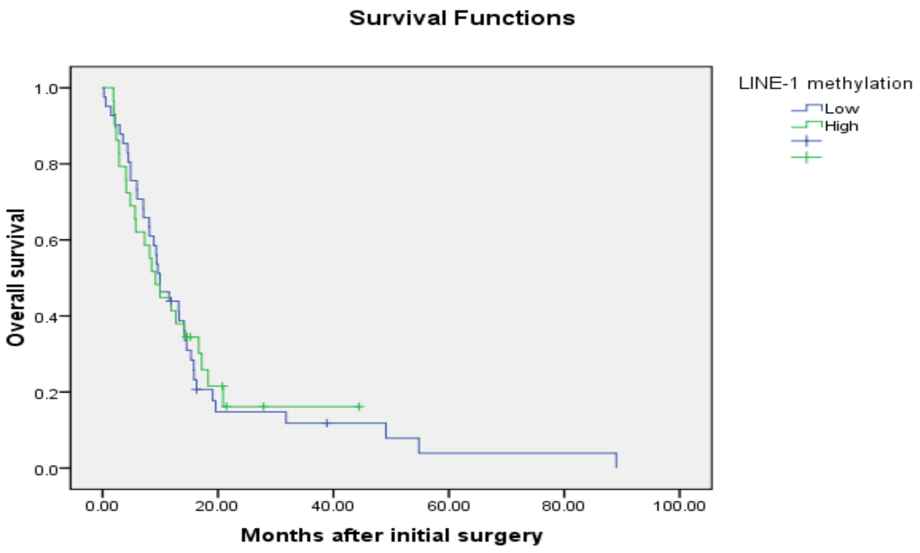
การแบ่งผู้ป่วยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาเป็นกลุ่ม high LINE-1 และ low LINE-1 พบว่าในกลุ่ม Low LINE-1 มีค่ากลางการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม high LINE-1 กล่าวคือ 9.97 เดือนเทียบกับ 9.20 เดือนตามลำดับ HR 0.97 p-value=0.90 ดังแสดงในตารางที่ 8 และกราฟที่ 8 โดยใน 6 เดือนและ 1 ปีแรกนั้น อัตราการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยในกลุ่ม Low LINE-1 สูงกว่าในกลุ่ม High LINE-1

ตารางที่ 8 แสดงการอยู่รอดชีวิตแบ่งตามระดับ LINE-1 เมธิเลชัน

Variable	LINE-1 methylation	
	Low (<68%) n=41	High (≥68%) n=29
Median overall survival (mo)	9.97 (7.17-12.76)	9.20 (6.04-12.37)
Overall survival (%)		
At 6 months	73.2	62.1
At 12 months	43.9	41.4
At 18 months	20.7	25.9
At 24 months	14.8	16.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กราฟที่ 8 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ LINE-1 เมธิเลชัน



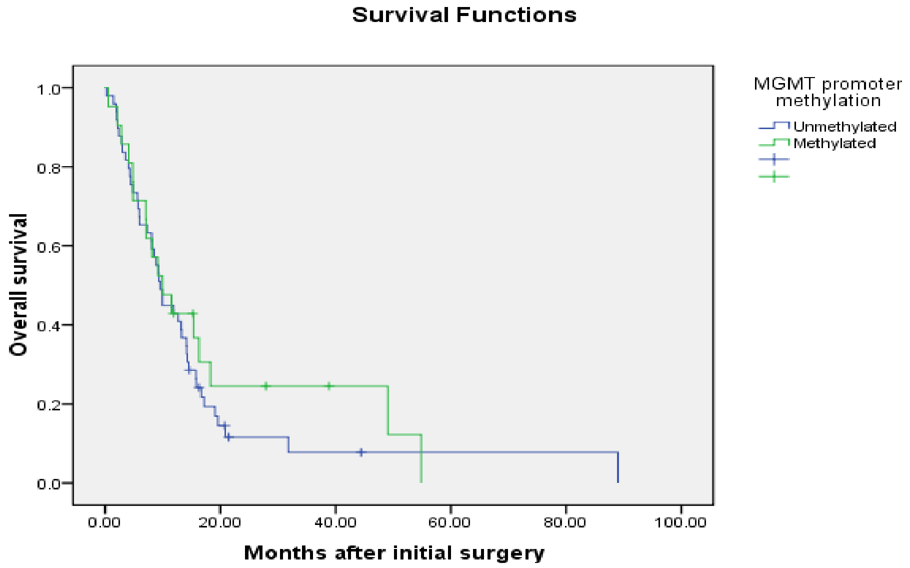
การแบ่งผู้ป่วยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาเป็นกลุ่ม unmethylated และ methylated MGMT โดยวิธี MSP พบว่า ในกลุ่ม methylated MGMT มีค่ากลางการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม unmethylated MGMT กล่าวคือ 9.97 เดือนเทียบกับ 9.57 เดือนตามลำดับ HR 0.816 p-value=0.48 ดังแสดงในตารางที่ 9 และกราฟที่ 9 โดยอัตราการรอดชีวิตในกลุ่ม methylated MGMT สูงกว่าในทุกช่วงเวลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 แสดงการอยู่รอดชีวิตแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี MSP

Variable	MGMT promoter methylation	
	Unmethylated n=49	Methylated n=21
Median overall survival (mo)	9.57 (8.06-11.08)	9.97 (4.93-15.00)
Overall survival (%)		
At 6 months	67.3	71.4
At 12 months	42.9	42.9
At 18 months	19.3	30.6
At 24 months	11.6	24.5

กราฟที่ 9 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี MSP

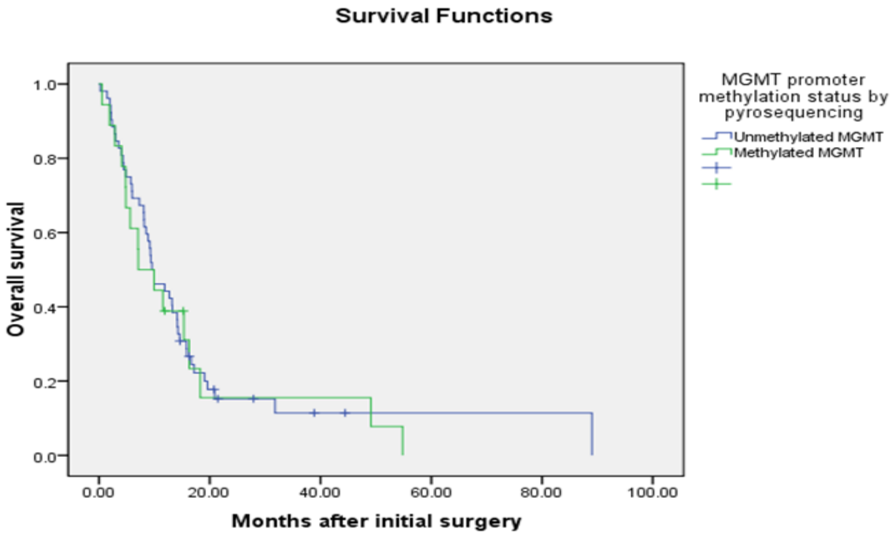


ในทางตรงกันข้าม เมื่อแบ่งผู้ป่วยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาเป็นกลุ่ม unmethylated และ methylated MGMT โดยวิธี pyrosequencing โดยใช้ cut-off value ที่ร้อยละ 22.7 พบว่าในกลุ่ม methylated MGMT มีค่ากลางการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่ม unmethylated MGMT กล่าวคือ 7.10 เดือนเทียบกับ 9.57 เดือนตามลำดับ HR 1.10 p-value=0.74 ดังแสดงในตารางที่ 10 และกราฟที่ 10 โดยอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าใน 6 เดือน และ 1 ปีแรก

ตารางที่ 10 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี PSQ

Variable	MGMT promoter methylation	
	Unmethylated n=49	Methylated n=21
Median overall survival (mo)	9.57 (6.43-12.71)	7.10 (1.07-13.13)
Overall survival (%)		
At 6 months	71.2	61.1
At 12 months	44.2	38.9
At 18 months	22.2	23.3
At 24 months	15.2	15.6

กราฟที่ 10 แสดงการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยกลิโอบลาสโตมาแบ่งตามระดับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันด้วยวิธี PSQ



เมื่อแบ่งผู้ป่วยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาเป็น 4 กลุ่มตามระดับ LINE-1 และ methylation ของ MGMT ด้วยวิธี MSP พบว่า ในกลุ่ม methylated MGMT และ low LINE-1 มีค่ากลางการรอดชีวิตสูงที่สุด และ กลุ่ม unmethylated MGMT และ high LINE-1 มีค่ากลางการรอดชีวิตต่ำที่สุด กล่าวคือ 11.53 เดือนเทียบกับ 8.50 เดือนตามลำดับ HR 0.34 p-value=0.56 ดังแสดงในตารางที่ 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 11 แสดงการอยู่รอดชีวิตตามระดับ LINE-1 และ methylation ของ MGMT

Variable	Unmethylated MGMT & low LINE-1 n=29	Methylated MGMT & low LINE-1 n=12	Unmethylated MGMT & high LINE-1 n=20	Methylated MGMT & high LINE-1 n=9
Median overall survival (mo)	9.57 (8.69-10.45)	11.53 (0.00-24.24)	8.50 (0.00-18.51)	9.20 (6.83-12.22)
Overall survival (%)				
At 6 months	72.4	75.0	60.0	66.7
At 12 months	41.4	50.0	45.0	33.3
At 18 months	17.2	30.0	23.3	33.3
At 24 months	8.6	30.0	15.6	16.7

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดชีวิตของผู้ป่วยเนื้องอกสมองกลิโอบลาสโตมาโดย multivariable analysis พบว่า low LINE-1 methylation unmethylated MGMT อายุผู้ป่วยน้อยกว่า 40 ปี ECOG performance status 0-1 มีความสัมพันธ์กับการอยู่รอดชีวิตแต่ไม่มีนัยสำคัญสถิติ ในขณะที่การได้รับการฉายรังสีและยาเคมีบำบัดหลังการผ่าตัดมีความสัมพันธ์กับการอยู่รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p=0.007$ และ $p<0.001$ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยเนื้องอกสมอง GBM

Variables	Hazard ratio	95% CI	p-value
LINE1 methylation (low<68%)	0.83	0.48-1.44	0.50
MGMT status (methylated)	1.03	0.52-2.01	0.94
Age (≤ 40 years)	0.84	0.45-1.58	0.59
ECOG performance status (0-1)	0.51	0.26-1.01	0.05
Adjuvant chemotherapy	0.34	0.15-0.74	0.007*
Adjuvant radiation	0.25	0.13-0.47	<0.001*

*significant, p<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษา

ผู้ป่วยในการศึกษานี้ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ไม่เคยมีประวัติเนื้องอกสมองมาก่อน 54 ราย มีประวัติ low-grade glioma 12 รายและ มีประวัติ glioblastoma 4 ราย เป็นเพศชาย 45 ราย (ร้อยละ 64.3) และเพศหญิง 25 ราย (ร้อยละ 35.7) โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 54 ปี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Puddhikarant และคณะ[35] ซึ่งศึกษาเนื้องอก GBM ในผู้ป่วยไทย พบว่าอายุเฉลี่ยเท่ากับ 51.9 ปี ซึ่งต่ำกว่าที่เคยรายงานไว้จากการศึกษาต่างประเทศ อายุของผู้ป่วยในกลุ่ม primary GBM มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 51.35$\pm$16.25 ปี กลุ่ม secondary GBM มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.58$\pm$12.84 ปีและในกลุ่ม recurrent GBM มีค่าเฉลี่ยอายุน้อยที่สุดเท่ากับ 38.50$\pm$20.17 ปี ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ohgaki และคณะ[8] ที่พบว่า secondary GBM จะมีอายุเฉลี่ยต่ำกว่า primary GBM คือ 45 ปี เทียบกับ 62 ปี

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (ร้อยละ 75) มีสภาพร่างกาย (performance status, PS) อยู่ในระดับ 0-1 ตามเกณฑ์ของ ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) เพราะส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด เนื่องจากเกณฑ์ในการศึกษาคือผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อสมอง

5.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชัน และ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันในเนื้องอกสมอง GBM

จากการศึกษานี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชันและ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันในเนื้องอกสมอง GBM โดยค่า r=0.094 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.44 แตกต่างกับการศึกษาในอดีตของ Ohka และคณะ[32] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชันและ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชัน พบว่าในเนื้องอกสมองทั้ง low-grade glioma และ GBM มีความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชันและ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันในทิศทางเดียวกัน (r=0.335, p<0.001)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แต่เมื่อแยกพิจารณาเฉพาะ primary GBM นั้นพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชันและ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันเป็นไปในทิศทางบวก แต่มีความสัมพันธ์น้อย r=0.189 สอดคล้องกับการศึกษาของ Ohka และคณะ

5.1.3 ระดับ LINE-1 เมธิเลชัน และ MGMT โปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิเลชันในผู้ป่วยโรค GBM

จากข้อมูลในการศึกษานี้พบว่าค่ากลางของ LINE-1เมธิเลชันนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Ohka และคณะ[32] คือร้อยละ66.6 เทียบกับร้อยละ 67.6 ตามลำดับ หากพิจารณาตามชนิดของเนื้องอกสมอง GBM พบความแตกต่างคือในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างระดับของ LINE-1เมธิเลชัน ระหว่าง primary secondary หรือ recurrent GBM แต่ในการศึกษาของ Ohka และคณะนั้นพบว่าระดับของ LINE-1 เมธิเลชันใน primary GBM นั้นสูงกว่า secondary GBM แต่มีข้อจำกัดคือในการศึกษาของ Ohka และคณะนั้น มีเนื้องอกสมอง secondary GBM เพียง 3 ราย ซึ่งอาจทำให้การแปลผลมีความคลาดเคลื่อนได้

จากการศึกษาในอดีตพบว่าเนื้องอกสมอง GBM เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี MSP นั้น จะมีการเมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของ MGMT ยีนร้อยละ 22-47.5[6, 20, 36] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ โดยพบว่ามีการเมธิเลชันของMGMT โปรโมเตอร์ยีนที่ร้อยละ 30 และเมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของเนื้องอกสมองพบว่าในเนื้องอกสมอง secondary GBM มีการเมธิเลชันของโปรโมเตอร์ของ MGMT ยีนมากกว่าเนื้องอกสมอง primary GBM ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในอดีต[37, 38]

เมื่อตรวจด้วยวิธี pyrosequencing พบว่าเมื่อใช้ cut-point ที่ร้อยละ 22.7 มีผู้ป่วยจัดอยู่ในกลุ่ม methylated MGMT ร้อยละ 25.7 โดยค่าเฉลี่ยของระดับเมธิเลชันในกลุ่ม methylated MGMT และ unmethylated MGMT เท่ากับ 46.58 และ 7.86 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ[39]

เมื่อแยกตามชนิดของเนื้องอกสมองพบว่าระดับเมธิเลชันของ MGMT โปรโมเตอร์ยีนในเนื้องอกสมอง secondary GBM นั้นสูงกว่าเนื้องอกสมอง primary GBM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับเมธิเลชันของMGMT โปรโมเตอร์ยีนในการศึกษานี้ทั้งใน primary และ secondary GBM ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Ohka และคณะ

5.1.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 เมธิเลชัน และ MGMT โปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิเลชันต่อการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรค GBM

LINE-1 เมธิเลชัน

เมื่อใช้ค่cut-off ที่ ร้อยละ 68 กลุ่ม LINE-1 เมธิเลชันต่ำมีค่ากลางการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม LINE-1 เมธิเลชันสูงเล็กน้อย คือ 9.97 เดือนเทียบกับ 9.20 เดือน HR 0.97 p-value=0.90 ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ จากการศึกษาของ Ohka และคณะ[32] พบว่าในเนื้องอกสมองชนิด primary GBM นั้น ค่า LINE-1 เมธิเลชันที่สูงนั้นเป็นปัจจัยบ่งบอกการพยากรณ์โรคที่ดี และในการศึกษา meta-analysis ของ Li และคณะ[40] ซึ่งศึกษาภาวะโกลบอลดีเอนเอไฮโปเมธิเลชันในเนื้องอกชนิดต่างๆ ซึ่งรวมเนื้องอกสมอง GBM ด้วยนั้น ผลเป็นในลักษณะเดียวกัน คือ โกลบอลดีเอนเอไฮโปเมธิเลชันสัมพันธ์กับการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า

เนื่องจากในการศึกษานี้จำนวนผู้ป่วยน้อยและผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่ม LINE-1 เมธิเลชันสูงส่วนใหญ่มีปัจจัยการพยากรณ์โรคอื่นๆ ที่แย่กว่า อาจทำให้ผลของ LINE-1 เมธิเลชันต่อการพยากรณ์โรคนั้นไม่ชัดเจน

MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชัน

ในการศึกษานี้ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันไม่มีผลต่อการพยากรณ์โรคเนื้องอกสมอง GBM แต่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Hegi และคณะ[6] พบว่าในผู้ป่วยเนื้องอกสมอง GBM ที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีและยา temozolomide นั้น MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันเป็นปัจจัยที่บ่งบอกถึงการตอบสนองดีต่อการรักษา (Predictive factor) และเป็นปัจจัยที่บ่งบอกถึงการพยากรณ์โรค (Prognostic factor) ที่ดีด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในการศึกษาของ Ohka และคณะ[32] พบว่า MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคที่ดี แต่เมื่อวิเคราะห์ multivariate analysis ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยวิธี MSP พบว่า ในกลุ่ม methylated MGMT มีค่ากลางการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่ม unmethylated MGMT กล่าวคือ 9.97 เดือนเทียบกับ 9.57 เดือนตามลำดับ HR 0.816 p-value=0.48 แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี pyrosequencing โดยใช้ cut-off value ที่ร้อยละ 22.7 พบว่าในกลุ่ม methylated MGMT มีค่ากลางการรอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่ม unmethylated MGMT กล่าวคือ 7.10 เดือนเทียบกับ 9.57 เดือนตามลำดับ HR 1.10 p-value=0.74 ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาของ Christian และคณะ[21] ที่พบว่าวิธีทั้งสองนั้นเป็นวิธีที่ใช้บ่งบอกการพยากรณ์โรคได้อย่างมีนัยสำคัญ

และเช่นเดียวกัน เนื่องจากในการศึกษานี้จำนวนผู้ป่วยน้อยและผู้ป่วยที่อยู่ใน MGMT โปรโตเตอร์เมธิเลชันส่วนใหญ่มีปัจจัยการพยากรณ์โรคอื่นๆ ที่แย่กว่า จึงส่งผลให้ MGMT โปรโตเตอร์เมธิเลชันไม่มีผลต่อการพยากรณ์โรค

5.2 สรุปผลการวิจัย

1. LINE-1 เมธิเลชันไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างกับ MGMT โปรโมเตอร์เมธิเลชันในเนื้องอกสมอง GBM ในเนื้องอกสมอง primary GBM ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT methylation มีทิศทางไปในทางบวก r=0.189 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ p=0.17 ในทางตรงกันข้าม ในเนื้องอกสมอง secondary GBM ความสัมพันธ์ระหว่าง LINE-1 methylation และ MGMT methylation มีทิศทางไปในทางลบ r=-0.245, p=0.44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. N Engl J Med. 2008;359(5):492-507.

2. Kreth FW, Thon N, Simon M, Westphal M, Schackert G, Nikkhah G, et al. Gross total but not incomplete resection of glioblastoma prolongs survival in the era of radiochemotherapy. Ann Oncol. 2013;24(12):3117-23.

3. Andersen AP. Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol. 1978;17(6):475-84.

4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 2009;10(5):459-66.

5. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. Curr Top Microbiol Immunol. 2000;249:101-18.

6. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):997-1003.

7. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007;114(2):97-109.

8. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. Clin Cancer Res. 2013;19(4):764-72.

9. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol. 2006;7(5):392-401.

10. Liang BC, Thornton AF, Jr., Sandler HM, Greenberg HS. Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. J Neurosurg. 1991;75(4):559-63.

11. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. J Neurosurg. 1978;49(3):333-43.

12. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. Lancet. 2002;359(9311):1011-8.

13. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-96.

14. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med. 2009;360(8):765-73.

15. Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, Shaw EG, Giannini C, Brachman DG, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH. J Clin Oncol. 2014;32(8):783-90.

16. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell. 2013;155(2):462-77.

17. Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. Neuropathol Appl Neurobiol. 2012;38(3):271-91.

18. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell. 2010;17(5):510-22.

19. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 2004;4(4):296-307.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

20. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med. 2000;343(19):1350-4.

21. Christians A, Hartmann C, Benner A, Meyer J, von Deimling A, Weller M, et al. Prognostic Value of Three Different Methods of MGMT Promoter Methylation Analysis in a Prospective Trial on Newly Diagnosed Glioblastoma. PLoS One. 2012;7(3):e33449.

22. Cankovic M, Mikkelsen T, Rosenblum ML, Zarbo RJ. A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Lab Invest. 2007;87(4):392-7.

23. Preusser M, Charles Janzer R, Felsberg J, Reifenberger G, Hamou MF, Diserens AC, et al. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. Brain Pathol. 2008;18(4):520-32.

24. Jung TY, Jung S, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Kim YH, et al. Changes of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation and MGMT protein expression after adjuvant treatment in glioblastoma. Oncol Rep. 2010;23(5):1269-76.

25. Akwattanakul W, Larbcharoensub N, Rattanasiri S, Sirachainan E, Panvichian R, Ativitavas T, et al. AOS23 O6-methylguanine-DNA-methyltransferase expression in Thai patients with malignant gliomas: Outcome and response to treatment in Ramathibodi Hospital. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2012;48:S11.

26. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2012;13(7):707-15.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

27. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2012;13(9):916-26.

28. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-updagger. Ann Oncol. 2014;25 Suppl 3:iii93-iii101.

29. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148-59.

30. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128(4):683-92.

31. Ahn JB, Chung WB, Maeda O, Shin SJ, Kim HS, Chung HC, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. Cancer. 2011;117(9):1847-54.

32. Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, et al. The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. PLoS One. 2011;6(8):e23332.

33. Kawakami K, Matsunoki A, Kaneko M, Saito K, Watanabe G, Minamoto T. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is a potential biomarker for the prediction of response to oral fluoropyrimidines in microsatellite stable and CpG island methylator phenotype-negative colorectal cancer. Cancer Sci. 2011;102(1):166-74.

34. Piyathilake CJ, Johanning GL, Frost AR, Whiteside MA, Manne U, Grizzle WE, et al. Immunohistochemical evaluation of global DNA methylation: comparison with in vitro radiolabeled methyl incorporation assay. Biotech Histochem. 2000;75(6):251-8.

35. Puddhikarant P, Swangsilpa T, Dhanachai M, Narkwong L, Sitathanee C, Puataweepong P, et al. Clinical outcome of postoperative radiotherapy with or without chemotherapy in adult glioblastoma multiforme in Ramathibodi Hospital: a retrospective study. J Med Assoc Thai. 2014;97(6):655-61.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

36. Costa BM, Caeiro C, Guimaraes I, Martinho O, Jaraquemada T, Augusto I, et al. Prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation: a Portuguese multicentre study. Oncol Rep. 2010;23(6):1655-62.

37. Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, De Simone T, Valletta L, Pollo B, et al. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. Clin Cancer Res. 2007;13(9):2606-13.

38. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. Carcinogenesis. 2001;22(10):1715-9.

39. Young ZK, Young JS, Ki UK, Dae CK. MGMT gene promoter methylation analysis by pyrosequencing of brain tumour. The Korean Journal of Pathology. 2011;45:455-62.

40. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, et al. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. PLoS One. 2014;9(9):e106290

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Case record form)

Demographic and clinical data

1. Code No ....
2. Age .... years
3. Sex ☐ 1. Male ☐ 2. Female
4. Underlying disease

   ☐ 1. DM ☐ 2. HT ☐ 3. CKD ☐ 4. Other ....
5. Date of diagnosis ....
6. ECOG performance status

   ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4
7. Presenting symptoms

   ☐ 1. Headache ☐ 2. Weakness ☐ 3. Seizure

   ☐ 4. Behavioural change ☐ 5. Other ....
8. Location of tumor

   ☐ 1. Frontal ☐ 2. Parietal ☐ 3. Temporal

   ☐ 4. Occipital ☐ 5. Basal ganglia ☐ 6. Cerebellum

   ☐ 7. Brainstem ☐ 8. Other ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Treatment

9. Extent of surgery

   ☐ 1. Biopsy ☐ 2. Complete resection ☐ 3. Partial resection
10. Adjuvant radiation

   ☐ 1. No ☐ 2.Yes Dosage of radiation .... Gy

   Number of fractions ....

   Duration of radiation .... weeks

11. Concurrent Chemotherapy

☐ 1. No ☐ 2. Temozolomide

11.1 Duration of therapy (TMZ)........... days

12. Adjuvant chemotherapy

☐ 1. No ☐ 2.BCNU ☐ 3. Temozolomide

12.1 Number of cycles ....

13. Salvage therapy

☐ 1. Surgery ☐ 2. Radiation ☐ 3. Chemotherapy

Molecular study

14. LINE-1 methylation ....

15. MGMT hypermethylation ....

Disease status

16. Date of progression ....

17. Date of death ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

เอกสารที่ 1 แสดงการแยกดีเอนเอและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

DNA extraction and bisulfite treatment

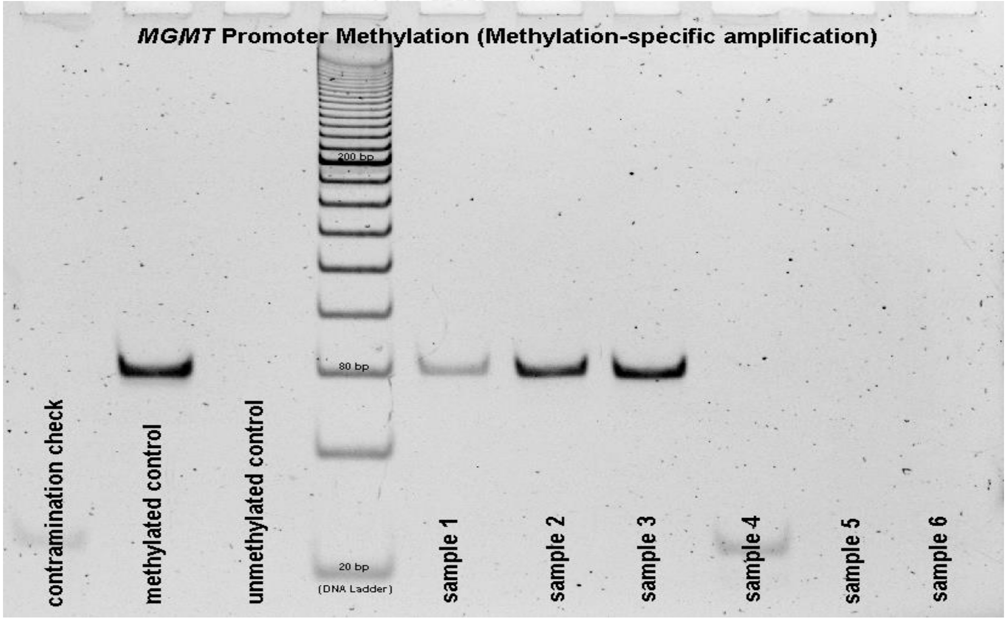
To ensure high tumour DNA content, FFPE tissue sections were stained with H&E and histologically examined by an experienced neuropathologist (S. Shuangshoti). Sections showing a tumour cell content of more than 80% were directly subjected to DNA extraction, while on sections with adjacent non-neoplastic tissue, the tumour portion was microdissected and further processed. Extraction of genomic DNA was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified with a NanoDrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen, Germany). Four hundred nanograms of DNA samples were subjected to bisulfite treatment using the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research). We used Epitect control DNA Methylated (QIAGEN) and Epitect control DNA Unmethylated (QIAGEN) as controls. The bisulfite-treated DNA was used for MSP and PSQ. The efficiency of the bisulfite conversion was checked by analysing the control DNA by pyrosequencing.

***MGMT* Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)**

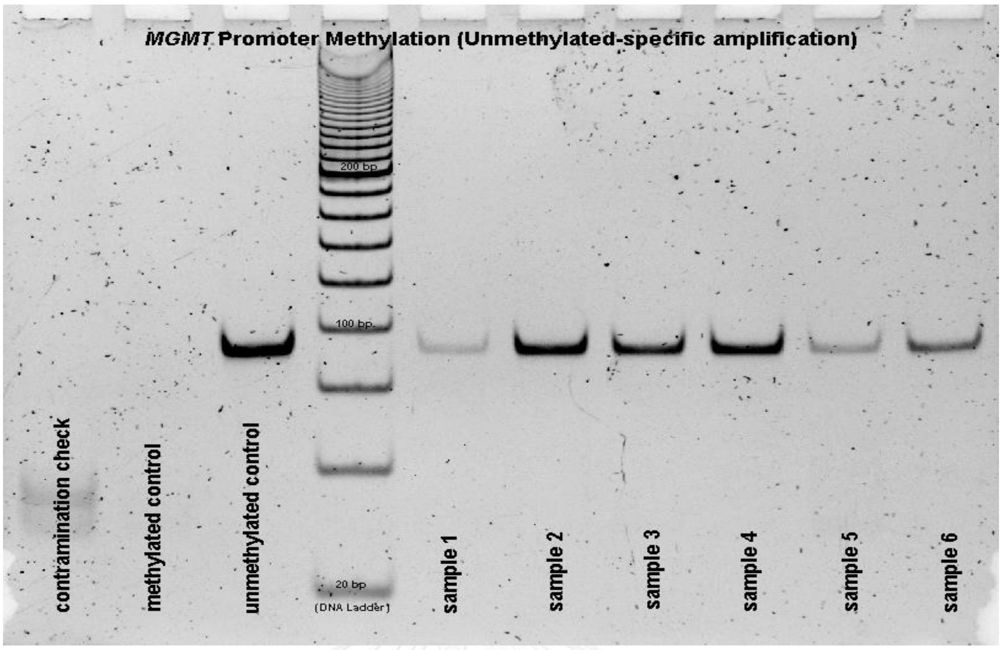
The two primer sets established by Esteller et al. for MSP of MGMT [2] were 5'-TTTCGACGTTCGTAGGTTTTCGC-3' (forward primer) and 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3' (reverse primer) for methylated template detection (Methylation primers, product length 81 bp; Figure 1, purple bars) and 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (forward primer) and 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3' (reverse primer) for unmethylated template detection (Unmethylation primers, product length 93 bp; Figure 1, mint bars). The PCR was performed in a total volume of 20 µl containing 0.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 0.4 µM of the respective forward and reverse primer (10 µM), and 40 ng bisulfite treated template DNA. The PCR program was

95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final step at 72°C for 7 min. PCR reactions with Epitect control DNA Methylated (QIAGEN), with Epitect control DNA Unmethylated (QIAGEN), and without any DNA (Contamination control) were included as controls. PCR products were separated on 8% polyacrylamide gel. For a qualitative assessment, images of the polyacrylamide gels were analysed with Quantity One software (Bio-Rad). A visible methylation primer band indicated a positive methylation status, whereas absence of a methylation primer MSP product was evaluated as a negative methylation status and visible unmethylation primer band indicated a positive unmethylation status.

รูปภาพที่ 5 แสดง methylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี MSP



รูปภาพที่ 6 แสดง unmethylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี MSP

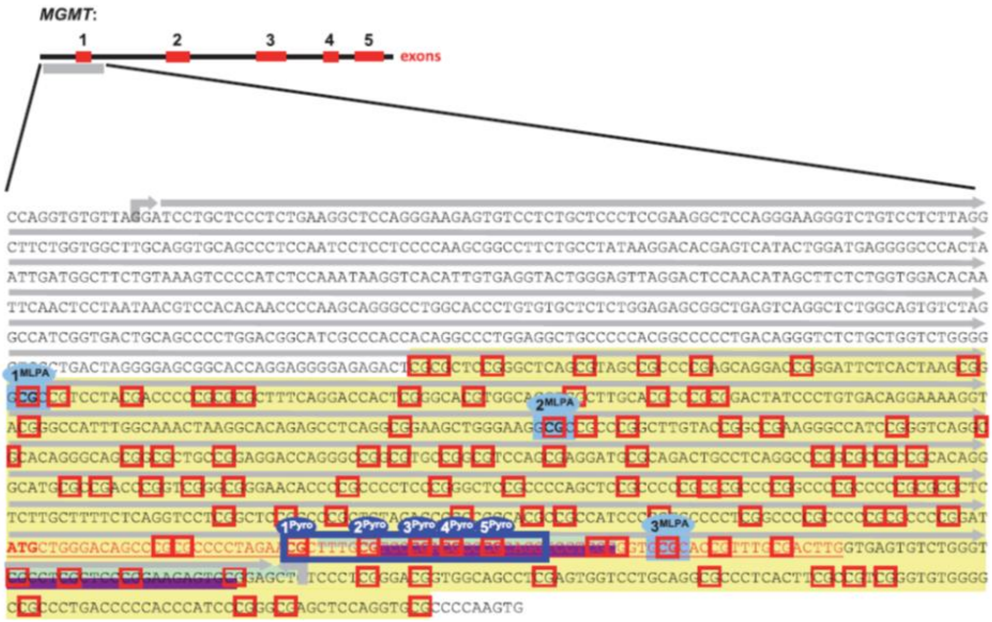


MGMT Pyrosequencing (PSQ)

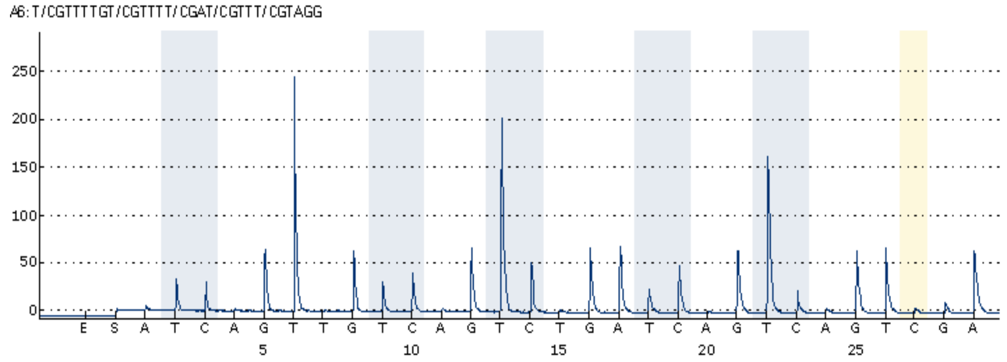
PSQ was performed on a PyroMark Q24 (QIAGEN) with a set of primers 5'-TTTYGGATATGTTGGGATAGTT-3' (forward primer), 5'-CCCAAACACTCACCAAATCRCAAAC-3' (reverse primer) and pyrosequencing primer 5'-GTTGGGATAGTTYGYGTTTTTAGAA-3' . The primer set covers a region of the MGMT promoter located at the start of the first exon (Figure 1, dark blue box), which is adjacent to the region that is covered by the MSP primers. The PCR was performed by using PyroMark PCR Kit (QIAGEN) in a total volume of 25 µl, containing 0.24 µM of each PCR primer (10 µM), and 40 ng of bisulfite-treated template DNA. The PCR cycling program was composed of an initial activation step at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 20 s, annealing at 53°C for 30 s and elongation at 72°C for 20 s. The program was finished by a final elongation step at 72°C for 7 min. PCR products were visualized by gel electrophoresis, and were subjected to the PSQ. DNA was mixed with streptavidin-coated sepharose beads, followed by strand separation and washing utilising the vacuum prep tool (QIAGEN).

The single-stranded DNA bound to the sepharose beads was mixed with 25 µl of 0.3 µM sequencing primer solution, heated to 80°C for 2 min and then cooled down (annealing) to room temperature for 5 min. For the sequencing reaction PyroMark Gold reagents were used (QIAGEN). The sequencing results were analysed using the PSQ PyroMark software (QIAGEN). As controls, Epitect control DNA Methylated (positive methylation control; QIAGEN) and Epitect control DNA Unmethylated (unmethylation control; QIAGEN) were included in the assay, as well as a reaction without any template DNA (contamination control). Pyrograms of the control DNA were analysed to confirm complete bisulfite conversion.

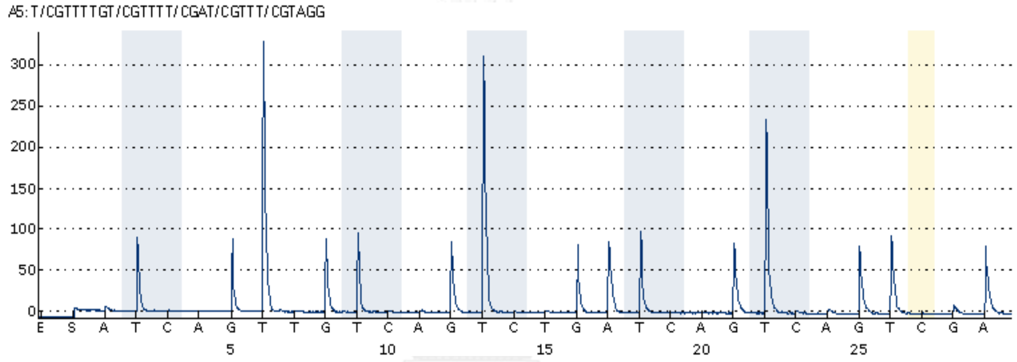
รูปภาพที่ 7 แสดง MGMT โปรโมเตอร์โดยแสดงตำแหน่งของ CpG ที่ใช้ในการศึกษา [(21)]



รูปภาพที่ 8 แสดง methylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี PSQ



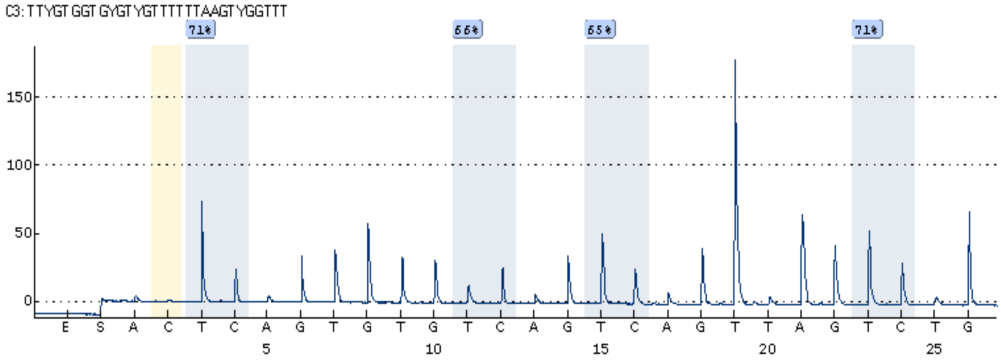
รูปภาพที่ 9 แสดง unmethylated MGMT ด้วยการตรวจด้วยวิธี PSQ



LINE-1 PYROSEQUENCING

Methylation analysis of LINE-1 was investigated using a pyrosequencing based methylation analysis. We used PyroMark PCR Kit with 0.2 μM of the forward primer (5’-TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA-3’), 0.2 μM of the reverse-biotinylated primer (5’-AAAATCAAAAAATTCCCTTTC-3’) and 60 ng of bisulfite-treated genomic DNA. PCR cycling conditions were 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of 95°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, 72°C for 50 sec and final extension 72°C for 10 min. The biotinylated PCR products were sequenced by Pyrosequencing PyroMark Q24 (QIAGEN). The pyrosequencing primer was 5’-AGTTAGGTGTGGGATATAGT-3’ and the nucleotide dispensation order was 5’-ACTCAGTGTGTCAGTCAGTTAGTCTG-3’.

รูปภาพที่ 10 แสดงการตรวจ LINE-1 methylation



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวจาริญญ์ จินดาประเสริฐ

สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

พ.ศ. 2544-2550	นิสิตคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2550	แพทย์ฝึกหัด (Internship) โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2551-2554	แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์
พ.ศ. 2554-2555	อายุรแพทย์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน	แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาวิชาอายุรศาสตร์โรคมะเร็ง ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ. 2550	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University